

**Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció alkalmazásának
lehetőségei onkohematológiai kórképek DNS kópiaszám
eltéréseinek vizsgálatában**

Doktori értekezés

Dr. Kiss Richárd

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Alpár Donát, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Bödör Csaba, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Bors András, Ph.D., klinikai biokémikus
Dr. Varga Gergely, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Ábrák jegyzéke.....	5
Táblázatok jegyzéke.....	7
Rövidítések jegyzéke.....	8
1. Bevezetés.....	10
1.1. Genetikai eltérések vizsgálata onkohematológiai kórképekben	11
1.2. Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció	12
1.2.1. A konvencionális MLPA technikai háttere és folyamata.....	14
1.2.2. Metiláció szenzitív MLPA	19
1.2.3. Digitális MLPA.....	19
1.2.4. Az MLPA és dMLPA előnyei és limitációi	21
1.3. Az MLPA alkalmazása leukémiák és limfómák vizsgálatához	23
1.3.1. CLL	26
1.3.2. Myeloma multiplex	28
1.3.3. ALL	29
1.3.4. Egyéb malignus hematológiai kórképek	32
2. Célkitűzések	34
3. Anyagok és módszerek	35
3.1. Vizsgálati minták	35
3.1.1. CLL betegminták.....	35
3.1.2. MM betegminták.....	35
3.1.3. Gyermekkorai ALL betegminták	36
3.2. Konvencionális MLPA reakciók.....	36
3.2.1. CLL konvencionális MLPA szondakeverék	36
3.2.2. MM konvencionális MLPA szondakeverék.....	38
3.2.3. ALL konvencionális MLPA szondakeverékek	39
3.3. dMLPA reakciók.....	42
3.3.1. MM dMLPA szondakeverék.....	42
3.3.2. ALL dMLPA szondakeverék	42
3.4. Kiegészítő vizsgálatok	45
3.4.1. iFISH reakciók	45

3.4.2.	Piroszekvenálás	46
3.4.3.	Digitális droplet PCR	46
3.4.4.	<i>IGH</i> génátrendeződés vizsgálata ALL-ben	46
3.5.	Statisztikai analízis.....	47
3.6.	Etikai vonatkozások	47
4.	Eredmények.....	48
4.1.	MLPA alkalmazása CLL-ben	48
4.1.1.	Kópiaszám eltérések MLPA-val és iFISH-sel.....	48
4.1.2.	Kópiaszám változások ibrutinib kezelés hatására	51
4.1.3.	Klonális evolúció ibrutinib rezisztencia során	53
4.2.	MM kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val	54
4.2.1.	Numerikus kromoszóma eltérések detektálása.....	54
4.2.2.	Szubkromoszómális kópiaszám eltérések	56
4.2.3.	Az 1-es kromoszóma kópiaszám eltéréseinek részletes feltérképezése	64
4.2.4.	dMLPA, MLPA és iFISH eredmények összevetése	65
4.2.5.	<i>BRAF</i> V600E mutáció detektálása	67
4.3.	Gyermekekori ALL kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val	67
4.3.1.	Kópiaszám eltérések diagnosztikus betegmintákban	68
4.3.2.	Diagnózis és relapszuskori minták kópiaszám eltéréseinek összehasonlítása	72
4.3.3.	A dMLPA és konvencionális MLPA eredmények összevetése	80
4.3.4.	<i>IGH</i> klonotípusok összehasonlító vizsgálata diagnózis és relapszus idején	82
4.3.5.	Genetikai rizikó-stratifikáció.....	83
5.	Megbeszélés	89
5.1.	CLL-ben megjelenő DNS kópiaszám eltérések vizsgálata konvencionális MLPA-val.....	89
5.2.	dMLPA alkalmazásával szerzett tapasztalatok	92
5.2.1.	dMLPA alkalmazása MM-ben	93
5.2.2.	dMLPA alkalmazása gyermekekori ALL-ben	96
5.3.	Az MLPA helye az onkohematológiai diagnosztikában	100
6.	Következtetések	103
7.	Összefoglalás.....	104

8. Summary	105
9. Irodalomjegyzék.....	106
10. Saját publikációk jegyzéke.....	134
10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények.....	134
10.2. Egyéb témában megjelent közlemények.....	135
11. Köszönetnyilvánítás	137

Ábrák jegyzéke

1. <i>ábra.</i> Genomikus aberrációk felderítésében alkalmazható módszerek felbontási spektruma.	13
2. <i>ábra.</i> A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció módszertani lépései.	15
3. <i>ábra.</i> DNS kópiaszám eltérések és mutáció kimutatása multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval.	18
4. <i>ábra.</i> Demonstratív dMLPA eredmény.	20
5. <i>ábra.</i> CLL vizsgálatával nyert iFISH és MLPA eredmények összefoglalása.	49
6. <i>ábra.</i> iFISH és MLPA technikákkal kimutatott eltérések összehasonlítása CLL-ben	50
7. <i>ábra.</i> Ibrutinib terápiában részesülő CLL-es betegek kezelés előtti és kezelés során vett mintapárjainak kópiaszám eltérései MLPA-val.	52
8. <i>ábra.</i> CLL ibrutinib kezelése alatt kialakuló terápia rezisztencia tér és időbeli vonatkozásainak vizsgálata konvencionális MLPA-val.	53
9. <i>ábra.</i> Hiperdiploid dMLPA profil egy MM-ben szenvedő beteg demonstratív mintáján	55
10. <i>ábra.</i> Számbeli kromoszómaaberrációk dMLPA-val megfigyelt gyakorisága MM-ben	56
11. <i>ábra.</i> dMLPA, MLPA és iFISH módszerekkel detektált, visszatérő aberrációk MM-ben	63
12. <i>ábra.</i> Digitális MLPA, MLPA és iFISH módszerekkel nyert eredmények összevetése MM-ben.	66
13. <i>ábra.</i> BRAF V600E mutáció validálása digitális droplet PCR módszerrel az 55-ös számú MM-ben szenvedő beteg mintájában	67
14. <i>ábra.</i> Teljes kromoszómaszámok és a teljes kromoszómákat érintő többletek gyakorisága HD prekurzor B-sejtes ALL-ben szenvedő betegekben	69
15. <i>ábra.</i> dMLPA-val azonosított kópiaszám eltérések diagnózis és relapszus idején vett T- és B-ALL-es betegmintákban.	76
16. <i>ábra.</i> Diagnózis- és relapszuskori sejtek klonális viszonyai a detektált CNA-k alapján T- és B-ALL-ben szenvedő betegek mintapárjaiban.	79
17. <i>ábra.</i> B-ALL-ben szenvedő betegek eseménymentes túlélése <i>IKZF1</i> kópiaszám státusz alapján (n=76).	84

18. ábra. B-ALL-ben szenvedő betegek eseménymentes túlélési adatai CNA alapú rizikó besorolás alapján (n=76)86

19: ábra. B-ALL-ben szenvedő betegek túlélési adatai kombinált CNA és citogenetikai eltérések alapján (n=76)88

Táblázatok jegyzéke

<i>1. táblázat.</i> Publikációk MLPA alkalmazásáról malignus onkohematológiai kórképekben	24
<i>2. táblázat.</i> A tanulmányban genomikus kópiaszám eltérések kimutatásához használt MLPA szondakeverékek	37
<i>3. táblázat.</i> A SALSA MLPA P425-A1, MM-ben alkalmazott szondakeverék tartalma	40
<i>4. táblázat.</i> A dMLPA D007-X2-0516 szondakeverék által lefedett gének	43
<i>5. táblázat.</i> Digitális MLPA, MLPA és iFISH módszerekkel detektált genetikai aberrációk a vizsgált MM-ben szenvedő betegekben	57
<i>6. táblázat.</i> Digitális MLPA módszerrel kimutatott biallélikus deléciók MM-ben	64
<i>7. táblázat.</i> Eltérést jelző szondák relatív kópiaszám értékei az 51-es számú, ALL-ben szenvedő beteg diagnosztikus mintájának hígítási sorából	68
<i>8. táblázat.</i> dMLPA-val gyermekkori ALL-ben detektált szubkromoszómális CNA-k előfordulása gyakoriság szerint.....	71
<i>9. táblázat.</i> dMLPA-val azonosított kópiaszám eltérések diagnózis- és relapszuskori ALL mintapárokban.....	73
<i>10. táblázat.</i> Gyermekkori ALL vizsgálatával nyert dMLPA és konvencionális MLPA eredmények statisztikai összehasonlítása.....	81
<i>11. táblázat.</i> B-ALL rizikócsoporthoz a CNA alapú osztályozáshoz.....	85
<i>12. táblázat.</i> dMLPA kópiaszám eltéréseken, és a UKALL citogenetikai rizikó csoportosítás kombinációján alapuló B-ALL rizikó klasszifikáció.	87

Rövidítések jegyzéke

AL	akut leukémia
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AML	akut mieloid leukémia
BAC	mesterséges bakteriális kromoszóma
BFM	Berlin, Frankfurt, Muenster protokoll
CCND1	Ciklin D1
CEP	kromoszóma enumerációs próba
CGH	komparatív genomikus hibridizáció
CK	komplex kariotípus
CLL	krónikus limfocitás leukémia
CML	krónikus mieloid leukémia
CNA	DNS-kópiaszám eltérés
DLBCL	diffúz nagy B-sejtes limfóma
dMLPA	digitális multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció
EFS	eseménymentes túlélés
FGFR3	fibroblaszt növekedési faktor receptor 3
FL	follikuláris limfóma
FR	framework régió
HD	hiperdiploid
iAMP21	a 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja
iFISH	interfázis fluoreszcencia <i>in situ</i> hibridizáció
IGH	immunoglobulin nehézlánc gén
LBL	limfoblasztos limfóma
LSI	llókuszt specifikus azonosító
MAF	v-maf muskulouloaponeurotikus fibroszarkóma onkogén homológ
MALT	mukóza asszociált limfoid szövet
MCL	köpenysejtes limfóma
MDS	mielodiszpláziás szindróma
MLPA	multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció
MM	mielóma multiplex

MMSET	mielóma multiplex SET domain
MS-MLPA	metilációszenzitív MLPA
NGS	új-generációs szekvenálás
OS	teljes túlélés
PC	plazmasejt
PCR	polimeráz-lánreakció
PFS	progresszió mentes túlélés
SLL	kis limfocitás limfóma
TTFT	első kezelésig eltelt idő
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság

1. Bevezetés

A malignus onkohematológiai kórképek kutatása és diagnosztikája számos alkalommal járt élen a daganatos betegségek háttérében meghúzódó genetikai folyamatok felderítésében (1). Ez részben a minták viszonylag könnyű hozzáférhetőségéből ered, hiszen legtöbb esetben egy egyszerű vérvétel, vagy csontvelői aspiráció során közvetlenül vizsgálható malignus sejtekhez juthatunk. A rosszindulatú hematológiai betegségek genetikai alapú rizikó stratifikációját, illetve az erre épülő személyre szabott kezelést tovább segíti, hogy ezen betegségekben jellemzően kevesebb genetikai elváltozás van jelen, mint a szolid tumorok többségében (2). Mindennek klasszikus példája a krónikus mieloid leukémia (CML), az első olyan rosszindulatú betegség, melynek kialakulását egy specifikus kromoszóma eltérés megjelenéséhez köötték (3). Napjainkra a Philadelphia-kromoszóma létrejöttével kialakuló *BCR-ABL1* fúziós gén kimutatása a CML diagnózisának alapfeltételévé vált, és ezen géntermék további vizsgálata a valódi terápiás forradalmat hozó tirozin-kináz gátló kezelések kulcsát jelentette (4). A rohamosan fejlődő molekuláris genetikai technikákkal végzett átfogó tanulmányoknak köszönhetően egyre több malignus hematológiai kórkép genetikai háttérét sikerül részletesen feltérképezni, ennek kapcsán pedig olyan markereket azonosítani, melyek adott esetben segítik a diagnózis felállítását, a betegség szubklasszifikációját, a prognózis meghatározását, a leghatékonyabb terápia kiválasztását, a reziduális tumortömeg nyomonkövetését, sőt, akár célpontokként is szolgálhatnak célzott kezelések számára (5-7). A legfontosabb markerek molekuláris tesztekkel való szűrése mára szerves részévé vált az onkohematológiai megbetegedések mindennapi diagnosztikájának és monitorozásának, azonban az új klinikai jelentőséggel bíró eltérések azonosítása továbbra is kiterjedt kutatások tárgyát képezi.

Az elmúlt mintegy másfél évtizedben elvégzett génexpressziós, genomikus „array” alapú, valamint új-generációs szekvenálási (NGS) vizsgálatok teljes exom, illetve genom szinten számos új, klinikai döntéshozatal szempontjából releváns genetikai eltérést tártak fel. A pontmutációk és a kisebb, néhány bázispárra kiterjedő deléciók és inzerciók mellett gyakran kiterjedtebb kromoszómarégiókat érintő aberrációk is előfordulnak, beleértve kiegyensúlyozott, valamint kiegyensúlyozatlan szubkromoszómális eltéréseket is. A kiegyensúlyozott aberrációk, például inverziók és reciprok transzlokációk esetében nincs DNS-kópiaszám változás, a genom

információtartalma megtartott marad. Az ennél gyakrabban előforduló kiegyensúlyozatlan aberrációk, vagyis DNS-kópiaszám eltérések (CNA) jellemzően kópiaszám hiányhoz (deléción), vagy kópiaszám többlet (gain) vezetnek (8). A sokszorozódás mértékétől függően duplikációk és változó mértékű amplifikációk jönnek létre (9). Az újonnan azonosított, klinikai jelentőségű eltérések vizsgálatának diagnosztikai munkafolyamatba való beillesztéséhez szükség van olyan gyors és megbízható módszerekre, melyekkel az adott entitásra jellemző aberrációk a lehető legátfogóbban, de költséghatékony módon vizsgálhatók minimális humán erőforrás ráfordításával.

1.1. Genetikai eltérések vizsgálata onkohematológiai kórképekben

Az egyes malignus hematológiai kórképekben rutinszerűen vizsgált genetikai eltérések azonosítása gyakran csak több vizsgálati módszer együttes alkalmazásával lehetséges. A mindennapi diagnosztikai körülmények között leginkább elterjedt kariotipizálás, interfázis fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (iFISH) és Sanger-szekvenálás mellett egyre nagyobb teret nyernek a nagy átteresztőképességű és érzékenységgű technológiák is, mint például a különböző NGS alapú módszerek, így párhuzamosan egyre több genomikus lókuszt nagy felbontású vizsgálata válik lehetővé. A CNA-k rutin diagnosztikus körülmények között történő vizsgálatában azonban széleskörben még nem terjedtek el ilyen új-generációs módszerek. A hazai gyakorlatban jelenleg használt metodikák felbontása, reprezentativitása, skálázhatósága és/vagy átteresztőképessége korlátozott. A CNA-k átfogó részletes vizsgálatára egyre nagyobb igény mutatkozik, mivel a hematológiai malignitások 20-70%-ában jelen vannak, és számos esetben klinikai relevanciával bírnak (10).

A citogenetikai eltérések kimutatásának hagyományos módszere a G-sávok kariotípus elemzése. Ez a módszer lehetővé teszi teljes genom szinten az egyes kromoszómák számbeli és strukturális eltéréseinek vizsgálatát, beleértve a kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan aberrációkat is. A kariotipizálás felbontása azonban mindössze 3-10 megabázis, elvégzése osztódó sejteket kíván, ami számos érett leukémia és limfóma vizsgálatában technikai nehézséget jelenthet, illetve mesterséges klonális szelekcióhoz is vezethet. A módszer reprezentativitása alacsony, jellemzően 20-

30 osztódás kerül elemzésre, egyéb diagnosztikai tesztekhez képest időigényes és a metafázisok analízise nagy gyakorlatot kíván.

