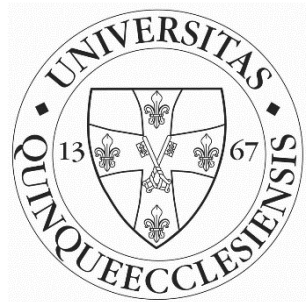


Genetikai abnormalitások vizsgálata plazmasejtes mielómában

Dr. Kosztolányi Szabolcs Örs

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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



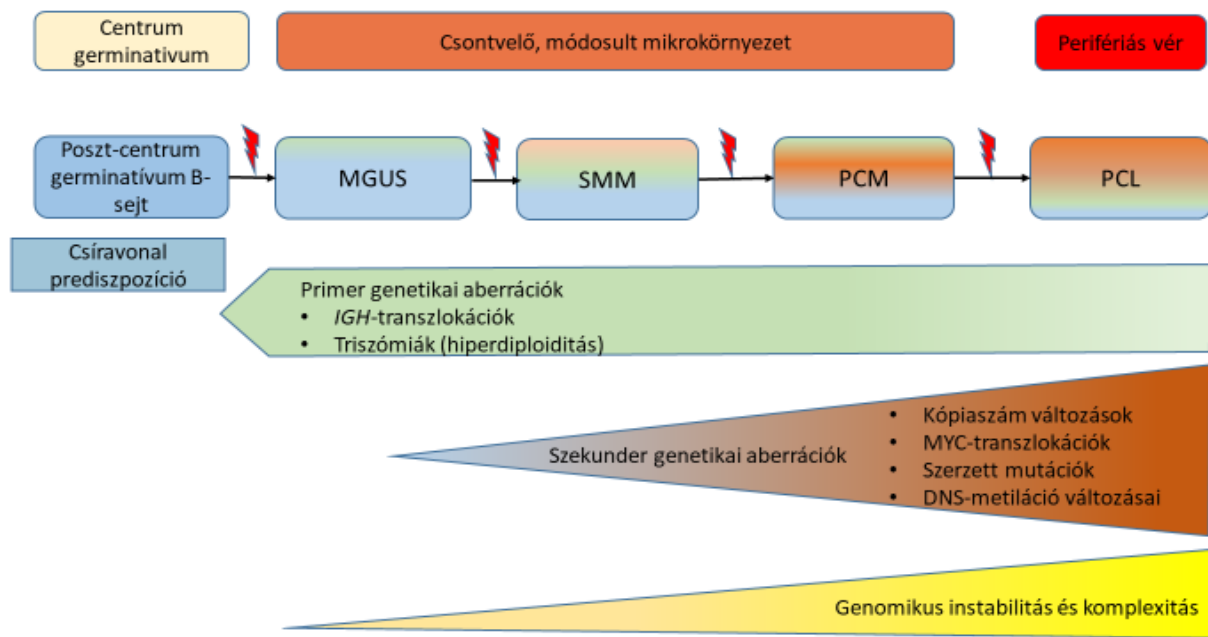
Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2020.

1. Bevezetés

A plazmasejtes mielóma (plasma cell myeloma - PCM) terminálisan differenciált, malignusan átalakult B-sejtek kóros mértékű felszaporodásával járó, jelenleg gyógyíthatatlan onkohematológiai betegség. Második leggyakoribb hematológiai malignomaként a PCM az összes daganatos betegség 1-2%-át teszi ki. A különböző molekuláris genetikai technológiákkal végzett tanulmányok eredményei alapján mára egyértelműen igazolódott, hogy a jellegzetes tünetekkel és célszerv károsodásokkal járó kórkép 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. A kórlefolyás végső fázisában a sejtek függetlenítik magukat a csontvelői mikrokozonyzattól és a perifériás vérbe jutva plazmasejtes leukémia (PCL) vagy - egyéb lokalizációban szaporodva - extramedulláris betegség alakulhat ki (EMD), mely együtt jár az érintett szerv funkcionális károsodásával. A már kifejlődött PCM klinikai megjelenése és lefolyása az egyes terápiás vonalakra adott válasz és a várható túlélés vonatkozásában igen heterogén képet mutat. Az immunmodulánsok, proteaszóma gátlók és 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.

A molekuláris biológiai technikák fejlődésének köszönhetően igazolódott, hogy a PCM nem csak klinikai megjelenésében és kórlefolyásában, de genetikailag is igen heterogén, komplex betegség. A PCM változatos genetikai hátterére jellemzőek a reciprok kromoszóma transzlokációk, a kiegyensúlyozatlan genetikai aberrációkhoz vezető számbeli és szerkezeti (strukturális) kromoszóma többletek, illetve hiányok, valamint a pontmutációk. A tumorgenezis korai szakaszában az elsődleges genetikai eltérésként azonosított, *IGH* gént érintő reciprok transzlokációk, illetve a jellemzően páratlan számú kromoszómák triszómiáival járó hiperdiploiditás játszanak alapvető szerepet. A betegség progresszióját a random módon halmozódó, a csontvelői mikrokozonyzet, illetve a terápia által befolyásolt klonális szelekció révén fennmaradó, másodlagos (szekunder) genetikai eltérések segítik elő (1. ábra).



1. ábra A plazmasejtes mielóma kialakulása és progressziója.

A plazmasejtes mielóma klinikailag jól elkülöníthető stádiumokon keresztül fejlődik. A tumor iniciációja a centrum germinatívumban antigén epitóp hatására *IGH*-génjünkben szomatikus hipermutáción és izotípus váltáson átesett B-sejtek malignus transzformációja révén alakul ki, ami primer genetikai aberrációk megjelenésével jár együtt. Bizonyos csírvonal (*germline*) mutációk jelenléte daganatos átalakulás iránti fokozott hajlammal társul. A primer aberrációk klonális jellege a kórlefolyás során jellemzően nem változik. A progresszió folyamatát (piros villámmal jelölve) fokozódó genomikus instabilitáshoz vezető sorozatos, random módon szerzett szekunder aberrációk vezérik. A betegség előrehaladtával a mielómás sejtpopuláció genomikus komplexitása fokozódik, a sejtek függetlenítik magukat a csontvelői mikrokörnyezettől és plazmasejtes leukémia alakul ki. A tumor eltérő genetikai aberrációk érintettségével jellemezhető szubklonális összetétele változik a kórlefolyás során, amit az egyes stádiumok közötti színátmenetek jeleznek. MGUS: bizonytalan jelentőségű monoklonális gammopátia; SMM: parázsló (smouldering) mielóma; PCM: plazmasejtes mielóma; PCL: plazmasejtes leukémia; *IGH*: immunoglobulin nehézlánc gén.

Beteg-, illetve betegség-specifikus klinikai tényezők mellett az észlelt genetikai eltérések kimenetelt befolyásoló szerepét számos vizsgálat igazolta. Bár több aberráció prognosztikus jelentősége még nem ismert, vannak bizonyos visszatérő kromoszómális eltérések, melyekről egyértelműen bebizonyosodott, hogy kedvezőtlenül befolyásolják a betegek túlélési esélyeit. A Nemzetközi Mielóma Munkacsoport 2014-ben publikálta az átdolgozott stádium besoroló rendszerét (R-ISS), mely csupán 3 magas rizikójú eltérés vizsgálatát követeli meg (úgy mint a $t(4;14)$, a $t(14;16)$ és a $del(17p)$). A PCM-hez társuló genetikai eltérések azonban ennél jóval komplexebb képet mutatnak, az egyidejűleg megjelenő aberrációk különböző betegeknél mutatkozó kombinációi eltérő módon árnyalhatják a várható túlélést.

Míg kariotipizálással a betegek mintegy 30-40%-ában mutatható ki valamilyen genetikai eltérés, nagyobb felbontású és érzékenyebb módszerekkel (pl. fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), génexpressziós vizsgálatok, DNS microarray-alapú vizsgálatok, új-generációs

szekvenálás) az esetek közel 100%-ában detektálható valamilyen aberráció. 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. Az egyes abnormalitásoknak, illetve azok kombinációinak kimutatása segíti a PCM-ben szenvedő betegek genetikai jellemzését, klasszifikációját és prognosztikai besorolását.