A jelenlegi diagnosztikai munkafolyamatban ezért elterjedtebb módszer a célzott iFISH teszt, melynek feloldása 100 kilobázistól 1-2 megabázisig terjed, azonban egyidejűleg csak 3-4 genomikus lókuszt vizsgálhat teszti lehetővé. A módszer előnye, hogy alkalmas többszáz sejt gyors analizésére és a reakció bármilyen hisztológiai vagy citológiai mintán elvégezhető. Az iFISH hátránya, hogy a leggyakrabban használt kereskedelmi szonda kitek bár több lókuszt vizualizálnak egyszerre, legtöbbször egyetlen visszatérő aberráció kimutatására fókuszálnak így több aberráció párhuzamos vizsgálata költséges és időigényes.

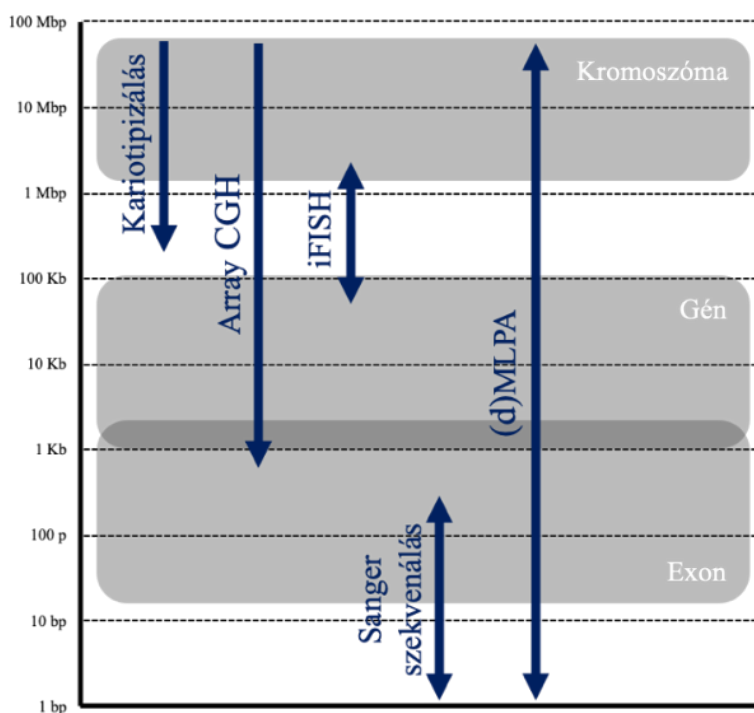
Mindezek alapján onkohematológiai betegek genetikai hátterének diagnosztikai vizsgálatához hatékonyan hozzájárulhatna egy olyan módszer, mellyel nagyszámú lókuszt vizsgálható egyidejűleg nagy felbontásban, rövid átfordulási idővel.

1.2. Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció

A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA) egy olyan polimeráz láncreakció (PCR) alapú molekuláris genetikai módszer, mely genomialis DNS célzott vizsgálatán keresztül teszi lehetővé kiegyensúlyozatlan aberrációk detektálását exon-szintű genomikai feloldás mellett, valamint ezzel párhuzamosan pontmutációk vizsgálatára is alkalmas. A módszer 24 órán belül eredményt szolgáltat és a protokoll minimális módosításával specifikus lókusztok DNS metilációs mintázatai is vizsgálhatók. Az MLPA számos konstitucionális genetikai rendellenesség diagnosztikájában használható és számos nemzetközi tanulmány igazolta hatékonyságát a daganatos betegségek területén is.

Az MLPA jellegéből adódóan egy fél-quantitatív módszer. A reakció során DNS specifikus szonda-oligonukleotidok hibridizálódnak a vizsgálandó genomikus régiókhoz, majd PCR reakcióban történő amplifikációjukat követően a felsokszorozott termékeket fluoreszcens kapilláris elektroforézissel szétválasztva és mennyiségileg meghatározva a vizsgált szakasz kópiaszám állapotára lehet következtetni. Konvencionális MLPA módszerrel egyidőben körülbelül 50 genomikus lókuszt kópiaszám eltérései és/vagy pontmutációi detektálhatók a legtöbb rutin diagnosztikai laborban elérhető PCR, illetve kapilláris elektroforézis készülékek alkalmazásával. Az elmúlt években kifejlesztésre

került az úgynevezett digitális MLPA (dMLPA) eljárás is, mely az Illumina NGS platform lehetőségeit és az MLPA technikai háttérét ötvözi, és a konvencionális MLPA-nál egy nagyságrenddel több lókuszt egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé továbbra is célzott módon, de az alkalmazott szondák nagy számának köszönhetően a lényegesen magasabb részletesség mellett (11). Az egyes módszerek felbontását és az általuk kimutatható eltérések spektrumát az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. Genomikus aberrációk felderítésében alkalmazható módszerek felbontási spektruma.

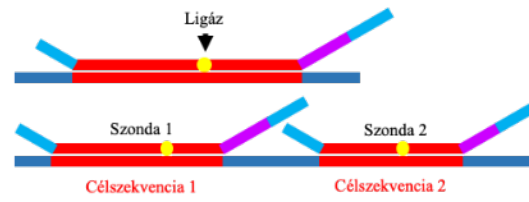
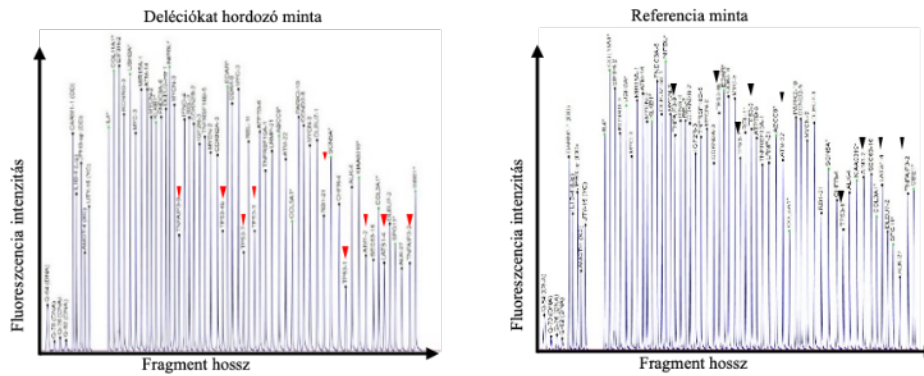
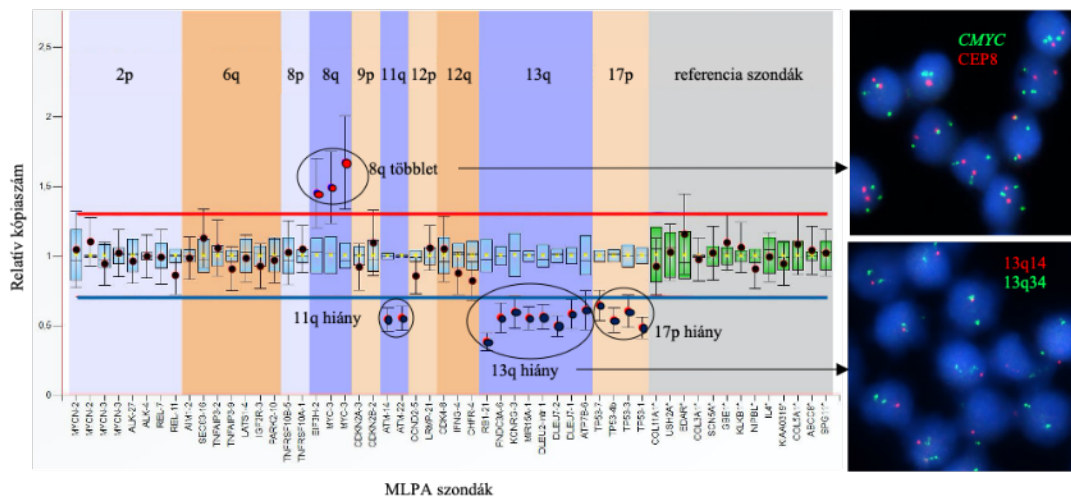
CGH: komparatív genomikus hibridizáció, iFISH: interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció, (d)MLPA: (digitális) multiplex ligációfüggő szonda amplifikáció, bp: bázispár.

A konvencionális MLPA széleskörű alkalmazása a hazai hematológiai diagnosztikában és kutatásban még nem valósult meg, dMLPA-t alkalmazó tanulmány pedig még a nemzetközi irodalomban is csak elvétve található. Ezért, az alábbiakban bemutatom ezen módszerek technikai háttérét, tárgyalom előnyeiket és hátrányaikat, valamint áttekintem az onkohematológiai kutatásban betöltött szerepüket és a módszerekben rejlő potenciális diagnosztikai lehetőségeket.

1.2.1. A konvencionális MLPA technikai háttere és folyamata

Az MLPA vizsgálat során a PCR reakcióval nem magát a minta DNS-t, hanem annak specifikus, vizsgálandó szakaszaihoz hibridizált szondákat sokszorozunk fel fluoreszcensen jelölt primerek segítségével, majd a keletkezett termékeket kapilláris elektroforézist követően kvantifikáljuk. Kiegyensúlyozatlan eltérések vizsgálatakor az adott genomikus szakasz betegmintában lévő kópiaszámára a keletkezett, lókuszs-specifikus PCR termékek normál kontrollokhoz viszonyított relatív mennyiségéből következtetünk. Kópia hiány esetén az adott genomikus pozícióban a normál kontrollhoz képest kevesebb PCR termék keletkezik, többlet-amplifikáció esetén az elvártnál több.

Az MLPA reakció optimális kiindulási minta mennyisége 50-100 ng genomiális DNS, melyet a protokoll első lépésében denaturálunk. Ezt követően hozzáadjuk az MLPA szondák oligonukleotidjait tartalmazó hibridizációs keveréket, melyet egy újabb rövid denaturáció követ mielőtt az oligonukleotidokat éjszakán át hibridizáljuk a minta DNS-hez. Ezzel a lépéssel minden egyes vizsgálandó genomikus lókuszhhoz kettő vagy három, közvetlenül egymás mellé hibridizáló szonda oligonukleotidot kapcsolunk. Amennyiben az illeszkedés tökéletes - azaz a lókuszt nem érintett olyan aberráció által mely a szomszédos oligonukleotid elégtelen hibridizációját, vagyis az érintkező végeknek eltávolodását vagy összefekvésését okozná - ligálással össze tudjuk azokat másnap kapcsolni, ezáltal létrehozva egy teljes MLPA szondát. A képződött komplett MLPA szondák mindkét szélén univerzális PCR primerkötő helyek találhatóak, melyek lehetővé teszik a reakció elegendő létrehozott összes szonda egyetlen, fluoreszcensen jelölt primerpárral való felsokszorozását ugyanazon PCR reakcióban. Ligálás hiányában amplifikációs termék nem keletkezik, így ez az enzimátikus lépés a módszernek magas specificitást biztosít. A target specifikus és a primerkötő szakaszokon kívül minden egyes MLPA szonda tartalmaz egy egyedi hosszúságú toldalék szekvenciát is, ezáltal a különböző lokalizációjú teljes szondák amplifikálása során eltérő méretű termékek jönnek létre, melyek így méretszeparáció után azonosíthatók. A fragmenthossz analízis jellemzően kapilláris elektroforézis készülékben történik, a fluoreszcens detektálás során megjelenő szondaspecifikus csúcsok mérete pedig arányos a PCR termékek mennyiségével, így az adott genomikus szakaszok kópiaszáma közvetve kvantifikálható. Az MLPA vizsgálat fő lépéseit az 2. ábra foglalja össze.

A) Denaturáció és hibridizáció**B) Ligálás****C) Amplifikáció fluoreszcensen jelölt, univerzális primer párral****D) Fragmenszeparáció fluoreszcens kapillaris elektroforézissel****E) Kópiaszám meghatározás****2. ábra. A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció módszertani lépései.**

(A) A minta DNS és a szonda oligonukleotidok denaturációját utóbbiak specifikus célszekvenciákhoz való hibridizációja követi.

2. ábra folytatása.

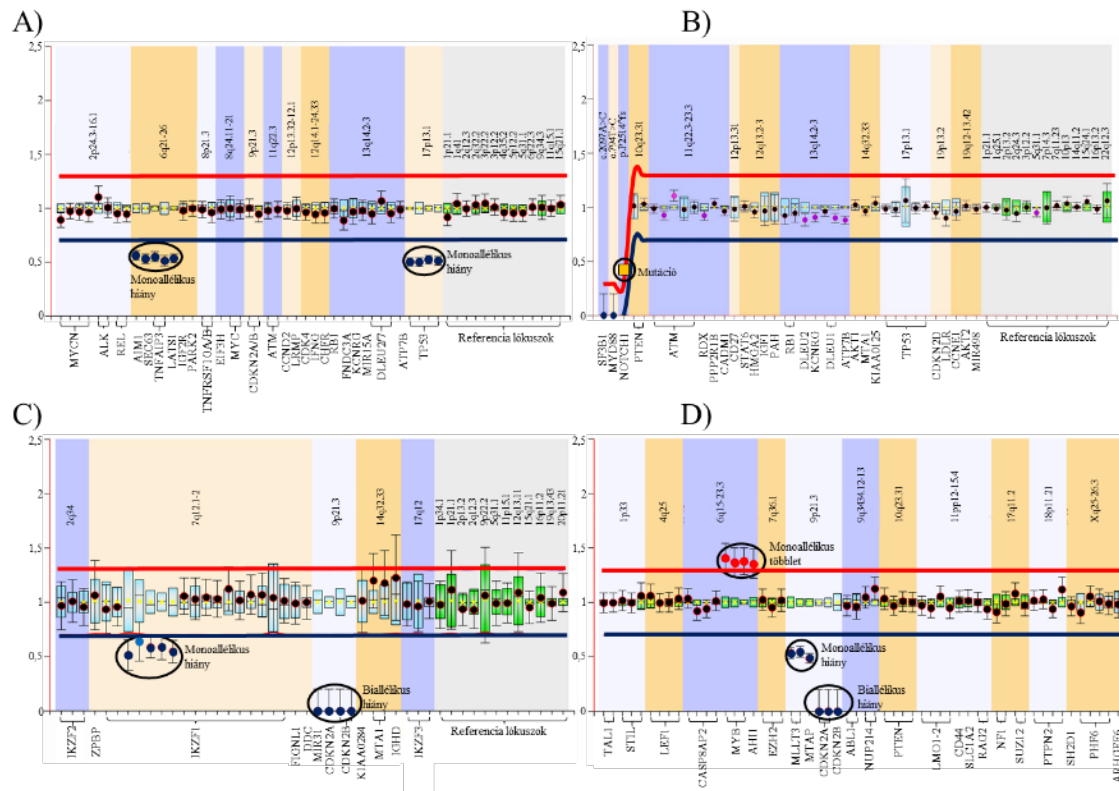
(B, C) A tökéletesen illeszkedő, szomszédos szondák ligálással való összekapcsolása után az adott reakciótérben lévő összes komplett szonda ugyanazon fluoreszcensen jelölt primer párral felsokszorozásra kerül. (D) A képződött PCR termékek eltérő hosszuk alapján fluoreszcens kapilláris elektroforézissel azonosíthatók, az egyes lókuszekhoz tartozó termékek mennyiségéből az adott genomikus pozíció relatív kópiaszáma meghatározható. (E) Normál kontroll mintákhoz képest a termék alacsonyabb mennyisége hiányra, míg magasabb mennyisége többletre, amplifikációra utal. Egy demonstratív CLL-es minta MLPA profilja mellett feltűntettük a párhuzamosan, validálás céljából végzett iFISH vizsgálat eredményét is, két eltérés vonatkozásában (12, 13).