A PCM diagnosztikájában széleskörben elterjedtek az interfázisban lévő sejtek magjain végzett célzott FISH vizsgálatok. FISH tesztekkel rutinszerűen azonban csak kettő, ritkábban három kromoszómális lókuszt vizsgálható egyidejűleg. Emellett a tesztek egy részénél az eredmény helyes értelmezéséhez úgynevezett kontroll szonda használata is szükséges, mellyel a vizsgálni kívánt régió kívül, ugyanazon kromoszóma egy távoli szakasza is láthatóvá tehető, ez azonban tovább csökkenti az egyidejűleg vizsgálható valós cél régiók számát. A multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció (MLPA) egy olyan módszer, mely akár 55-60 különböző kromoszómális lókuszt kópiaszám eltéréseinek egyidejű célzott vizsgálatát teszi lehetővé. A módszer nem nyújt lehetőséget egyedi sejtek vizsgálatára és megbízható használatához legalább 25-30%-os tumor sejt tisztaság szükséges, ugyanakkor exon szintű genomikus feloldása meghaladja a FISH tipikus, 100 kilobázis - 1 megabázis nagyságrendű feloldóképességét, és a FISH-hez hasonlóan 24 órán belül eredményt szolgáltat. Az MLPA új-generációs szekvenálással kombinált változata a digitális MLPA, mellyel az MLPA-hoz képest egy nagyságrenddel nagyobb számú genomikai lókuszt vizsgálható egyidejűleg. Előnyei ellenére az MLPA és a digitális MLPA széleskörű alkalmazása a hazai hematológiai diagnosztikában jelenleg még várat magára.

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, 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 kimutatható eltérések gyakoriságát figyelembe véve.

2. Célkitűzés

A PCM-ben szenvedő betegek – gyakran a kezelési stratégiát is befolyásoló – pontosabb rizikó besorolásához korszerű, átfogó genetikai karakterizálás szükséges, ami nagyszámú kromoszómális lókuszt célzott analízisével lehetséges. Célként tűztük ki olyan módszerek tesztelését, mellyel ez a feladat a hazai klinikai diagnosztikában reálisan megoldható. Emellett vizsgálni kívántuk a PCM patogeneziséhez társuló klonális evolúciós folyamatokat is.

2.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával

Teszteltük az MLPA módszer hatékonyságát egy olyan szondakeverékkel, mely a PCM-ben jellemzően mutatkozó, DNS kópiaszám változással járó aberrációk analízisét 42 genomikus lókuszt egyidejű vizsgálatával teszi lehetővé. Az MLPA eredményeket összevetettük és validáltuk FISH technikával nyert adatokkal, feltérképezve a módszer előnyeit és limitációit.

2.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával

Vizsgáltuk a digitális MLPA módszert PCM-ben szenvedő betegek diagnosztikai mintáiban megjelenő DNS kópiaszám eltérések felderítésében, az eredményeket összevetettük MLPA és FISH 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

A digitális MLPA elvileg alkalmas ismert pontmutációk specifikus kimutatására is, ezért 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-es betegein

Összesítettük azoknak a PCM-ben szenvedő betegeknek a molekuláris citogenetikai eredményeit, akiknek az elmúlt évtizedben diagnosztikus mintái érkeztek a PTE Pathológiai Intézetébe Baranya, illetve Tolna megyéből. A FISH és MLPA módszerrel nyert eredmények összehasonlításával fel kívántuk fedni az egyes technikák által nyújtott valós hozzáadott értékeket, mely segítheti a diagnosztikai munkafolyamat hatékonyabbá tételét.