A target régiókra specifikus szondákon kívül az MLPA keverékek általában 8-12 referencia szondát is tartalmaznak, melyek a vizsgálni kívánt entitásban jellemzően nem érintett, normál kópiaszámot mutató genomikus lókuszekhoz hibridizálódnak. A kapilláris elektroforézissel nyert nyers adatok értékelése két egymást követő lépést foglal magában: (i) a mintán belüli normalizáció során minden target szonda szignálját összevetjük az adott minta referencia szondáinak szignáljaival, majd (ii) az így kapott relatív értékekkel végzünk minták közötti normalizációt, melynek során minden egyes szonda vonatkozásában összehasonlítjuk a vizsgálandó mintában mért értéket az összes referencia mintában mért megfelelő értékekkel. Kópiaszám eltérést nem mutató betegminta target szonda profilja megegyezik a referencia minták profiljával, míg kópia hiánya, vagy többlet-amplifikáció esetén az érintett régióban a végső úgynevezett relatív kópiaszám szignifikánsan alacsonyabb, vagy magasabb értéket mutat. Malignus betegségekhez asszociáltan gyakran jelenik meg komplex genomikus eltérés jelentős számú aberráció együttes előfordulásával, ezért a tumoros mintákhoz használt szondakeverékek gyakran legalább 10 referencia szondát tartalmaznak, lehetőség szerint különböző kromoszómákon elosztva. Ugyanakkor olyan betegségek vizsgálatakor, melyeknél tipikusan kevés kópiaszám eltérés jelenik meg egyidejűleg, az MLPA keverék minden egyes szondáját érdemes visszatérő aberrációk lókuszaire tervezni, ugyanis ilyenkor az összes szonda egymással való összevetése megfelelő mintán belüli normalizációt biztosít. Az MLPA adatok hatékony feldolgozásához és értékeléséhez igénybe vehető a gyártó által fejlesztett ingyenesen elérhető *Coffalyser.net* szoftver

(MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia). A *Coffalyser.net* algoritmusát használva a referencia szondák legalább 60%-ának a normális referencia tartományon belül kell lennie az adott mintában ahhoz, hogy egy stabil normalizációs állandót lehessen meghatározni az értékeléshez.

Az eredmények értékelésénél a minta tumorsejt arányát is figyelembe kell vennünk. Hematológiai betegségek esetén gyakran áll rendelkezésre áramlási citometriás mérési eredmény, melyből a mintatisztaság megbecsülhető, a mono- és biallélikus hiányok, illetve többletek esetén várható szignál értékek kiszámolhatók. Ha csak szöveti metszet áll rendelkezésre, digitális képanalízissel kombinált morfológiai-immunhisztokémiai térképezés segítheti a pontos tumorsejt arány meghatározását. Amennyiben egy adott szonda relatív kópiaszám aránya 0,6, aszerint kell mono- vagy biallélikus hiánynak tekintenünk, hogy a meghatározott tumorsejt arány 80% vagy 40%, azonban előbbi esetben szubklonálisan megjelenő biallélikus eltérés sem kizárható.

A szonda oligonukleotid párok-tripletek egyesítését végző ligáz-65 enzim érzékeny a minta nukleotid szekvenciájának eltérései miatt a ligációs helyen bekövetkező inkomplett hibridizációra. Ez különösen igaz a ligációs helytől *upstream* irányban elhelyezkedő oligonukleotid 3' végére, melynek így egy adott mutációs *hotspot*-ra való tervezése lehetővé teszi specifikus pontmutációk kimutatását. A mutációspecifikus MLPA szondákkal egyetlen típusú nukleotid cserét lehet kimutatni (pl.: T>A szubsztitúció), így igazán hatékonyan akkor alkalmazhatóak, ha a vizsgált entitásban gyakran jelenik meg olyan visszatérő mutáció, mely diagnosztikus, prognosztikus vagy prediktív jelentőséggel bír. A 3. ábra négy különböző MLPA szondakeverék esetében mutatja be a vizsgálat eredményeinek értékelését.



3. ábra. DNS kópiaszám eltérések és mutáció kimutatása multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval.

A. Monoallélikus 6q és 17p hiányok CLL-ben szenvedő beteg perifériás vérmintájában (SALSA P037 szonda keverék). **B.** *NOTCH1* p.2514*fs frameshift mutáció kimutatása krónikus limfocitás leukémiában szenvedő beteg perifériás vérmintájában, (SALSA P038 szonda keverék). A megfelelő szonda ligálása és amplifikációja csak a CLL-es betegek 5%-ában mutatkozik és kedvezőtlen prognózissal társuló mutáció jelenlétében megy végbe. **C.** Monoallélikus *IKZF1* hiány, illetve biállélikus 9p hiány gyermekkori prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedő beteg diagnosztikus csontvelő mintájában (SALSA P202 szonda keverék). **D.** *MYB* gén többlet, valamint mono- és biállélikus 9p hiány gyermekkori prekursor T-sejtes ALL-ben szenvedő beteg diagnosztikus csontvelő mintájában (SALSA P383 szonda keverék) (12).

1.2.2. Metiláció szenzitív MLPA

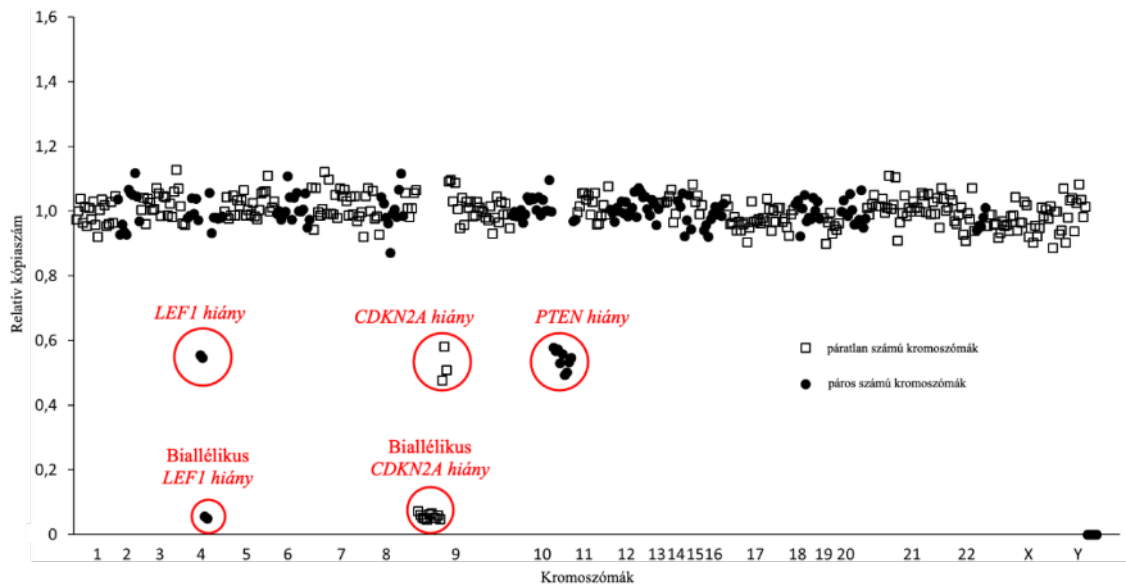
A szubkromoszómális DNS-kópiaszám változások és pontmutációk detektálása mellett a konvencionális MLPA egyik változata, a metilációszenzitív MLPA (MS-MLPA) alkalmas az egyes genomikus lókuszok metilációs státuszának vizsgálatára is, melyhez a konvencionális MLPA protokolljában csak minimális változtatásra van szükség (14, 15). A metilált DNS-szakaszok azonosítása az úgynevezett HhaI restrikciós endonukleáz enzim használatával történik. Az eljárás során a szonda oligonukleotidok hibridizációját követően kettéválasztjuk a mintát tartalmazó reakcióelegyet, majd az egyikben a ligációt a HhaI endonukleáz jelenlétében, a másikat viszont anélkül végezzük el. Az enzim a DNS mintában a GCGC szekvenciákat felismeri, majd elhasítja a mintaszonda hibridet, amennyiben az nem metilált, míg metilált DNS esetében az enzim nem végzi el a hasítást, a szonda intakt marad, így róla a későbbi PCR reakció során termék amplifikálódik. Az endonukleázzal kezelt minta relatív kópiaszámait a HhaI enzimet nem tartalmazó elegyben kapott relatív kópiaszámokkal összevetve állapíthatjuk meg az egyes genomikus lókuszok metilációs státuszát, amely hasznos információt szolgáltat a régióban elhelyezkedő gének expressziós aktivitásáról (16).

1.2.3. Digitális MLPA

A dMLPA ugyanazon alapelvek szerint működik, mint a konvencionális MLPA, azzal a különbséggel, hogy a laborprotokoll során a PCR termékekhez speciális adaptereket kapcsolunk, melyek lehetővé teszik ezen termékek Illumina NGS készülékeken való szekvenálását. A szekvenálást követően a vizsgált lókusz relatív kópiaszámát az egyes ampikonok relatív olvasat (*read*) számaiból határozzuk meg. A dMLPA jelentős előnye a konvencionális MLPA-hoz képest az egy nagyságrenddel nagyobb szondaszámban keresendő, mely lehetővé teszi több száz lókusz egyidejű vizsgálatát. Egy reprezentatív betegminta dMLPA analízise során nyert eredmények értékelését a 4. ábra demonstrálja.

A dMLPA protokoll első lépése a minta DNS egyedi *barcode*-okkal való összekeverése, melyet a minta denaturációja és a dMLPA szondák, majd a dMLPA puffer hozzáadása követ. Minden dMLPA szonda 2 vagy 3, 25-50 bp hosszú oligonukleotidból áll, melyek egy adott lókuszhoz egymással szomszédosan hibridizálódnak, így, amennyiben tökéletesen hibridizálódnak, a ligase-65 enzim által egyetlen molekulává ligálódnak. Ezt követően minden ligált szondát amplifikálunk Illumina szekvenálási

platformmal kompatibilis univerzális primer párral. Az amplifikációt követően mintaspecifikus termékeket összekeverjük („*poolozzuk*”), hígítjuk, denaturáljuk, és Illumina MiSeq Standard v3 flow cell-be töltjük, melyet egyirányú szekvenálás követ 115bp hosszan.



4. ábra. Demonstratív dMLPA eredmény

Prekursor T-sejtes ALL-ben szenvedő beteg diagnosztikus csontvelő mintájában a D007 sonda keverék több mint 600 szondával mono- és biallélikus hiányokat detektált a *LEF1* és *CDKN2A* génekben, valamint monoallélikus hiányt a *PTEN* génben (12).

A szekvenálás után az NGS készülékről exportált FASTQ file-ok minőségellenőrzését követően az egyes *read*-ek dMLPA szondákhoz való hozzárendelése, és további adatelemzés következik az MRC-Holland erre a célra fejlesztett belső szoftverével (11), mely a konvencionális MLPA értékeléséhez hasonlóan egy mintán belüli, és egy minták közti normalizációs lépésből áll. Az adatfeldolgozás során minden dMLPA sonda vonatkozásában meghatározunk egy normális relatív kópiaszám arányt (átlag ± 3 standard deviáció), a negatív kontroll mintákban mért értékek alapján. A betegmintákban csupán azokat a relatív kópiaszám arányokat tekintjük többletnek vagy hiánynak, melyeknél a mért relatív kópiaszám arány a meghatározott normál tartományon kívülre esik. Az egyes kópiaszám eltérések akkor tekinthetjük

szubklonálisnak, ha egymást követő több szonda relatív kópiaszám aránya is egyértelműen kívülre esik a normál tartományon, de nem éri el a tumorsejtarányból számított monoallélikus eltéréstől várt értéket összehasonlítva az ugyanazon mintában érintett többi lókusszal. Az ennél részletesebb általános laboratóriumi és bioinformatikai protokollt a dMLPA-t először alkalmazó tanulmányban publikálták, melynek eredményei jól példázzák a módszerben rejlő lehetőségeket. Az említett vizsgálatban ALL-es betegektől származó sejtvonalakat és 65 betegmintát vizsgáltak, a módszer analitikai pontosságának felmérése során 99%-os diagnosztikus szenzitivitást és 98%-os specificitást meghatározva, referenciaként pedig konvencionális CNA vizsgálatokat alkalmazva (11).

1.2.4. Az MLPA és dMLPA előnyei és limitációi

A MLPA alapú módszerek előnyei az alábbiakban foglalhatók össze: (i) DNS alapú módszerek, melyek ezáltal alkalmasak hosszú ideig archivált szövetminták retrospektív vizsgálatára is; (ii) nem igényelnek intakt sejteket/sejtmagokat kiindulási mintaként; (iii) 20-150ng DNS elegendő a reakciók elvégzéséhez; (iv) mivel a szondák célponthoz hibridizáló szakasza meglehetősen rövid (55-80bp közötti), a módszerek exon-szintű genomikus feloldást biztosítanak; (v) a reakciók fragmentált DNS mintán is elvégezhetők, lehetővé téve formalin fixált, paraffinba ágyazott anyagok vizsgálatát, mely a patológiai diagnosztikában kiemelt jelentőségű (17); (vi) a módszerek 24 órán belül eredményt szolgáltatnak, illetve viszonylag könnyen automatizálhatók és skálázhatók; (vii) költséghatékonyak, amit az is segít, hogy a konvencionális MLPA egy PCR készüléken, illetve kapilláris elektroforézis készüléken kívül nem igényel speciális műszerezettséget, és a dMLPA alkalmazásához szükséges Illumina NGS készülékek is egyre inkább elterjedtek; (viii) az eredmények értékelése ingyenesen elérhető szoftverrel elvégezhető, mely segíti a dokumentációt is; (ix) kópiaszám eltérések, metiláltsági státuszok, valamint mutációk egyidejűleg vizsgálhatók; végül, (x) az elérhető szonda keverékek összetétele rugalmasan változtatható, amennyiben új, klinikailag releváns aberrációk kerülnek azonosításra.

A fentebb említett előnyök mellett az MLPA alapú módszerek onkohematológiai diagnosztikában és kutatásban való alkalmazásakor limitációkkal is kell számolni, úgymint (i) a módszerekkel nem lehet kópiaszám eltéréssel nem járó citogenetikai aberrációkat kimutatni, mint például kiegyensúlyozott transzlokációkat és inverziókat,

ezenkívül komplex eltérések (pl.: kromotripszis) vizsgálata is túl nagy kihívást jelenthet; (ii) a technikák relatív kópiaszám eltéréseket mutatnak ki, így poliploidia vagy haploidia félrevezetheti az eredmények értelmezését; (iii) a klonális, egyetlen kópia eltérést okozó aberrációknak a szubklonális, többszörös kópiaszám eltéréshez vezető lézióktól való elkülönítése nehézségekbe ütközhet; (iv) az MLPA alapú módszerek érzékenyek az alacsony tumorsejt arányra, így a klonális monoallélikus deléciók detektálásához legalább 20-30%, biallélikus hiányok azonosításához 10-20% tumorsejt jelenléte szükséges, ezért bizonyos esetekben a minták mágneses antitestekkel való dúsítása válhat szükségessé, mely sok laboratóriumban jelenleg rutinszerűen még nem alkalmazott módszer; (v) egyedi sejtek vizsgálatát nem teszik lehetővé, mely azonban hasznos lehetne a számos betegségben bizonyítottan jelenlévő, komplex szubklonális szerkezet felderítéséhez; (vi) egyes szondáknál mutatkozó, relatív kópiaszám eltérésre utaló szignálok háttérben álpozitivitás is állhat, amennyiben pontmutáció jelenik meg a ligálási hely közelében; (vii) MLPA alapú módszerekkel bár a genom bármely régiójából nyerhetünk információkat a kópiaszám eltérésekről, a vizsgálat fókuszált jellegéből adódóan ezen eredmények a szondák által lefedett, konvencionális MLPA esetében körülbelül 50, dMLPA esetében 500-1000 genomikus lókuszt korlátozódnak; (viii) ismeretlen pontmutációk kimutatása nem lehetséges, valamint a szondák által lefedett pozíciókban is csak specifikus nukleotidcserék detektálhatók; (ix) közeli genomikus pozíciókban megjelenő pontmutációk kimutatása technikailag megoldhatatlan/alacsony hatékonyságú lehet a szonda oligonukleotidok egymással való szükségszerű hibridizációs versengése miatt; (x) metiláció kimutatása csak olyan lókuszekben lehetséges, melyek a HhaI restriktív enzim felismerő helyeinél jelentkeznek.