2.5. Klonális evolúció vizsgálata egyedi sejt szinten

A PCM patogenezisét kísérő klonális evolúciós folyamatokat egyedi sejt szinten vizsgáltuk FISH módszerrel annak érdekében, hogy felderítsük az egyes abnormalitások megjelenési sorrendjét, illetve információt nyerjünk a betegség patogenezisének korai szakaszában megjelenő aberrációknak a betegség iniciálásában betöltött lehetséges szerepéről.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

Tanulmányainkba döntően a PTE Klinikai Központ I. sz. Belgyógyászati Klinika Hematológia Tanszékén rosszindulatú plazmasejtes megbetegedéssel diagnosztizált betegeket vontunk be. A betegek túlnyomó többségénél csontvelői mintát vizsgáltunk, néhány betegnél perifériás vér állt csak rendelkezésre. Negatív kontrollként malignus betegségben nem szenvedő betegek és egészséges önkéntesek csontvelő, illetve perifériás vérmintáit használtuk. A diagnosztikus vizsgálatok a PTE Pathológiai Intézetében történtek, a genetikai vizsgálatok egy részét a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetével, valamint a Leiden University Medical Center Molekuláris Sejtbiológiai Intézetével kollaborációban végeztük.

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. 20% alatti plazmasejt arány esetén mágnes gyöngyös dúsítást végeztünk CD138 expresszió alapján.

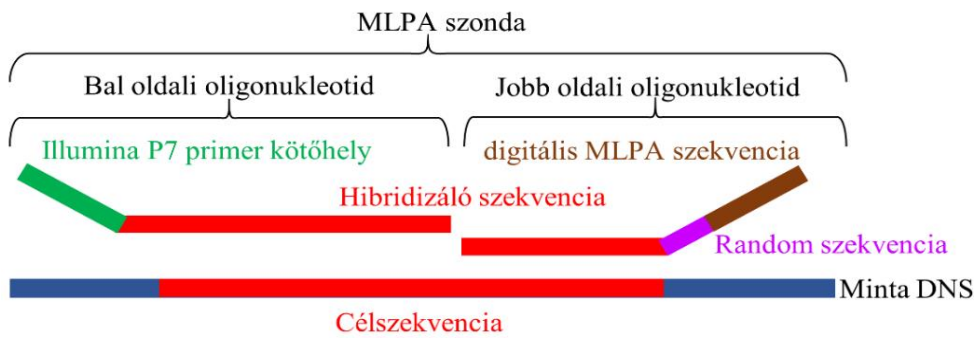
3.3. Multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció

Az MLPA reakciókhoz SALSA P425-A1 szondakeveréket (MRC-Holland, Amsterdam) használtunk a gyártó ajánlásának megfelelően. A szondák 42, PCM-ben visszatérő módon érintett kromoszómális régiót fedtek le: 1p32 (*FAF1*, *CDKN2C*, *PLPP3* és *DAB1* 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).

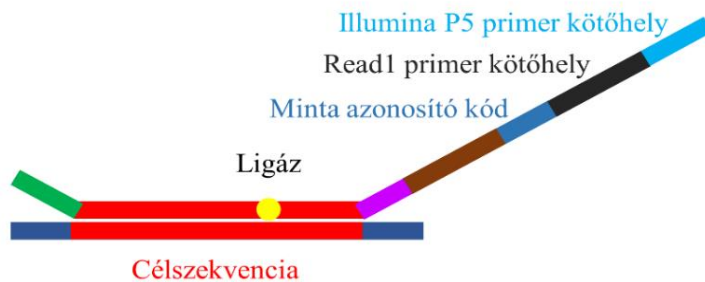
3.4. Digitális multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció

Digitális MLPA vizsgálatainkhoz a D006 szondakeveréket (MRC-Holland) használtuk. A szondakeverék (i) 268 target specifikus, elsősorban visszatérő szubkromoszómális DNS kópiaszám eltérések detektálására fejlesztett szondát tartalmazott, ezenkívül (ii) egy szondát a *BRAF*^{V600E} mutáció specifikus kimutatására, (iii) 105 referencia szondát, melyek aberrációk által jellemzően nem érintett régiókhoz hibridizáltak, valamint (iv) 128 belső kontroll szondát minta azonosítás és minőség ellenőrzés céljából. A referencia szondák lehetővé tették a nyert adatok normalizálását, illetve a target specifikus szondák egy részével együtt használva segítették a teljes kromoszóma eltérések azonosítását, lefedve minden kromoszóma centromer és telomer közeli régióit, valamint a kromoszóma karok középső tartományát. A digitális MLPA módszer egyes lépéseit a 2. ábra szemlélteti.

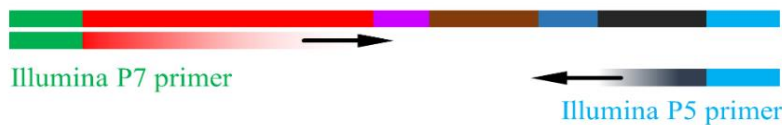
A. Denaturáció és hibridizáció



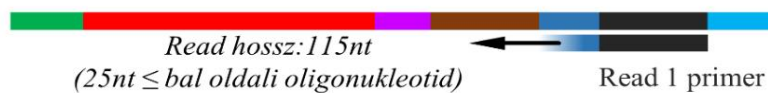
B. Ligálás és minta azonosító kód hozzáadása



C. Amplifikáció



D. Szekvenálás



E. Read számlálás és relatív kópiaszám meghatározás

		Abszolút read szám				
		Minták				
		M1	M2	M3	M4	M5
szondák	sz1	964	534	955	1009	978
	sz2	1016	498	1063	1021	953
	sz3	983	523	977	965	1031
	sz4	967	1078	989	1453	1098
	sz5	1097	988	1047	1567	948
	sz6	959	1011	1081	1502	991
	...					
	sz500	1032	992	1055	994	1027

		Relatív kópiaszám				
		Minták				
		M1	M2	M3	M4	M5
szondák	sz1	0.95	0.51	0.96	1.01	0.98
	sz2	1.03	0.48	1.06	1.02	0.95
	sz3	0.98	0.54	0.98	0.97	1.03
	sz4	0.97	1.08	0.99	1.46	1.10
	sz5	1.10	0.99	1.05	1.59	0.95
	sz6	0.96	1.01	1.08	1.46	0.99
	...					
	sz500	1.06	0.96	1.06	0.99	1.03

2. ábra A digitális multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció menete.

A technika a hagyományos MLPA első lépésein alapul, a szondákból létrehozott PCR termékeket azonban nem hosszuk alapján azonosítjuk, és mennyiségüket nem kapilláris gélelektroforézissel határozzuk meg, hanem új-generációs szekvenálással vizsgáljuk az egyes PCR termékek nukleotid sorrendjét, majd az egyes szondákat (genomikus lokuszokat) reprezentáló szekvenálási 'read'-ek számából (abszolút read szám), kétlépcsős (mintán belüli és kontroll mintákhoz viszonyított) normalizálást követően határozzuk meg a vizsgált genomikus régiók relatív kópiaszámát. A teljes szondák végein P7 és P5 primer kötőhelyek vannak, melyek a megfelelő primerekkel való amplifikáción túl a termékek bármely Illumina platformon való szekvenálását is lehetővé teszik.

3.5. Piroszekvenálás

A *BRAF* gén V600E mutációjának validálását PyroMark Q24 műszerrel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A reverz irányban végzett szekvenálás normál mintákban vad típusú CAC szekvenciát, *BRAF*^{V600E} mutáció esetén pedig CTC genotípust eredményezett. A nyert adatokat PyroMark Q24 szoftverrel értékeltük.

3.6. Digitális droplet PCR

A *BRAF*^{V600E} mutáció jelenlétének magasabb érzékenységgű validálásához digitális droplet PCR-t alkalmaztunk. *BRAF* specifikus assay-k segítségével vizsgáltuk a vad típusú és mutáns allélokat. A dropletet QX200 Droplet Generátorral állítottuk elő, a detektálást QX200 Droplet Digital PCR rendszerrel végeztük (Bio-Rad, Hercules, USA). Az eredmények értékeléséhez a Bio-Rad QuantaSoft szoftvert használtuk.