Az MLPA és dMLPA vizsgálatok optimális elvégzéséhez további technikai szempontokat is figyelembe kell venni. Az adatok normalizálásának fontos lépése a betegminta referencia mintákhoz való hasonlítása, mely leghatékonyabban akkor valósítható meg, ha a kétféle minta ugyanazon szövettípusból származik, minél inkább hasonló feldolgozáson megy keresztül, valamint hasonló ideig és módon kerül tárolásra.

A DNS izolálási és tárolási módjának komoly hatása lehet a reakció sikerességére. A minta magas NaCl vagy KCl koncentrációja gátolhatja a tökéletes denaturációt, különösen a CpG gazdag pozíciókban. Magas sókoncentráció esetén ismételt DNS tisztítás, míg heparin szennyezés esetén - mely szintén kedvezőtlen hatással van az MLPA

reakcióra - heparináz kezelés segíthet. A mintát tartalmazó oldat alacsony pufferkapacitása zajos MLPA profilhoz vezethet, ezért ilyen esetben, például nukleáz mentes vízben tárolt mintáknál, a reakció elvégzése előtt érdemes Tris-HCl-t adni a mintához.

A konvencionális MLPA módszer érzékenysége CNA-k tekintetében körülbelül 10-20%. Az egyik allélt érintő pontmutációk már 5-10%-os reprezentáltság esetén is kimutathatók, míg metilált genomikus pozíciók azonosításához a metilált DNS minimum 30%-os jelenléte szükséges.

Az eredmények helyes értelmezéséhez figyelembe kell venni az álpozitivitás lehetőségét mind deléció, mind többlet-amplifikáció vizsgálatakor. Az előbbi esetet ligációs helyek közelében elhelyezkedő nukleotid polimorfizmusok idézik leggyakrabban elő, míg utóbbihoz jellemzően PCR termék általi szennyeződés köthető. Ezen hibák kiküszöbölésének érdekében egyetlen szonda által jelzett kópiaszám eltéréseket mindenképpen ajánlott független módszerrel megerősíteni.

Az említett tényezők által okozott problémák enyhítését segíti (i) a referencia szondák, valamint a vizsgálandó régiókhoz kapcsolódó szondák gondos tervezése, (ii) a referencia minták helyes megválasztása, (iii) optimalizált DNS izolálási protokoll alkalmazása, (iv) a minta tumorsejt arányának pontos ismerete, valamint (v) az MLPA reakcióelegyhez adott úgynevezett Q-fragmentumok (belső kontroll), melyek MLPA profilban való kifejezett megjelenése elégtelen ligációra, vagy kiindulási anyagmennyiségre utal.

1.3. Az MLPA alkalmazása leukémiák és limfómák vizsgálatához

A nemzetközi irodalomban számos közlemény számol be a konvencionális MLPA onkohematológiai kórképekben való alkalmazásáról, bizonyítva a technika alkalmasságát malignus vérképzőrendszeri betegségek genetikai vizsgálatára (*1. táblázat*). Az alábbiakban néhány általunk is vizsgált malignus hematológiai betegség példáján keresztül mutatjuk be a módszerben rejlő, máig publikált lehetőségeket.

1. táblázat. Publikációk MLPA alkalmazásáról malignus onkohematológiai kórképekben

Betegség	Betegek száma	Szonda keverék	Referencia
ALL	43	P335	Schwab és mtsai. (2010) (18)
ALL	43	P335	Ensor és mtsai. (2011) (19)
ALL	94	P335	Rand és mtsai. (2011) (20)
ALL	60	P335	Simons és mtsai. (2011) (21)
ALL, CML	88	P202/P335	Alpar és mtsai. (2012) (22)
ALL	119	P202/P335	Buitenkamp és mtsai. (2012) (23)
ALL	34	P335	Marks és mtsai. (2012) (24)
ALL	304	P335	Moorman és mtsai. (2012) (25)
ALL	33	P335	Palmi és mtsai. (2012) (26)
ALL	831	P335/egyedi	Waanders és mtsai. (2012) (27)
ALL	572	P202/P335	Caye és mtsai. (2013) (28)
ALL	694	P202/P335	Dorge és mtsai. (2013) (29)
ALL	67	P335	Dupuis és mtsai. (2013) (30)
ALL	1502	P047/P335	Harrison és mtsai. (2013) (31)
ALL	204	P335	Krentz és mtsai. (2013) (32)
ALL	356	P202/P335	Meyer és mtsai. (2013) (33)
ALL	120	P202/P335	Öfverholm és mtsai. (2013) (34)
ALL	410	P202/P335	Palmi és mtsai. (2013) (35)
ALL	1427	P047/P202/P335	Schwab és mtsai. (2013) (36)
ALL	177	P335	Yamashita és mtsai. (2013) (37)
ALL	1128	P202/P335	van der Veer és mtsai. (2013) (38)
ALL	75	P335	Asai és mtsai. (2014) (39)
ALL	897	P327/P335	Clappier és mtsai. (2014) (40)
ALL	206	P007/P095/P327	Irving és mtsai. (2014) (41)
ALL, AML, CML, CLL, AL, MDS	313	P327/P377	Konialis és mtsai. (2014) (42)
ALL	1644	P335	Moorman és mtsai. (2014) (43)
ALL	1	P377	Othman és mtsai. (2014) (44)
ALL/LBL	47	egyedi	Rohde és mtsai. (2014) (45)
ALL	167	P335	Yano és mtsai. (2014) (46)
ALL	191	P202/P335	Van der Veer és mtsai. (2014) (47)
ALL	174	P335	Walsh és mtsai. (2014) (48)
ALL	274	P335	Barbosa és mtsai. (2015) (49)
ALL	127	P202	Boer és mtsai. (2015) (50)
ALL	1223	P202/P327/P335	Clappier és mtsai. (2015) (51)
ALL	368	P327	Fuka és mtsai. (2015) (52)
ALL	81	P202/P335	Janczar és mtsai. (2015) (53)
ALL	118	P202	Kim és mtsai. (2015) (54)
ALL	1	P377	Othman és mtsai. (2015) (55)
ALL	34	P377	Othman és mtsai. (2015) (56)
ALL	1	P377	Othman és mtsai. (2015) (57)

1. táblázat folytatása.

Betegség	Betegek száma	Szonda keverék	Referencia
ALL	109	P335	Van der Sligte (2015) (58)
ALL	104	P202/P335	Gupta és mtsai. (2016) (59)
ALL	332	P335	Imamura és mtsai. (2016) (60)
ALL	92	P202/P335/egyedi	Lopes és mtsai. (2016) (61)
ALL	3	P327	Kim és mtsai. (2016) (62)
ALL	13	P383	Kunz és mtsai. (2016) (63)
ALL, AML	80	egyedi	Marcinkowska-Swojak és mtsai.(2016) (64)
ALL	11	P335	Schwab és mtsai. (2016) (65)
ALL	146	P202	Yao és mtsai. (2016)(66)
ALL	101	P335	Bhandari és mtsai. (2017) (67)
ALL	641	P202/P335/ME024	Braun és mtsai. (2017) (68)
ALL	166	P202/P335	Gupta és mtsai. (2017) (69)
ALL	161	P335	Katerndahl és mtsai. (2017) (70)
ALL, AML	53	P181	Reyes-Núñez és mtsai. (2017) (71)
ALL	31	P202/P335	Ribera és mtsai. (2017) (72)
ALL	182	P383/egyedi	Richter-Pechanska és mtsai. (2017) (73)
ALL	42	P036	Vázquez-Reyes és mtsai. (2017) (74)
CLL	25	egyedi	Mackus és mtsai. (2005) (75)
CLL	54	P006	Buijs és mtsai. (2006) (76)
CLL	15	P037/P038/R011	Santidrián és mtsai. (2007) (77)
CLL	50	P037/P038	Coll-Mulet és mtsai. (2008) (78)
CLL	15	P037/P038	Hanlon és mtsai. (2009) (79)
CLL	88	P037/P038	Stevens-Kroef és mtsai. (2009) (80)
CLL	31	egyedi	Mous és mtsai. (2009) (81)
CLL	61	P037/P038	Al Zaabi és mtsai. (2010) (82)
CLL	100	P038	Abdool és mtsai. (2010) (83)
CLL/SLL	120	P037/P038	Groenen és mtsai. (2011) (84)
CLL	100	P037/P038	Fabris és mtsai. (2011) (85)
CLL	77	P037/P038	Véronèse és mtsai. (2013) (86)
CLL	85	P377	Alhourani és mtsai. (2014) (87)
CLL	97	R016	te Raa és mtsai. (2015) (88)
CLL	55	P037	Rendeiro és mtsai. (2016) (89)
CML	80	P335	Van der Sligte (2014) (90)
CML	47	P128	Lavrov és mtsai. (2017) (91)

1. táblázat folytatása.

Betegség	Betegek száma	Szonda keverék	Referencia
DLBCL, FL, MCL, MALT, SLL	526	P190	Havranek és mtsai. (2015) (92)
MDS/AML	56	P145	Donahue és mtsai. (2011) (93)
MCL	134	P038	Delfau-Larue és mtsai. (2015) (94)
MM	81	P425	Alpar és mtsai. (2013) (95)
MM	86	P425	Boyle és mtsai. (2015) (96)
MM	64	P425	Zang és mtsai. (2015) (97)

AL = akut leukémia; ALL = akut limfoblasztos leukémia; AML = akut mieloid leukémia; CLL = krónikus limfocitás leukémia; CML = krónikus mieloid leukémia; DLBCL = diffúz nagy B-sejtes limfóma; FL = folliculáris limfóma; LBL = limfoblasztos limfóma; MALT = mukóza asszociált limfoid szövet; MCL = köpenysejtes limfóma; MDS = mielodiszpláziás szindróma; MM = mielóma multiplex; SLL = kis limfocitás limfóma

1.3.1. CLL

A krónikus limfocitás leukémia (CLL) a leggyakoribb felnőttkori malignus hematológiai betegség a fejlett országokban, 100.000 lakosonként évente átlagosan 5,8 újonnan diagnosztizált férfi, valamint 3,0 újonnan diagnosztizált női beteggel (98, 99). A CLL prognózisa és klinikai lefolyása rendkívül változatos, egyes betegek évekig-évtizedekig stabilak maradnak akár kezelés nélkül is, míg másoknál rövid időn belül progrediál a betegség, a diagnózis felállítása után azonnali terápiás beavatkozást igényelve. A betegek különböző prognosztikai csoportokba való besorolása mellett fontos az adott klinikai helyzetben prediktívnek számító markerek alapos vizsgálata is a kezelés megkezdése előtt, mint például a *TP53* gént érintő defektusok szűrése ibrutinib kezelést megelőzően (100).

A betegek prognosztikai csoportokba sorolásához, illetve az optimális kezelés megválasztásához a CLL sejtek konvencionális- és molekuláris citogenetikai vizsgálatai hasznos információt szolgáltathatnak, ugyanis a CLL-es betegek mintegy 85%-ában található valamilyen citogenetikai eltérés (101). A leggyakrabban előforduló kópiaszám eltérések a jó prognózissal társuló izolált 13q hiány (esetek 50-60%-ában), az intermedier prognózissal járó 12-es triszómia (+12; 12-25%), illetve a rossz prognózist meghatározó 11q hiány (*ATM* gén, gyakoriság: 10-20%) és 17p hiány (*TP53* gén, gyakoriság: 5-10%) (101). Ezeknek az eltéréseknek a kezelés előtti vizsgálata a legújabb nemzetközi ajánlás szerint minden esetben elvégzendő (100). Az egyedi eltérések mellett klinikai

jelentőséggel bír az egyes aberrációk együttes előfordulása is. Komplex kariotípus (CK) esetén a betegben 3, vagy annál több kromoszómaaberráció detektálható, mely tipikusan rövidebb diagnózis és első kezelés között eltelt idővel (TTFT), illetve teljes túléléssel társul (OS). Ezen felül a CK előre jelezheti a betegek kezelésre adott kedvezőtlen válaszát, még az új célzott terápiák mellett is [11-12], ezért napjainkban továbbra is változatlanul fontos a betegség genetikai hátterének átfogó diagnosztikai vizsgálata. Számos malignus hematológiai kórképpel szemben CLL-ben a kiegyensúlyozott kromoszóma eltérések, mint a kromoszóma transzlokációk, viszonylag ritkák, esetleges jelenlétük kedvezőtlen prognózissal társul (102).

Az egyik legkorábbi, 2006-ban megjelent onkohematológiai MLPA közlemény Buijs és mtsai. nevéhez fűződik, akik 54 CLL-ben szenvedő beteget vizsgálva azonosítottak ismert visszatérő kópiaszám eltéréseket, valamint további, iFISH által nem detektált deléciókat, illetve számbeli kromoszóma eltéréseket (76). Ezt követően számos egyéb munkacsoport is alkalmazta a módszert CLL vizsgálatához, leginkább a prognosztikai jelentőséggel bíró *TP53*, *ATM* és 13q hiányok, valamint a 12-es triszómia kimutatásának céljából (78, 85, 84, 80). Az MLPA költséghatékonyságát, magas áteresztőképességét és mérsékelt munkaerő ráfordítási igényét több esetben is megerősítették (82, 78). Az összehasonlító módszertani vizsgálatok nagymértékű egyezést fedtek fel az MLPA, valamint az iFISH és „microarray” alapú technikákkal nyert eredmények között. A néhány, összhangban nem álló adat hátterében az aberráció alacsony reprezentáltsága, illetve a különféle módszerek által nyújtott eltérő genomikus feloldás és lefedettség állt (82, 78, 80, 86). Emellett egy Véronèse és mtsai. által közölt tanulmány felhívta a figyelmet a pontmutációk által okozott álpozitív, látszólag kópiaszám hiányra utaló MLPA eredményekre, ezáltal a validálás fontosságára. Megjegyzendő azonban, hogy esetükben a probléma a *TP53* gén vizsgálata kapcsán mutatkozott, melynek hiánya és gyakran patogén mutációja egyaránt prognosztikailag kedvezőtlen eltérésnek tekinthető a CLL lefolyása szempontjából (103, 86). A *TP53*, illetve az *ATM* gének státuszának felmérése az elmúlt években különösen relevánsná vált CLL-es betegekben, mivel ezeknek a géneknek a hibái kemorezisztenciával szorosan összefüggenek, aberrációik kimutatása esetén pedig célzott terápia is elérhető (104, 105). A *TP53* és *ATM*, valamint a velük funkcionális kapcsolatban lévő, DNS károsodásra adott válaszban szerepet játszó gének RNS alapú vizsgálatához Eldering és munkacsoportja

reverz transzkripciót követően használt MLPA-t (75, 81, 88). A módszer ezen alternatív alkalmazásával el tudtak különíteni funkcionális TP53 defektust hordozó betegeket ATM defektussal bíróktól, valamint további, az előző kettőre nézve normális, de DNS károsodásra adott válasz szempontjából más okból funkcionális szinten abnormalitást mutató betegeket is azonosítani tudtak.

1.3.2. Myeloma multiplex

A myeloma multiplex (MM) egy malignus plazma B-sejtek proliferációjával járó csontvelői betegség, melyre kuratív kezelés jelenleg nem áll rendelkezésre (106, 6). Az MM-re rendkívül változatos genetikai háttér jellemző, melynek részletes vizsgálata már számos iFISH, SNP-array és NGS alapú tanulmány tárgyát képezte, melyek feltérképezték a betegségre jellemző kiegyensúlyozott transzlokációkat, valamint kiegyensúlyozatlan DNS aberrációkat és pontmutációkat (107-115). Ezen vizsgálatok által azonosított CNA-k jelenléte és kombinációi prognosztikus értékkel bírnak, így analízisük klinikai szempontból is kívánatos (116, 108, 117). A legjelentősebb kedvezőtlen kórlefolyással társuló eltérések az *IGH* gén egyes kiegyensúlyozott transzlokációi, mint a t(4;14)(p16;32) (*IGH-FGFR3/MMSET*) és a t(14;16)(q32;q23) (*IGH/MAF*), azonban kiegyensúlyozatlan eltérések, mint a *TP53*-gén hiánya, a 13-as kromoszóma monoszómiája vagy deléciója ($\Delta 13$), vagy az 1-es kromoszóma strukturális eltérései is kedvezőtlenül befolyásolják a betegek túlélését.

Az MM prognosztikai és prediktív jelentőséggel bíró kiegyensúlyozatlan aberrációinak első konvencionális MLPA-val történő vizsgálata során a módszer a betegek 65%-ában azonosított olyan eltéréseket, melyeket a standard iFISH tesztek nem mutattak ki (95). Mivel azonban az MLPA nem képes kiegyensúlyozott genetikai abnormalitásokat detektálni, így az *IGH* gén MM-ben kiemelt jelentőségű transzlokációit sem, ezért iFISH-sel együtt való alkalmazása ebben az esetben kifejezetten indokolt. Későbbiekben a konvencionális MLPA hatékonyságát MM vizsgálatához más munkacsoportok is megerősítették (96).

1.3.3. ALL

Az akut limfoblasztos leukémia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori daganatos megbetegedés, melyre szintén igen változatos genetikai háttér, és ehhez asszociáltan heterogén klinikai lefolyás jellemző (118). Mind a B-, mint a T-sejtes ALL kialakulásában és progressziójában kromoszóma transzlokációk, teljes kromoszómákat és szubkromoszómális régiókat érintő CNA-k, valamint egyéb addicionális genetikai eltérések, mint aneuploidia illetve pontmutációk vesznek részt (119-122). Számbeli kromoszóma eltérések leggyakrabban magas hiperdiploiditású (HD) (≥ 51 kromoszóma) betegekben fordulna elő, és leginkább az X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 és 21-es kromoszómákat érintik (123, 124). A szubkromoszómális eltérések gyakran a sejtciklus szabályozásban, tumor szupresszióban és a limfoid sejtek fejlődésében és differenciációjában kulcsszerepet játszó géneket érintik (121, 122). Ezen eltérések a betegség klinikai kimenetelével is összefüggést mutatnak, mely az elmúlt időben bevezetett CNA-alapú rizikó stratifikációs rendszerek (*IKZFI*^{plus} and UKALL-CNA) alapját képezte (125, 43, 126). Habár az ALL-ben szenvedő egyes betegek korábbi array és NGS vizsgálatok alapján limitált számú CNA-t hordoznak (127, 121), a betegség klinikai lefolyása szempontjából releváns eltérések átfogó, de mégis költséghatékony vizsgálata célzottan multiplex megközelítést kíván a vizsgálandó eltérések széles repertoárja miatt. Továbbá az ezen betegségben megjelenő szubkromoszómális eltérések igen változatosak, és gyakorta csak rövid DNS szakaszokat érintenek, így ezen CNA-k detektálása konvencionális G-sávós kariotipizálással, iFISH vizsgálattal, vagy ún. „*off the shelf*” array alapú módszerekkel nagy kihívást jelenthet (128).

Az MLPA-hoz köthető legintenzívebb publikációs aktivitás ebben a betegségben tapasztalható. Először 2010-ben, Schwab és mtsai. alkalmazták a módszert prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedő betegek mintáin, melynek során a betegségben visszatérően megjelenő, B-sejt fejlődésben, limfoid differenciálódásban, sejtciklus szabályozásban szerepet játszó, prognosztikai és terápiás relevanciával bíró gének kópiaszám eltéréseit vizsgálták [26]. MLPA-val többek között azonosítottak iFISH-sel nem detektálható, kis kiterjedésű deléciókat is, melyeket kvantitatív PCR-rel sikeresen validáltak. A módszer hatékonyságát demonstráló tanulmányukban felhívták a figyelmet ugyanakkor arra is, hogy haploid, illetve tetraploid esetekben az MLPA profil nem feltétlenül mutat

abnormális mintázatot, amennyiben a mintában relatív kópiaszám eltérés nem mutatkozik. Az MLPA hozzáadott értékét ugyanakkor egyértelműen jelzi, hogy ezt követően több száz, esetenként ezer feletti beteget is felölelő klinikai vizsgálatok keretében alkalmazták sikerrel a technikát (1. táblázat). A tanulmányok nagy részében az *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RBI*, *BTG1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *RUNX1*, *ERG* és a *PARI* régió génjeinek eltéréseit vizsgálták prekursor B-sejtes ALL-ben. Ezek közül is kiemelkedik az *IKZF1* (Ikaros) gén deléciójának, illetve a 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja (iAMP21) következtében felsokszorozódó *RUNX1* és *ERG* gén eltéréseinek intenzív vizsgálata. Az *IKZF1* hiány független prognosztikai marker, kedvezőtlen betegség lefolyással társul, gyakran fordul elő a *BCR-ABL1* pozitív, illetve a génfüziót nem hordozó, de hasonló génexpressziós mintázatot mutató *BCR-ABL1*-like szubtypusokban (129, 38). Az iAMP21 a gyermekkori B-ALL esetek 2%-ában megjelenő prediktív jelentőségű aberráció, mely eltérést hordozó betegek standard kezelésre rosszul reagálnak, a terápia intenzitásának emelésével azonban kedvezőbb válasz érhető el (31).

Mivel az MLPA nem szolgáltat egyedi sejt szintű információt az egyes eltérések eloszlásáról, az ALL néhány szubtypusára kifejezetten jellemző komplex szubklonális szerkezet feltérképezésére nem tűnik optimális eszköznek. Ugyanakkor diagnózis és relapszus idején vett mintákat összehasonlítva, az aberrációk által érintett lókuszek kiterjedésének több szondával való vizsgálata lehetővé teheti a két eltérő időpontban domináns malignus sejtpopuláció klonális viszonyának felderítését, ezáltal a szubklonális evolúciós folyamatokba való informatív betekintést. Alpár és mtsai. az *IKZF1*, míg Waanders és mtsai. a *BTG1* gént érintő abnormalitásokat vizsgálva mutattak ki olyan deléciós mintázatokat, melyek a relapszuskor megjelenő szubklonális diagnosztikus mintában domináns populációtól való független fejlődésére utaltak (22, 27).

Kópiaszám eltérések mellett Braun és mtsai. a *CDKN2A* és *CDKN2B* gének promóter régióiban elhelyezkedő CpG pozíciók metiláltsági státuszát is vizsgálták MS-MLPA-val, gyermekkori prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedő betegekben [32]. Az eljárás lehetővé tette a *CDKN2A/B* gének inaktivációjához vezető genetikai és epigenetikai változások egyidejű felderítését. Eredményeik alapján a *CDKN2A* gén biállélikus deléciója kedvezőtlen terápiás válasszal és megnövekedett relapszus kockázattal társul, ugyanakkor tanulmányukban az eltérő inaktivációs módok (deléció és metiláció) együttes megjelenése nem volt jelentős hatással a betegek prognózisára.

Rohde és mtsai. prognosztikailag releváns, heterozigótaság hiányához vezető 6q kromoszóma kar hiányt vizsgáltak MLPA-val prekursor T-sejtes ALL-ben, illetve limfoblasztos limfómában (LBL) szenvedő betegekben. Konvencionális mikroszatellita vizsgálattal összehasonlítva, a konvencionális MLPA megfelelő minta mennyiség és minőség mellett költséghatékonyabbnak, valamint kevésbé időigényesnek bizonyult, valamint csírvonal kontroll nélkül szolgáltatott informatív eredményt (45). Richter-Pechanska és mtsai. prekursor T-sejtes ALL-ben szenvedő betegek diagnózis és relapszus idején vett mintáit vizsgálták és a célzott NGS-sel detektált kópiaszám eltéréseket 182 betegben validálták MLPA-val, 99%-os egyezést találva a két módszer között olyan eltérések alapján, melyek kimutatására elvileg mindkét technika alkalmas volt (73). Kunz és mtsai. ugyanebben az entitásban vizsgálták a relapszushoz vezető klonális evolúció hátterét. A *CDKN2A/B*, *LEF1*, *PTEN*, *PTPN2*, *SUZ12*, és *CASP8AP2* gének delécióinak, valamint a *MYB* gén amplifikációjának megjelenése alapján azonosítottak mindkét időpontban megjelenő aberrációkat, valamint olyanokat is, melyek csak diagnózis vagy relapszus idején mutatkoztak az egyes betegekben (63).

A szubkromoszómális kópiaszám eltérésekre fókuszáló tanulmányok mellett aneuploidiák/aneuszómiák MLPA-val való kimutatásának lehetőségét is demonstrálták akut leukémiás esetekben, centromer közeli, vagy szubtelomerikus kromoszóma régiókhoz hibridizáló MLPA szondákat használva (71, 74). DNS index meghatározással együtt alkalmazva, az MLPA hatékony kiegészítő módszernek bizonyult, különösen pszeudodiploid esetekben, valamint amikor néhány, főleg kisméretű kromoszóma többlete vagy hiánya állt az aneuploiditás hátterében. Ezek a Reyes-Núñez és mtsai. által közölt eredmények összhangban állnak korábbi hazai tanulmányokkal, melyek szintén felhívták a figyelmet az aneuploidia hátterében álló specifikus aneuszómiák felderítésének fontosságára (130, 131).

A dMLPA módszert először Benard-Slagter és mtsai. alkalmazták gyermekkori B- és T-sejtes ALL-ben (11). Tanulmányukban 67 ALL-ben szenvedő beteg mintáját vizsgálták dMLPA D007 szondakeveréssel. Eredményeiket konvencionális MLPA-val, array CGH-el és/vagy SNP-array-el szerzett adatokkal összevetve 98,9%-os szenzitivitást és 97,8%-os specificitást állapítottak meg. A dMLPA módszer megbízhatóan működött a teljes kromoszómákat érintő hiányok és többletek (HD eseteket is beleértve), teljes gén hiányok és többletek, a *iAMP21*, kópiaszám eltéréssel járó intrakromoszómális fúziós

gének és génen belüli hiányok kimutatásában. A módszer szubklonális eltérések azonosításában is megbízható volt, amennyiben az eltérés a daganatos sejtek legalább 20-30%-ában jelen volt.

Ezen eredményeket tovább kiegészítve Thakral és mtsai. 151 B- és T-sejtes ALL-ben szenvedő beteg mintáinak kópiaszám eltéréseit vizsgálták dMLPA-val (132). Munkájuk során a minták 89%-ában azonosítottak CNA-t. Az esetek 66%-ában legalább 3 kópiaszám eltérés volt jelen, az esetek negyedében pedig *CDKN2A/B*, *IKZF1* és *PAX5* hiányt is azonosítottak. Tanulmányukban kópiaszám eltéréssel járó intrakromoszomális fúziós géneket is azonosítottak Benard-Slagter és mtsai. által publikált eredményekhez hasonlóan. Továbbá, dMLPA alkalmazásával számos gén többlete (*RUNX1*, *LEF1*, *NR3C2*, *PAR1* és *PHF6*), valamint hiánya (*NF1*, *SUZ12*, *MTAP*) esetében mutattak ki szignifikáns összefüggést a minimális reziduális betegség kialakulásával.

1.3.4. Egyéb malignus hematológiai kórképek

Érett B-sejtes limfómákat tekintve, Delfau-Larue és mtsai. köpenysejtes limfómában vizsgáltak 13q14, 9p21, 11q23, 17p13 és 12q14 deléciókat, valamint *MYC* gén amplifikációt konvencionális MLPA-val annak érdekében, hogy az aberrációk prognosztikus jelentőségét felfedjék immunkemoterápia, magas dózisú citarabin kezelés, illetve autológ őssejt transzplantáció alkalmazása mellett, klinikai tanulmány keretében. Eredményeik alapján a *CDKN2A* és a *TP53* gének deléciói önálló, Ki-67 indextől független, kedvezőtlen prognózissal társuló markereknek tekinthetők (94).

Havranek és mtsai. több mint 500, non-Hodgkin limfómában szenvedő beteg mintájában vizsgáltak csíravonal eredetű *CHEK2* gén hiányt konvencionális MLPA-val. A diffúz nagy B-sejtes limfómát, folliculáris limfómát, köpenysejtes limfómát, kis limfocitás limfómát és mukóza asszociált limfoid szövet tumorját is reprezentáló betegcsoportban kétféle kereteltolódásos mutációt okozó és korai transzlációs terminációhoz vezető aberrációt azonosítottak (92).

Blasztos krízisen áteső, CML-ben szenvedő betegek mintáit konvencionális MLPA-val vizsgálva Alpár és mtsai. a betegség krónikus fázisában nem mutattak ki kópiaszám eltérést, míg egy kivétellel az összes blasztos krízis idején nyert mintában azonosítottak aberrációkat (22). Ezzel összhangban, van der Sligte és mtsai. gyermekkori CML-es betegeket vizsgálva nem mutattak ki kópiaszám eltéréseket 77 krónikus fázisú betegben, míg egy kivétellel minden olyan betegben találtak eltérést, akiket a betegség

akcelerált fázisában, vagy limfoblasztos krízisben diagnosztizáltak, esetleg krónikus fázisból progrediáltak (90).

Donahue és mtsai. mielodiszplázias szindrómában (MDS), illetve akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő betegek vizsgálatához tesztelték a konvencionális MLPA hatékonyságát egy -5/del5q, -7/del7q, +8, del17p, del20q és 21q abnormalitásokat egyidejűleg kimutatni képes szonda keverékkel, 89-93%-os konkordanciát elérve a módszer eredményeinek iFISH adatokkal való összevetése során. A szerzők az iFISH analízishez képest jelentősen csökkent mintaelőkészítési és értékelési időigényről, valamint a költségek legalább hétszeres csökkenéséről számoltak be (93).

Végül, egy hematológiai betegségek átfogó vizsgálatához kifejlesztett, 19 kromoszóma kart lefedő MLPA szonda keverékkel Konialis és mtsai. több mint 300, diagnosztikai vizsgálatra küldött csontvelő mintát analizáltak, az eredményeket kariotipizálási és iFISH adatokkal összehasonlítva (42). A mind limfoid, mind mieloid malignitásokat magában foglaló betegpopuláció 8%-ában azonosítottak olyan klinikailag releváns aberrációkat, melyeket a hagyományosabb citogenetikai módszerek nem fedtek fel. Az MLPA olyan esetekben is segítséget nyújtott, mikor a metafázisok hiánya miatt a kariotipizálás nem volt kivitelezhető.