3.7. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Kétszínű jelöléssel vizsgáltuk a -13/del(13q)-t, a del(17p)-t és az immunglobulin nehézlánc (*IGH*) gént érintő átrendeződéseket, utóbbi pozitivitása esetén pedig három specifikus *IGH* transzlokációt, úgymint a t(4;14)(p16;q32), a t(11;14)(q13;q32) és a t(14;16)(q32;q23) átrendeződéseket. Az 1-es kromoszóma abnormalitásait kereskedelemben elérhető szondával és általunk létrehozott, 1p32.2, 1p21 és 1q21 régiókra specifikus szondákkal vizsgáltuk. Az értékelést Zeiss AxioImager A1 mikroszkóppal és Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált citometriai műszerrel végeztük az Európai Mielóma Hálózat ajánlásainak megfelelően.

3.8. Motorizált mikroszkópia

A klonális evolúciós vizsgálatokhoz kombinált FISH analíziseket végeztünk. Ennek során az első FISH jelöléssel vizualizáltuk az egyik genetikai aberrációt a sejtmagokban, majd a preparátumot motorizált mikroszkóppal (Zeiss Axioplan2ie MOT) digitalizáltuk. Az első FISH jelölés eltávolítása után a sejtmagokon újabb hibridizálást végeztünk további genetikai aberrációk kimutatása végett. Az egyes sejtmagokat a korábban rögzített koordinátájuk alapján visszakerestük, így a különböző aberrációkat ugyanazon sejtekben tudtuk vizsgálni.

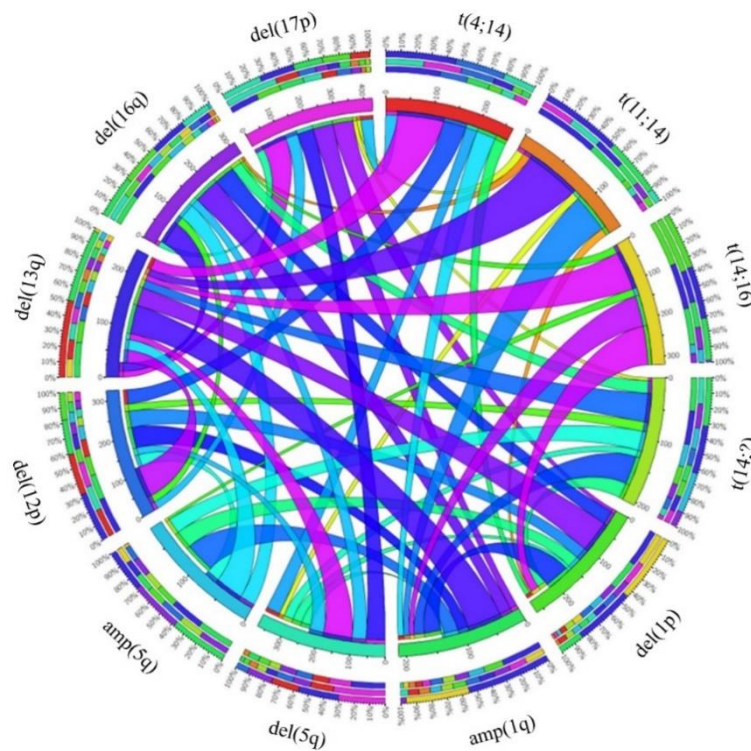
3.9. Statisztikai értékelés

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 szubklónálisan detektált specifikus *IGH*-transzlokációk előfordulási gyakoriságát Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze.

4. Eredmények

4.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával

MLPA-val 81 beteget vizsgáltunk, a betegek 91%-ában azonosítottunk DNS kópiaszám eltéréseket. A 13-as kromoszóma aberrációi mutatkoztak a leggyakrabban, melyeket csökkenő gyakorisággal követett az 1q többlet, 1p hiány, 5q többlet, 12p hiány, 16q hiány és 17p hiány. Több kópiaszám eltérés egy betegben való előfordulását 33 eltérő kombinációban detektáltuk. Az MLPA, mint a PCM rutin diagnosztikájában potenciálisan alkalmazható technika teljesítményét a jelenleg standard módszerként használt FISH-hez hasonlítva értékeltük. A 405 (5 x 81) összehasonlító teszt eredményből 368 (90,8%) esetben találtunk egyezést. A két módszer közötti eltérő eredményeket a cél régiók közötti enyhe eltérés, kis kiterjedésű fokális deléció jelenléte, illetve az aberrációt hordozó sejtek alacsony aránya okozta. A FISH 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. Az egyes aberrációk közötti kapcsolatok erősségét a 3. ábra mutatja be.