Összességében, a teljesség igénye nélkül fent bemutatott példák egyértelműen jelzik, hogy a konvencionális MLPA egy sokoldalúan hasznosítható technika onkohematológiai betegségek vizsgálatához, beleértve a diagnosztikai munkafolyamatban való alkalmazást is. Mindazonáltal a konvencionális MLPA szélesebb körben való rutin klinikopatológiai alkalmazása, illetve az új dMLPA technika adaptációja előtt érdemes további vizsgálatokat végezni, a hatékonyságukat és megbízhatóságukat validálni.

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a konvencionális MLPA és dMLPA-technikák hatékonyságának, illetve alkalmazási lehetőségeinek közvetlen összevetését a mindennapi rutin diagnosztikában széles körben alkalmazott módszerekkel malignus hematológia megbetegedések vizsgálatához. Tanulmányunkban különböző limfoid malignitásokban szenvedő betegek mintáit vizsgáltuk, mint az érett B-sejtes CLL és MM, valamint az éretlen B és T-sejtes gyermekkori ALL. Vizsgálataink során különös figyelmet fordítottunk a klinikai jelentőséggel bíró prognosztikus és prediktív eltérések kimutatására, valamint a vizsgált betegségek relapszusához vezető biológiai folyamatok (pl.: klonális evolúció) feltérképezésére.

Mindezen szempontokat figyelembe véve specifikus céljaink a következők voltak:

- Konvencionális MLPA technika beállítása CLL-es betegek klinikai mintáinak analizéséhez, valamint a módszer megbízhatóságának elemzése iFISH vizsgálattal összevetve. Továbbá a módszer alkalmazása ibrutinib terápiaiban részesülő betegekben a DNS kópiaszám eltérések időbeli változásainak felderítéséhez.
- dMLPA módszer hatékonyságának vizsgálata MM-ben szubkromoszómális, és teljes kromoszómákat érintő CNA-k meghatározásában iFISH-sel és konvencionális MLPA-val összevetve.
- dMLPA módszer hatékonyságának validálása betegség releváns CNA-k széleskörű vizsgálatában egy B- és T-ALL-ben szenvedő betegcsoportban, melynek során értékelni kívántuk a módszer által szolgáltatott eredmények hozzáadott értékét a relapszushoz vezető klonális folyamatok felderítésében, illetve a betegek prognosztikai csoportokba való sorolásában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vizsgálati minták

3.1.1. CLL betegminták

A vizsgálatunkba 18, célzott kezelésben nem részesülő, CLL rutin genetikai vizsgálata során iFISH módszerrel legalább egy genetikai eltérést hordozó beteget vontunk be annak érdekében, hogy a konvencionális MLPA módszer érzékenységét és megbízhatóságát kellő számú CNA vonatkozásában tudjuk értékelni. Vizsgáltuk továbbá 5 ibrutinib terápiában részesülő beteg kezelés előtti és azt követő CNA státuszát, valamint egy ibrutinib kezelésre rezisztenssé váló beteg, a progresszió idejében vett perifériás vér és nyirokcsomó mintáinak CNA-it is. A tanulmányunkban vizsgált, CLL-ben szenvedő betegek diagnózisa az aktuális WHO ajánlás szerint lett felállítva (6).

Az MLPA vizsgálathoz Carnoy-oldatban fixált sejtekből, illetve EDTA-val antikoagulált perifériás vérmintákból ficoll gradiens centrifugálással szeparált mononukláriss sejtekből végeztünk DNS izolálást (*High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche*) a gyártó utasításainak megfelelően. Az iFISH vizsgálathoz perifériás vér és csontvelő mintákból nyert fixált sejteket használtunk.

A vizsgálatok során negatív kontrollként klonális malignus betegséget nem hordozó betegek és egészséges önkéntesek mintáiból izolált DNS-t használtunk.

3.1.2. MM betegminták

Munkánk során 56 MM beteg diagnóziskori csontvelő mintáját vizsgáltuk. A MM diagnózisa a betegségre jellemző morfológiai, genetikai és immunfenotípusos paraméterek alapján az aktuális WHO kritériumoknak megfelelően történt (6). Az áramlási citometriával történő immunfenotipizálás során CD45-PerCP-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD38-FITC, CD138-APC és CD56-PE markerekkel végeztünk 5 színű vizsgálatot áramlási citométeren (*CyFlow® space, Partec GmbH, Németország*). Azon esetekben, ahol 20-30% alatti plazmasejtarányt mértünk, a mintákon plazmasejt dúsítást végeztünk mágneses gyöngyökkel (*BD IMag™, BD Biosciences, Kalifornia*), CD56 és CD138 antitesteket használva a gyártó utasításai szerint, és a második körben történő immunfenotipizálással ellenőriztük a dúsítás sikerességét. A vizsgált DNS-t 70%-os etanolban fixált sejtekből izoláltuk Biorobot EZ1 (*Qiagen, Valencia, Kalifornia*) rendszer segítségével. Az iFISH vizsgálat Carnoy-oldatban archivált sejteken történt. A

vizsgálatok során negatív kontrollként egészséges önkéntesektől származó perifériás vérmintákat, illetve malignus betegségben nem szenvedő egyének csontvelői mintáit használtuk.

3.1.3. Gyermekkori ALL betegminták

Összesen 91 gyermek csontvelő mintáját vizsgáltuk, közülük 76-an B-ALL-ben, 15-en T-ALL-ben szenvedtek. Életkoruk 1-16 év között változott (átlag: 6,8 év). A betegek rizikócsoportokba való besorolása és kezelése a német Berlin, Frankfurt, Muenster (BFM) protokolloknak megfelelően történt, úgymint az ALL IC-BFM 2002, az ALL-REZ BFM 2002 és az ALL IC-BFM 2009. A 91 beteg diagnosztikus mintáján felül 12 betegtől összesen 14 relapszuskori minta is rendelkezésre állt, melyek a betegség első vagy második relapszusának idejéről származtak. A mintákban áramlási citometriával átlagosan 81%-os blasztarányt mértünk (35-100%). A diagnózis meghatározása jellemző morfológiai, genetikai és immunfenotípusos paraméterek alapján, a WHO ajánlásoknak megfelelően történt 2004 és 2014 között (6). Negatív kontrollként klonális malignus betegséget nem hordozó egyének mintáiból izolált DNS-t használtunk.

3.2. Konvencionális MLPA reakciók

Az MLPA reakciókat, beleértve a negatív kontroll minták alkalmazását, a gyártó előírásai alapján végeztük (*MRC-Holland*). A minták egyes lókuszekre vonatkozó CNA státuszát a mintákon belüli és minták közötti normalizációt követően, az áramlási citometriával meghatározott tumorsejt arányt is figyelembe véve határoztuk meg.

3.2.1. CLL konvencionális MLPA szondakeverék

A CLL-es betegminták vizsgálata során SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverékeket használtunk, melyeket a gyártó bocsátott rendelkezésünkre. A P037-es szondakeverék 41, a P038-as 35 genomikus célrégió kópiaszám vizsgálatára alkalmas. A szondakeverékek részletes összetételét a 2. táblázat szemlélteti. A reakció során keletkező PCR termékek méret szerinti szeparálását *ABI 3500 DNA Analyzer (Life Technologies, Bleidwiik, Hollandia)* kapilláris elektroforézis készülékkel végeztük. Az elektroferogramok analízisét és a relatív kópiaszámok meghatározását az ingyenesen elérhető *Coffalyser.Net (www.mlpa.com)* szoftverrel végeztük. Genomikus többletet 1,2-nél magasabb, deléciót 0,8-nál alacsonyabb relatív kópiaszám esetén határoztunk meg.

2. táblázat. A tanulmányban genomikus kópiaszám eltérések kimutatásához használt MLPA szondakeverékek

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék			SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék		
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció
<i>REL</i>	7	2p16.1	<i>PTEN</i>	5	10q23.31
<i>REL</i>	11	2p16.1	<i>PTEN</i>	9	10q23.31
<i>ALK</i>	4	2p23.2	<i>ATM</i>	1	11q22.3
<i>ALK</i>	27	2p23.2	<i>ATM</i>	55	11q22.3
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	<i>RDX</i>	11	11q22.3
<i>MYCN</i>	3	2p24.3	<i>ATM</i>	63	11q22.3
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	<i>ATM</i>	13	11q22.3
<i>MYCN</i>	3	2p24.3	<i>ATM</i>	44	11q22.3
<i>AIM1</i>	2	6q21	<i>PPP2R1B</i>	4	11q23.1
<i>SEC63</i>	16	6q21	<i>CADMI</i>	1	11q23.3
<i>TNFAIP3</i>	9	6q23.3	<i>CD27</i>	3	12p13.31
<i>TNFAIP3</i>	2	6q23.3	<i>STAT6</i>	4	12q13.3
<i>LATS1</i>	4	6q25.1	<i>HMGGA2</i>	2	12q14.3
<i>IGF2R</i>	3	6q25.3	<i>PAH</i>	4	12q23.2
<i>PARK2</i>	10	6q26	<i>IGF1</i>	4	12q23.2
<i>TNFRSF10B</i>	5b	8p21.3	<i>RB1</i>	17	13q14.2
<i>TNFRSF10A</i>	1	8p21.3	<i>DLEU2</i>	11	13q14.2
<i>EIF3H</i>	2	8q24.11	<i>KCNRG</i>	1	13q14.2
<i>MYC</i>	3	8q24.21	<i>DLEU1</i>	down	13q14.2
<i>MYC</i>	3	8q24.21	<i>DLEU1</i>	2	13q14.2
<i>CDKN2B</i>	2	9p21.3	<i>RB1</i>	27	13q14.2
<i>CDKN2A</i>	3	9p21.3	<i>ATP7B</i>	4	13q14.3
<i>ATM</i>	14	11q22.3	<i>AKT1</i>	4	14q32.33
<i>ATM</i>	22	11q22.3	<i>KIA0125</i>	up	14q32.33
<i>LRMP</i>	21	12p12.1	<i>MTA1</i>	3	14q32.33
<i>CCND2</i>	5	12p13.32	<i>TP53</i>	1	17p13.1
<i>CDK4</i>	8	12q14.1	<i>TP53</i>	2a	17p13.1
<i>IFNG</i>	4	12q15	<i>TP53</i>	6	17p13.1
<i>CHFR</i>	4	12q24.33	<i>TP53</i>	5	17p13.1
<i>KCNRG</i>	3	13q14.2	<i>TP53</i>	10	17p13.1
<i>MIR15A</i>	1	13q14.2	<i>CDKN2D</i>	2	19p13.2
<i>FNDC3A</i>	6	13q14.2	<i>LDLR</i>	7	19p13.2
<i>DLEU2</i>	2	13q14.2	<i>CCNE1</i>	12	19q12
<i>RB1</i>	21	13q14.2	<i>AKT2</i>	6	19q13.2
<i>ATP7B</i>	6	13q14.3	<i>MIR498</i>	1	19q13.42
<i>DLEU7</i>	1	13q14.3	<i>COL11A1*</i>	15	1p21.1
<i>DLEU7</i>	2	13q14.3	<i>SERPINC1*</i>	5	1q25.1

2. táblázat folytatása.

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék			SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék		
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció
<i>TP53</i>	4b	17p13.1	<i>ZNF638*</i>	2	2p13.2
<i>TP53</i>	7	17p13.1	<i>SCN1A*</i>	12	2q24.3
<i>TP53</i>	3	17p13.1	<i>GBE1*</i>	7	3p12.2
<i>TP53</i>	1	17p13.1	<i>IL4*</i>	1	5q31.1
<i>COL11A1*</i>	29	1p21.1	<i>GARS*</i>	5	7p14.3
<i>USH2A*</i>	60	1q41	<i>STX1A*</i>	8	7q11.23
<i>EDAR*</i>	3	2q12.3	<i>OPTN*</i>	11	10p13
<i>COL3A1*</i>	32	2q32.2	<i>RPGRIP1*</i>	20	14q11.2
<i>GBE1*</i>	7	3p12.2	<i>SEMA7A*</i>	15	15q24.1
<i>SCN5A*</i>	9	3p22.2	<i>ABAT*</i>	2	16p13.2
<i>KLKB1*</i>	3	4q35.2	<i>CACNG2*</i>	4	22q12.3
<i>NIPBL*</i>	5	5p13.2			
<i>IL4*</i>	1	5q31.1			
<i>KIAA0319*</i>	22	6p22.3			
<i>COL5A1*</i>	24	9q34.3			
<i>ABCC8*</i>	14	11p15.1			
<i>SPG11*</i>	36	15q21.1			

*Referencia szonda

3.2.2. MM konvencionális MLPA szondakeverék

MM vizsgálatához SALSA P425 v. A1 MLPA szondakeveréket (*MRC Holland, Amszterdam, Hollandia*) alkalmaztunk, mely 42, MM-ben gyakran érintett genomikus lókuszt célzó szondát tartalmaz, úgymint az 1p32 (*FAF1, CDKN2C, PLPP3 and DAB1*), 1p21, 1q21.3 (*CKS1B*), 1q23.3, 5q31.3, 12p13.31, 13q14 (*RBI, DLEU1/DLEU2*), 16q12 (*CYLD*), 16q23 (*WWOX*) és 17p13 (*TP53*) (3. táblázat). Az amplifikált szondákat *ABI 3500 DNA Analyzer (Life Technologies)* kapilláris elektroforézis készülékkel és *GeneMarker v1.95* szoftver segítségével vizsgáltuk.

3.2.3. ALL konvencionális MLPA szondakeverékek

Gyermekkori ALL vizsgálata során egy vagy több MLPA szondakeveréket alkalmaztunk a következők közül: P202-A1, P202-B2, P335-A4, P335-B2 és P383-A2 (*MRC Holland, Amszterdam, Hollandia*). A B-ALL-ben vizsgált régiók: PAR1 régió génjei, *IKZF2*, *EBF1*, *IKZF1*, *MIR31*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI*, 14q32.33 régió génjei és az *IKZF3*. T-ALL-ben vizsgált régiók: *STIL-TALI* fúzió, *LEF1*, *CASP8AP2*, *MYB*, *EZH2*, *CDKN2A/B*, *MTAP*, *MLLT3*, *NUP214-ABL1* fúzió, *PTEN*, *LMO1*, *LMO2*, *NF1*, *SUZ12*, *PTPN2* és *PHF6*. Az alkalmazott szondakeverékek és vizsgált régiók listáját a 4. táblázat tartalmazza.

Az amplifikált szondákat *ABI 3500 DNA Analyzer* kapilláris elektroforézis készülék és *Coffalyser.Net* szoftver segítségével vizsgáltuk.

3 táblázat. A SALSA MLPA P425-A1, MM-ben alkalmazott szondakeverék tartalma

Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció
<i>FAF1</i>	4	1p32.3
<i>CDKN2C</i>	3	1p32.3
<i>PPAP2B</i>	1	1p32.2
<i>DABI</i>	14	1p32.2
<i>DABI</i>	2	1p32.2
<i>LEPR</i>	4	1p31.3
<i>RPE65</i>	14	1p31.2
<i>DPYD</i>	5	1p21.3
<i>COL11A1</i>	45	1p21.1
<i>CKS1B</i>	1	1q21.3
<i>CKS1B</i>	2	1q21.3
<i>NUF2</i>	1	1q23.3
<i>NUF2</i>	14	1q23.3
RP11-541J2		1q23.3
RP11-541J2		1q23.3
RP11-541J2		1q23.3
RP11-541J2		1q23.3
RP11-480N10		1q23.3
<i>PBX1</i>	9	1q23.3
<i>PCDHA1</i>	1	5q31.3
<i>PCDHAC1</i>	1a	5q31.3
<i>PCDHB2</i>	1	5q31.3
<i>PCDHB10</i>	1	5q31.3
<i>SLC25A2</i>	1	5q31.3
<i>PCDHGA11</i>	1	5q31.3
<i>CD27</i>	3	12p13.31
<i>VAMP1</i>	4	12p13.31
<i>NCAPD2</i>	2	12p13.31
<i>NCAPD2</i>	32	12p13.31
<i>CHD4</i>	40	12p13.31
<i>CHD4</i>	2	12p13.31
<i>RB1</i>	7	13q14.2
<i>RB1</i>	27	13q14.2
<i>DLEU2</i>	2	13q14.3
<i>DLEU1</i>	down	13q14.3
<i>CYLD</i>	2	16q12.1
<i>CYLD</i>	19	16q12.1
<i>WWOX</i>	1a	16q23.1
<i>WWOX</i>	8	16q23.1

3. táblázat folytatása

Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma pozíció
<i>TP53</i>	11	17p13.1
<i>TP53</i>	8	17p13.1
<i>TP53</i>	5	17p13.1
<i>PEX13*</i>		2p16.1
<i>ZEB2*</i>		2q22.3
<i>CFI*</i>		4q25
<i>PKHD1*</i>		6p12.2
<i>EYA1*</i>		8q13.3
<i>OPTN*</i>		10p13
<i>DKK1*</i>		10q11.2
<i>RNMT*</i>		18p11.2
<i>NPC1*</i>		18q11.2
<i>USP25*</i>		21q21.1
<i>LARGE*</i>		22q12.3

Megjegyzés: az RP11-541J2 és RP11-480N10 BAC klónok, melyek ezt az adott régiót fedik le. Ezek a szondák rendkívül gén-szegény régióban vannak. A legközelebbi gén (*PBX1*) mintegy 100 kilobázisnyira kezdődik telomerikus irányban a 154 nuklotid hosszúságú szondától.

3.3. dMLPA reakciók

Minden egyes dMLPA reakciót a gyártó utasításainak megfelelően végeztünk 40 ng DNS felhasználásával.

3.3.1. MM dMLPA szondakeverék

A vizsgálat során az *MRC Holland* által 2017-ben kifejlesztett dMLPA D006 szondakeveréket (lot X1-0613) használtuk, melyet az együttműködő laboratóriumok számára tett a gyártó elérhetővé tesztelés és validálás céljából. A szondakeverék tartalmazott (i) 160 MM-ben gyakorta CNA-t hordozó régiót célzó szondát; (ii) 212 kariotipizáló szondát, mely minden kromoszómán a centromerikus, telomerikus, és a karok középső régióit célozta; (iii) egy szondát a *BRAF* V600E mutáció kimutatására; (iv) 126 belső kontroll szondát, melyek a mintát azonosításáért, és a mennyiségi és minőségi ellenőrzést tették lehetővé. A CNA-k szempontjából stabil régiókhoz hibridizálódó kariotipizáló szondák egy részét szintén referencia szondaként használtuk fel.

3.3.2. ALL dMLPA szondakeverék

Gyermekkori ALL vizsgálata során D007-es (D007-X2-0516-0a verzió) dMLPA szondakeveréket alkalmaztunk. A szondakeverék 598 szondát tartalmaz, melyek közül (i) 275 B- és/vagy T-ALL-ben gyakorta CNA-t hordozó régiót célzó szonda (4. táblázat); (ii) 196 digitális kariotipizáló szonda, melyeket referencia szondaként is fel lehet használni a normalizáció során; (iii) 128 belső kontroll szonda, melyek a minták azonosítását, és mennyiségi és minőségi ellenőrzést tesznek lehetővé.

4. táblázat. A dMLPA D007-X2-0516 szondakeverék által lefedett gének

Kromoszóma régió	Gén; exonok	Validációhoz használt MLPA kit
1p33	<i>TALI</i> *; 1, 3, 5, 6	P383-A2
1p33	<i>STIL</i> *; 1, 2, 6, 12	P383-A2
2q34	<i>IKZF2</i> ; 2, 5, 9	P202-B2
3q13.2	<i>CD200</i> ; 3, 4, 6	-
3q13.2	<i>BTLA</i> ; 1, 2, 5	-
3q26.32	<i>TBLIXR1</i> ; upstream, 1, 2, 7, 15	-
4q25	<i>LEF1</i> ; 1, 3, 4, 7, 12	P383-A2
4q31.23	<i>NR3C2</i> ; 2, 4, 9	-
5q31.3	<i>NR3C1</i> ; upstream, 1, 2, 5, 8	-
5q32	<i>PDGFRB</i> ; 9, 10, 11, 12	-
5q33.3	<i>EBF1</i> ; 8, 10, 14, 15, 16	P335-A4, P335-B2
6q15	<i>CASP8AP2</i> ; 1, 2, 6, 10	P383-A2
6q23.3	<i>MYB</i> ; 2, 6, 16	P383-A2
7p12.2	<i>IKZF1</i> ; upstream, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 és alternatív exon 1	P202-A1, P202-B2, P335-A4, P335-B2
7q36.1	<i>EZH2</i> ; 2, 15, 20	P383-A2
9p21.3	<i>MLLT3</i> ; 2, 5, 7	P383-A2
9p21.3	<i>CDKN2A</i> ; upstream, 1, 2 és alternatív exon 3 és exon 4	P202-A1, P202-B2, P335-A4, P335-B2, P383-A2
9p21.3	<i>CDKN2B</i> ; 1, 2	P202-A1, P202-B2, P335-A4, P335-B2, P383-A2
9p13.2	<i>PAX5</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	P202-A1, P335-A4, P335-B2
9q34.12	<i>ABL1</i> **; 2, 3, 11	P383-A2
9q34.13	<i>NUP214</i> ; 2, 23, 29	P383-A2
9q34.3	<i>NOTCH1</i> ; 2, 14, 25, 26, 28, 31	-
10q23.31	<i>PTEN</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	-
11p15.4	<i>LMO1</i> ; 1, 2, 4	P383-A2
11p13	<i>LMO2</i> ; 1, 5, 6	P383-A2
11p13	<i>CD44</i> ; 18	P383-A2
11p13	<i>SLCIA2</i> ; 11	P383-A2
11p12	<i>RAG2</i> ; 1, 2	P383-A2
12p13.2	<i>ETV6</i> **; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	P335-A4, P335-B2
12q21.33	<i>BTG1</i> ; 1, 2, downstream	P335-A4, P335-B2
13q14.2	<i>RBI</i> ; 5, 14, 19, 24, 26	P335-A4, P335-B2
14q32.33	<i>IGHM</i> ; 1, 4	-
17p13.1	<i>TP53</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11	-
17q11.2	<i>NFI</i> ; 12, 26, 58	P383-A2
17q11.2	<i>SUZ12</i> ; 7, 10, 15	P383-A2
17q12	<i>IKZF3</i> ; 4, 5, 7	P202-B2
18p11.21	<i>PTPN2</i> ; 1, 2, 3, 8	P383-A2
21q11.2	<i>HSPA13</i> ; 4	-

4. táblázat folytatása.

Kromoszóma régió	Gén; exonok	Validációhoz használt MLPA kit
21q11.2	<i>SAMSNI</i> ; 6	-
21q21.1	<i>MIR99A</i> ; NA	-
21q21.1	<i>BTG3</i> ; 5	-
21q21.1	<i>TMPRSS15</i> ; 13	-
21q21.1	<i>NCAM2</i> ; 5	-
21q21.2	<i>MIR155</i> ; NA	-
21q21.3	<i>ADAMTS5</i> ; 4	-
21q21.3	<i>APP</i> ; 3	-
21q21.3	<i>CYYR1</i> ; NA	-
21q21.3	<i>BACH1</i> ; 3	-
21q22.11	<i>TIAMI</i> ; 23	-
21q22.11	<i>OLIG2</i> ; NA	-
21q22.11	<i>KCNE2</i> ; 2	-
21q22.12	<i>RUNX1</i> **; 2, 4, 6, 7, 8, 9	-
21q22.13	<i>SIM2</i> ; 10	-
21q22.13	<i>HLCS</i> ; 7	-
21q22.13	<i>DYRK1A</i> ; NA	-
21q22.13	<i>KCNJ6</i> ; 3	-
21q22.2	<i>ERG</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	-
21q22.2	<i>ETS2</i> ; 9	-
21q22.2	<i>PSMG1</i> ; 6	-
21q22.3	<i>TMPRSS2</i> ; 4	-
21q22.3	<i>RIPK4</i> ; 3	-
21q22.3	<i>TFF1</i> ; 2	-
21q22.3	<i>ITGB2</i> ; 5	-
21q22.3	<i>SLC19A1</i> ; 6	-
21q22.3	<i>COL6A2</i> ; NA	-
21q22.3	<i>PRMT2</i> ; 4	-
22q11.22	<i>VPREB1</i> ; 2	-
22q11.23	<i>IGLL1</i> ; 1	-
Xp22.33	<i>SHOX</i> ; 5, downstream	P335-A4, P335-B2
Xp22.33	<i>CRLF2</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6	P335-A4, P335-B2
Xp22.33	<i>CSF2RA</i> ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16	P335-A4, P335-B2
Xp22.33	<i>IL3RA</i> ; 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12	P335-A4, P335-B2
Xp22.33	<i>P2RY8</i> ; upstream, 1, 2	P335-B2
Xq26.2	<i>PHF6</i> ; 1, 3, 7, 10	P383-A2

* *STIL-TALI* génfüzió jelenlétét a rutin diagnosztikában is használt PCR reakcióval validáltuk.

**CNA-k jelenlétét a rutin diagnosztikában alkalmazott *ETV6/RUNX1* és *BCR/ABL1* füzió specifikus iFISH szondákkal validáltuk.

3.4. Kiegészítő vizsgálatok

3.4.1. iFISH reakciók

Az iFISH reakciókat a szondák gyártói utasításainak megfelelően hajtottuk végre. Minden esetben 200 sejtmag jelmintázatát elemeztük két független szakértő bevonásával.

3.4.1.1. CLL-ben alkalmazott iFISH szondák

Az iFISH vizsgálatok során az alábbi szondákat alkalmaztuk: Vysis lókuszt specifikus azonosító (*LSI*) ATM SpectrumOrange/kromoszóma enumerációs próba (CEP) 11 SpectrumGreen, Vysis TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen, Vysis D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen, Vysis CEP 12 (D12Z3) SpectrumGreen, Vysis LSI MYC SpectrumOrange/SpectrumGreen, Vysis ALK SpectrumOrange/SpectrumGreen (*Abbott Molecular, Lake Bluff, Illinois*), valamint CDK4 SpectrumOrange/CEP 12 (D12Z3) SpectrumGreen (*Leica Biosystems, Newcastle, Egyesült Királyság*). A mintánként 200 interfázisban lévő sejt iFISH mintázatának elemzéséhez Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkópot és *Lucia Citogenetics (Laboratory Imaging, Prága, Csehország)* iFISH képanalizáló szoftvert használtunk.

3.4.1.2. MM-ben alkalmazott iFISH szondák

A dMLPA-val vizsgált DNS lókusztok egy részének *in situ* jelölésével vizualizáltuk a 13-as kromoszóma eltéréseit (LSI D13S319 SO/13q34 SG), a *TP53* gén delécióját (LSI TP53 SO/CEP17 SG), az 5-ös kromoszóma abnormalitásait (LSI D5S23 SG/EGR1 5q31 SO), az *IGH* lókuszt aberrációit (LSI *IGH dual color break apart*) és utóbbi érintettsége esetén az MM-ben leggyakrabban megjelenő *IGH* transzlokációt (LSI *IGH/FGFR3 DC DF*, LSI *IGH/CCND1 XT DC DF* és LSI *IGH/MAF DC DF*) (*Vysis, Downers Grove, Illinois*). A mintázatok értékeléséhez *Zeiss Axioplan2ie MOT (Metasystems, Altlussheim, Németország)* és *Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss Technika Kft, Budapest, Magyarország)* mikroszkóp rendszereket alkalmaztunk. Az iFISH jelmintázatokat az Európai Myeloma Hálózat ajánlásának megfelelően értékeltük (133). Az 1p hiány és 1q többlet sejtalapú detektálására az 1p32, 1p21 és 1q21 régiókra specifikus mesterséges bakteriális kromoszóma (BAC) klónokat alkalmaztunk (95).

3.4.2. Piroszekvenálás

A *BRAF* gén V600E mutációjának kimutatását és mennyiségi meghatározását *PyroMark Q24* rendszeren (*Qiagen GmbH, Hilden, Németország*), a gyártó utasításainak megfelelően végeztük 100 ng DNS felhasználásával. A 600-as kodon amplifikációját követően a biotinizált PCR termékeket *Streptavidinnal* bevont *Sepharose High Performance bead*-ekhez immobilizáltuk. Vákuum munkaállomáson történő *bead capture*-t és többlépcsős mosást követően, denaturálás által piroszekvenálásra alkalmas egyszálú DNS-t állítottunk elő. A szekvenálás reverz irányba történt, így a normál mintákban CAC vad-típusú szekvenciát, V600E mutáns esetekben pedig CTC genotípust detektáltunk. Az eredményeket *PyroMark Q24* szoftverrel értékeltük.

3.4.3. Digitális droplet PCR

A *BRAF* V600E mutáció jelenlétét a piroszekvenálás érzékenységét meghaladó, digitális droplet PCR (ddPCR) módszerrel is vizsgáltuk. A reakcióhoz 50 ng DNS-t és kereskedelmi forgalomban lévő *BRAF* *assay*-ket használtunk a vad típusú (dHsaCP2000028) és mutáns (dHsaCP2000027) *target*-ek kimutatására a gyártó előírásainak megfelelően. A reakcióterekként szolgáló dropleteteket QX200 Droplet Generátor rendszerrel hoztuk létre, az egyedi DNS molekulákat *QX200 Droplet Digital PCR* rendszerrel analizáltuk (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia*), az eredményeket *QuantaSoft* 1.7.4.0917-as verziójú (*Bio-Rad Laboratories*) szoftverrel értékeltük.

3.4.4. *IGH* génátrendeződés vizsgálata ALL-ben

Gyermekkori B-ALL-ben szenvedő betegeknél a diagnózis és relapszusok mintapárokban az *IGH* gén VDJ szegmenseinek célzott amplicon szekvenálását végeztük el. Az NGS könyvtárakat *LymphoTrack IGH FR1/2/3 assay* (*Invivoscribe, San Diego, Kalifornia*) segítségével hoztuk létre a gyártó utasításainak megfelelően.

A reakció során az *IGH* gén VDJ régióinak konzervált szakaszaihoz kötődő primerekkel multiplex polimeráz láncreakciót végeztünk 50-100 ng genomikus DNS-en. A minták elérhetőségének, és az egyes barcode-ok kombinálási lehetőségeinek függvényében framework region 1 (FR1) és/vagy FR2 primereket használtunk független reakciókban az *IGH* VDJ junkció célzott amplifikációjához. Agencourt Ampure XP mágneses *bead*-ekkel (*Beckman Coulter, Brea, Kalifornia*) való tisztítást követően a könyvtárakat normalizáltuk és *pooloztuk*, majd Illumina MiSeq Nano v2 flow cellen 250

bázispáros *pair-end konfigurációval* megszekvenáltuk. A FASTQ file-okat *LymphoTrack* szoftverrel (*Inivoscribe*) elemeztük, melynek során meghatároztuk az egyes mintákban mutatkozó klonotípusokat, és azokat előfordulási gyakoriságuk alapján rangsoroltuk. A gyártó utasításainak megfelelően csak a teljes *read* számhoz képest $\geq 2.5\%$ vagy $\geq 5\%$ -os eredményeket tekintettük klonotípusnak, amennyiben a teljes lefedettség meghaladta a 20.000-et, illetve a 10.000-et. Továbbá, minden klonotípus szekvenciát manuálisan is elemeztünk és értékeltünk az *ImMunoGeneTics V-Quest* (www.imgt.org) online adatbázis segítségével.