3. ábra Az azonosított citogenetikai aberrációk egyes betegekben való együttes előfordulása (circos plot).

Az ábra a FISH és MLPA módszerekkel kimutatott összes aberráció együttes, páros előfordulását mutatja be. A belső körben lévő húrok szélessége, illetve lilától narancsszínig terjedő fokozatos színátmene arányos a másik (párban álló) eltérés előfordulásával az adott aberrációt hordozó betegcsoporton belül.

4.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával

Digitális MLPA-val 56 beteget vizsgáltunk, a módszer a betegek 84%-ában mutatott ki teljes kromoszómát érintő hiányt vagy többletet. A leggyakoribb eltérés a 13-as kromoszóma monoszómiája volt. A triszómiák 94%-át azon betegekben figyeltük meg, akiknél hiperdiploid kariotípus mutatkozott.

Szubkromoszómális kópiaszám 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. 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. Összesen a betegek 95%-ában mutattunk ki abnormalitásokat.

Az 1-es kromoszóma régióihoz 44 különböző digitális MLPA sonda hibridizált, 19 a rövid, 25 a hosszú kromoszóma karhoz kapcsolódva, ezzel lehetővé téve az 1-es kromoszóma abnormalitásainak részletes vizsgálatát. Az 1-es kromoszómán jelentkező kópiaszám eltérések különböző jellemzőit együttesen vizsgálva 38 betegben 24 mintázatot tudtunk elkülöníteni az eltérés elhelyezkedése és kiterjedése, valamint az aberráció eredményeként megjelenő allél mennyiség vonatkozásában.

A digitális MLPA adatokat összevetettük a betegek korábbi, hagyományos MLPA és FISH eredményeivel. 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: $p < 0,0001$). Szubkromoszómális aberrációkat tekintve a digitális MLPA 156 olyan eltérést azonosított 45 hiperdiploid és nem hiperdiploid betegben, melyeket kizárólag ezzel a technikával detektáltunk.

4.3. Pontmutáció specifikus kimutatása digitális MLPA technikával

BRAF^{V600E} mutációt két betegben azonosítottunk digitális MLPA-val, az eltérést az egyik betegben sikeresen validáltuk piroszekvenálással. A nagyobb érzékenységű digitális droplet PCR analízis mindkét beteg mintájában megerősítette az aberráció jelenlétét.

4.4. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye PCM-es 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 231 beteg adatait kiértékelve.

Negyvennyolc minta esetében végeztünk mágneses dúsítást a plazmasejtek 20%-ot el nem érő aránya miatt. A dúsítást követően átlagosan 72%-ra emelkedett a plazmasejtek aránya (tartomány: 20 - 100%), a dúsulás mértéke átlagosan tizennyolcszorosnak bizonyult.

A teljes beteganyagban elvégzett FISH vizsgálatok során az *IGH* transzlokációkat, az 1q kromoszóma kar többletét, a 13-as kromoszóma abnormalitásait, valamint a 17p kromoszóma kar vesztését az irodalomban ismert gyakoriságokhoz hasonló arányban mutattuk ki. A 42, MLPA módszerrel is vizsgált beteg csontvelő mintájában 89 DNS kópia hiánnyal vagy többlettel járó, kiegyensúlyozatlan aberrációt azonosítottunk.

Az MLPA és FISH eredmények 96,2%-os konkordanciát mutattak. Összességében az MLPA a betegek 38%-ában mutatott ki olyan aberrációt, melyek az általunk végzett FISH vizsgálatokkal rejtve maradtak. Ugyanakkor FISH analízissel olyan kiegyensúlyozott eltéréseket tudtunk kimutatni, melyeket az alkalmazott MLPA szondakeverékkel nem lehetett 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. A tanulmányba bevont 185 beteg mintáiban a megjelenő aberrációk kezdeti szűrését független FISH vizsgálatokkal végeztük. Huszonöt beteg mintáiból állt rendelkezésre elegendő sejtmennyiség további, kombinált FISH 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 a genetikai eltérések alapján egynél több abnormalis sejtpopuláció mutatkozott. Eredményeink 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. Az *IGH* gén átrendeződést hordozó betegek 21,8%-ában az aberráció a plazma sejtek kevesebb mint kétharmadában volt kimutatható: *IGH/FGFR3* 20,0%, *IGH/CCND1* 16,7% és *IGH/MAF* 28,6%. Ez alapján 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. 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 FISH módszer céltudatos bevezetése a PCM diagnosztikájába, mellyel a leggyakoribb kiegyensúlyozott transzlokációk és kiegyensúlyozatlan kópiaszám eltérések gyorsan és specifikusan kimutathatók. A FISH 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 lókuszt vizsgálható egyidejűleg.

A kariotipizálás során a teljes genom vizsgálatára lehetőség nyílik, azonban a mielóma sejtek korlátozott tenyészhetősége és *in vitro* sérülékenysége, valamint a módszer alacsony feloldása miatt a vizsgálat korlátozott szereppel bír a PCM diagnosztikájában. 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 és a szintén fókuszált vizsgálatot lehetővé tevő digitális MLPA ebben a környezetben kézenfekvő alternatívának tűnik költséghatékonysága, valamint viszonylag egyszerű és gyors kivitelezhetősége miatt. Ezek a módszerek alkalmasak a jelenlegi hazai kezelési protokollok mellett potenciális jelentőséggel bíró összes kiegyensúlyozatlan aberráció egyidejű kimutatására, ezáltal egyértelműen segíthetik a PCM-ben szenvedő magyar betegek mintáinak átfogóbb genetikai jellemzését. Az MLPA és a digitális MLPA is felfedte a vizsgált betegek többségében olyan aberrációkat, melyeket az alkalmazott FISH vizsgálatok nem mutattak ki. Ezenkívül eredményeink alapján az MLPA/digitális MLPA exon szintű genomikai feloldása néhány esetben lehetővé teheti olyan kis kiterjedésű aberrációk kimutatását is, melyek

FISH-sel nem detektálhatók, igaz a reakció elvégzéséhez a FISH-nél megszokotthoz képest valamivel magasabb minta tisztaság szükséges. Ugyanakkor a FISH képes a PCM genetikai vizsgálata szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró kiegyensúlyozott transzlokációkat kimutatni, valamint alkalmas egyedi sejt szintű analízisre, mely segíthet a mielómás sejtpopuláció betegeken belüli heterogenitásának, klonális evolúciós folyamatainak feltérképezésében is. Az MLPA/digitális MLPA és FISH módszerek összehasonlításával nyert eredményeink, valamint a fentebb említett technikai előnyök és hátrányok alapján megállapítható, hogy a módszerek egymást kiegészítő vizsgálati eljárásnak tekinthetők, együttes alkalmazásukkal pedig szinte az összes mielómás betegben azonosítható valamilyen biológiailag és/vagy klinikailag releváns genetikai eltérés.

Egyedi sejt szintű, kombinált FISH 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. 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.

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 FISH analízissel.
2. Nemzetközi szinten elsőként alkalmaztuk a digitális MLPA módszert PCM-ben mutakozó 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 genetikai 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 módszerrel 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 a FISH együttes alkalmazása jelentősen segíthetné a jövőben a plazmasejtes mielómában szenvedő hazai betegek átfogóbb genetikai jellemzését.
5. Kombinált FISH 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 betegséget iniciáló funkciója megkérdőjelezhető, sőt kizárható az érintett betegek legalább egyötödében.

7. A tézisek 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, Gángo 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**, Gángo 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 absztrakt

Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángo 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.

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. 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 Pathológiai 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 piroszekvenálással 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 kiértékelésére vonatkozóan.

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.

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 Kiválóság Programja támogatta. Az MLPA és digitális MLPA vizsgálatokhoz a szondakeveréket az MRC-Holland bocsátotta a szerzők rendelkezésére.