3.5. Statisztikai analízis

A dMLPA, iFISH és konvencionális MLPA adatok közötti kongruenciát Fischer-féle egzakt teszttel vizsgáltuk.

A B-ALL-ben szenvedő betegek mintáiban FR1 és FR2 *assay*-k által azonosított *IGH*-klonotípusok előfordulása közötti korrelációt a Pearson korrelációs koefficienssel határoztuk meg.

Az eseménymentes túlélést (EFS) B-ALL-ben szenvedő betegekben a kezelés kezdetétől a relapszusig, második malignitásig vagy betegséghez köthető halálig terjedő időintervallumként definiáltuk. A túlélési arányokat Kaplan-Meier módszerrel becsültük és log-rank teszttel hasonlítottuk össze. A statisztikai analíziseket SPSS 15.0 (*SPSS Inc., Chicago, Illinois*) és R version 3.5.3 (*R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria*) szoftverek segítségével végeztük el.

3.6. Etikai vonatkozások

Kutatásaink során mindenben a hatályos jogszabályok szerint jártunk el, a Semmelweis Egyetem, Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB 155/2012); Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB: 14383-2/2017/EKU és 45371-2/2016/EKU) engedélyeinek birtokában, a Helsink Deklarációban foglaltaknak megfelelően.

4. Eredmények

4.1. MLPA alkalmazása CLL-ben

A 18 CLL-ben szenvedő, célzott terápiában nem részesülő betegben konvencionális MLPA vizsgálattal összesen 59 aberrációt mutattunk ki. A rutin diagnosztikus körülmények között is vizsgált 11q hiányon (n=7), 12-es triszómián (n=2), 13q delécióon (n=12) és 17p hiányon (n=7) felül *c-MYC* (n=6) és *ALK* (n=3) többletet, illetve egy részleges 12p többletet, valamint 21 további CNA-t azonosítottunk 7 érintett kromoszómán. A leggyakoribb eltérések a 2p, 8p, 6q, 10q, 12p, 14q és 19p kromoszóma-régiók többletei, valamint a 9p és 14q kromoszóma-régiók hiányai voltak 5. ábra.

4.1.1. Kópiaszám eltérések MLPA-val és iFISH-sel

A minták iFISH analízise során sikeresen validáltunk 38, konvencionális MLPA-val azonosított eltérést, beleértve 11q hiányt, 12-es kromoszóma triszómiát, 13q hiányt, 17p hiányt, valamint *ALK*, *c-MYC* és *CDK4* gén többleteket. Az iFISH vizsgálat további 11q hiány (n=1), 13q hiány (n=2) és 17p hiány (n=1) jelenlétére utaló jelmintázatokat azonosított három betegben negatív MLPA eredmény mellett. Ezekben az esetekben az aberrációt hordozó tumorsejtek sejtek aránya 20% alattinak bizonyult, ami nem éri el a konvencionális MLPA érzékenységi szintjét. További huszonnégy, konvencionális MLPA vizsgálattal azonosított aberráció megerősítésére megfelelő iFISH szonda hiányában nem került sor. Az iFISH és konvencionális MLPA eredmények összehasonlítását az 5. és 6. ábrák szemléltetik. A két módszerrel együttesen 63 aberrációt detektáltunk a 18 betegben, átlagosan 3,5 aberrációt megfigyelve betegenként. Tizenhárom betegben észleltünk legalább 3 kromoszómát érintő kópiaszám eltérést, melyhez hasonló komplexitást kizárólag konvencionális MLPA módszert használva 11, míg iFISH vizsgálattal csupán 2 betegben tudtunk volna azonosítani, ezzel jelentősen alábecsülve ezen eltérés gyakoriságát az általunk vizsgált betegpopulációban.

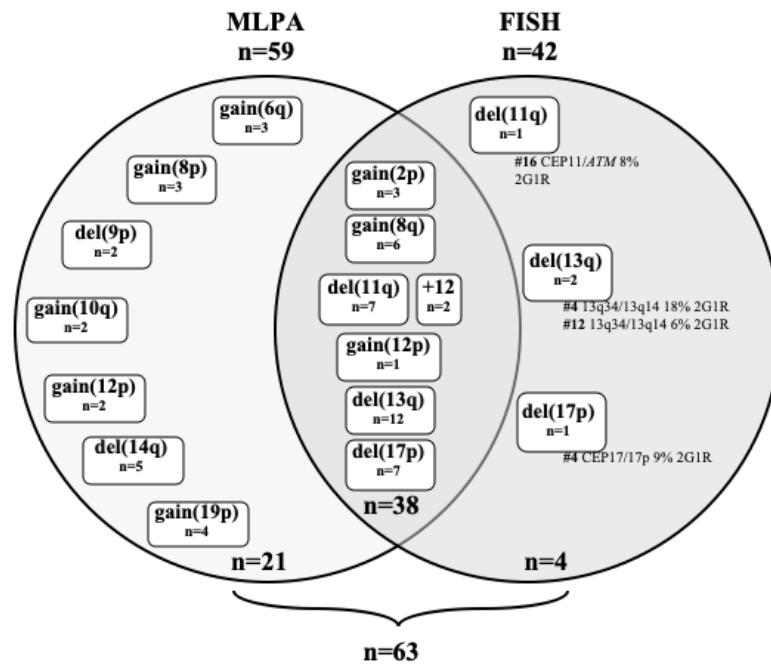
Szonda keverék	Target gén - exon	Kromoszóma pozíció	Betegek																	
			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18
P037	MYCN-2	2p24.3																		
P037	MYCN-2	2p24.3																		
P037	MYCN-3	2p24.3																		
P037	MYCN-3	2p24.3																		
P037	ALK-27	2p23.2	G	N			N	G	G											
P037	ALK-4	2p23.2	G	N			N	G	G											
P037	REL-7	2p16.1																		
P037	REL-11	2p16.1																		
P037	AIM1-2	6q21																		
P037	SEC63-16	6q21																		
P037	TNFAIP3-2	6q23.3																		
P037	TNFAIP3-9	6q23.3																		
P037	LATS1-4	6q25.1																		
P037	IGF2R-3	6q25.3																		
P037	PARK2-10	6q26																		
P037	TNFRSF10B-5	8p21.3																		
P037	TNFRSF10A-1	8p21.3																		
P037	EIF3H-1	8q24.11																		
P037	MYC-3	8q24.21																		
P037	MYC-3	8q24.21																		
P037	CDKN2A-3	9p21.3																		
P037	CDKN2B-2	9p21.3																		
P038	PTEN-5	10q23.31																		
P038	PTEN-9	10q23.31																		
P038	ATM-1	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	ATM-13	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P037	ATM-14	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P037	ATM-22	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	ATM-44	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	ATM-55	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	ATM-63	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	RDX-11	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D	D	N
P038	PPP2R1B-4	11q23.1																		
P038	CADMI-1	11q23.3																		
FISH	[CEP12]	12p11.1-q11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	N	N
P037	CCND2-5	12p13.32																		
P038	CD27-3	12p13.31																		
P037	LRMP-21	12p12.1																		
P038	STAT6-4	12q13.3																		
P037	CDK4-8	12q14.1																		
P038	HMGA2-2	12q14.3																		
P037	IFNG-4	12q15																		
P038	IGF1-3	12q23.2																		
P038	PAH-4	12q23.2																		
P037	CHFR-4	12q24.33																		
P038	RBI-17	13q14.2																		
P037	RBI-21	13q14.2																		
P038	RBI-27	13q14.2																		
P037	FNDC3A-6	13q14.2																		
P038	DLEU2-11	13q14.2																		
P038	KCNRG-1	13q14.2																		
P037	KCNRG-3	13q14.2																		
P037	MIR15A-1	13q14.2																		
P037	DLEU2-intr 1	13q14.2																		
P038	DLEU1-2	13q14.2																		
P038	DLEU1-intr 2	13q14.2																		
P037	DLEU7-2	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	N
P037	DLEU7-1	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	N
P037	ATP7B-6	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	N
P038	ATP7B-4	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	N	N
P038	AKT1-4	14q32.33																		
P038	MTA1-3	14q32.33																		
P038	KIAA0125-up	14q32.33																		
P038	TP53-10	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P037	TP53-7	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P038	TP53-6	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P038	TP53-5	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P037	TP53-4b	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P037	TP53-3	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P038	TP53-2a	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P038	TP53-1	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P037	TP53-1	17p13.1	N	N	D	D	D	N	N	D	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D
P038	CDKN2D-2	19p13.2																		
P038	LDLR-7	19p13.2																		
P038	CCNE1-12	19q12																		
P038	AKT2-6	19q13.2																		
P038	MIR498-1	19q13.42																		

5. ábra. CLL vizsgálatával nyert iFISH és MLPA eredmények összefoglalása

18 CLL-es beteg diagnóziskori mintáját 76 MLPA szondával és 7 különböző iFISH szonda kittel vizsgáltuk. A vörös szín MLPA-val kimutatott többlet-amplifikációt, a kék deléció jelöl, fehér cella esetén az adott régióban nem volt MLPA-val kimutatható kópiaszám eltérés. A „G” (gain) iFISH-sel kimutatott többlet, a „D” deléció jelöl, „N” jelölés esetén pedig normális iFISH mintázatot azonosítottunk. A 12-es kromoszóma esetében az iFISH és MLPA szondák cél régiói nem fedtek át, ezért az iFISH eredményeket külön sorban jelöltük.

Jelmagyarázat:

- N negatív FISH mintázat
- G többlet FISH alapján
- D deléció FISH alapján
- normális MLPA profil
- többlet MLPA alapján
- deléció MLPA alapján

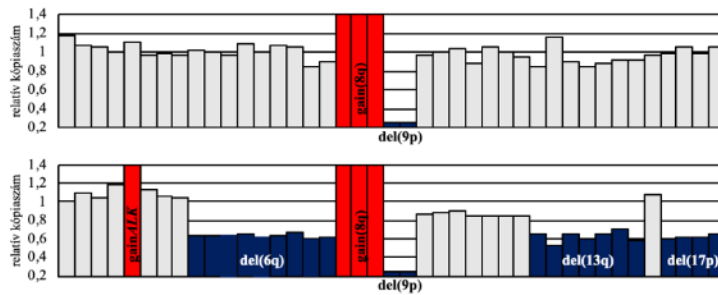
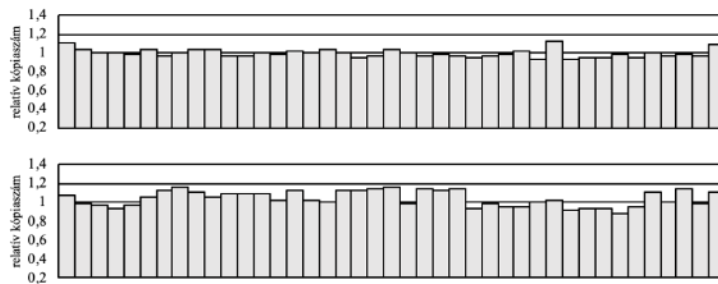
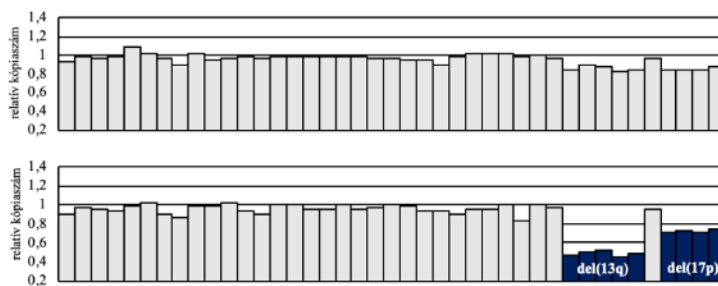
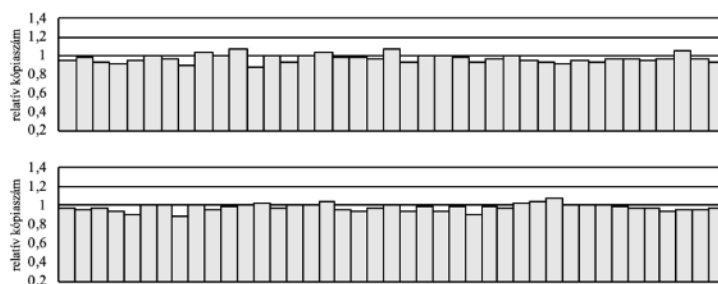
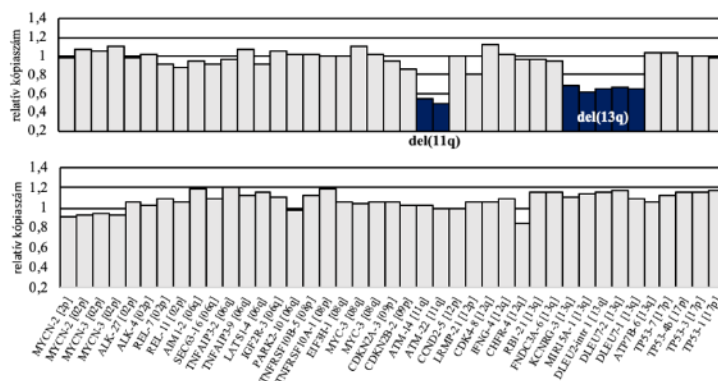


6. ábra. iFISH és MLPA technikákkal kimutatott eltérések összehasonlítása CLL-ben

A két módszerrel együtt összesen 63 aberrációt azonosítottunk. MLPA vizsgálat 59 kópiaszám eltérést fedett fel, amiből 21 esetében iFISH validáció nem történt megfelelő szonda hiányában. iFISH vizsgálat 42 eltérést azonosítottunk, ebből 38 esetben konvencionális MLPA-val is kimutatott eltérést validáltunk, 4 esetben viszont az iFISH MLPA-val nem észlelt kromoszóma eltérést azonosított. Ezen eltérések mintában való aránya <20% volt, így az MLPA érzékenységi küszöbét nem érte el.

4.1.2. Kópiaszám változások ibrutinib kezelés hatására

Az ibrutinib terápia hatására megjelenő klonális evolúciós változásokat 5 kezelt beteg mintapárjain vizsgáltuk SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeveréssel. Az első minta minden betegnél az ibrutinib kezelés megkezdése előtti időpontból származott, a második minta 3 betegnél (#20, #22, #23) a kezelés 12., egy-egy betegnél pedig a 8. (#21) és 3. havában (#19) került levételre. A 19-es beteg esetében a kezelés megkezdése előtt csupán 8q többlet és 9p hiány volt kimutatható, míg a kezelés harmadik hónapjára a korábbi eltérések mellett 2p többlet, 6q hiány, 8p hiány, 13q hiány és 17p hiány is kimutathatóvá vált (7. ábra). A 20-as és 22-es betegekben a kezelés megkezdésekor nem volt MLPA-val kimutatható aberráció, és ez az állapot mindkét esetben megmaradt egy éves kezelést követően is. A 21-es beteg az ibrutinib kezelés előtt nem hordozott MLPA-val kimutatható aberrációt, a 8. havi mintában azonban 13q hiányt és 17p hiányt detektáltunk. A 23-as beteg esetében diagnóziskor 11q hiány és 13q hiány volt kimutatható, a 12. havi mintában viszont nem mutatkozott aberráció (7. ábra).

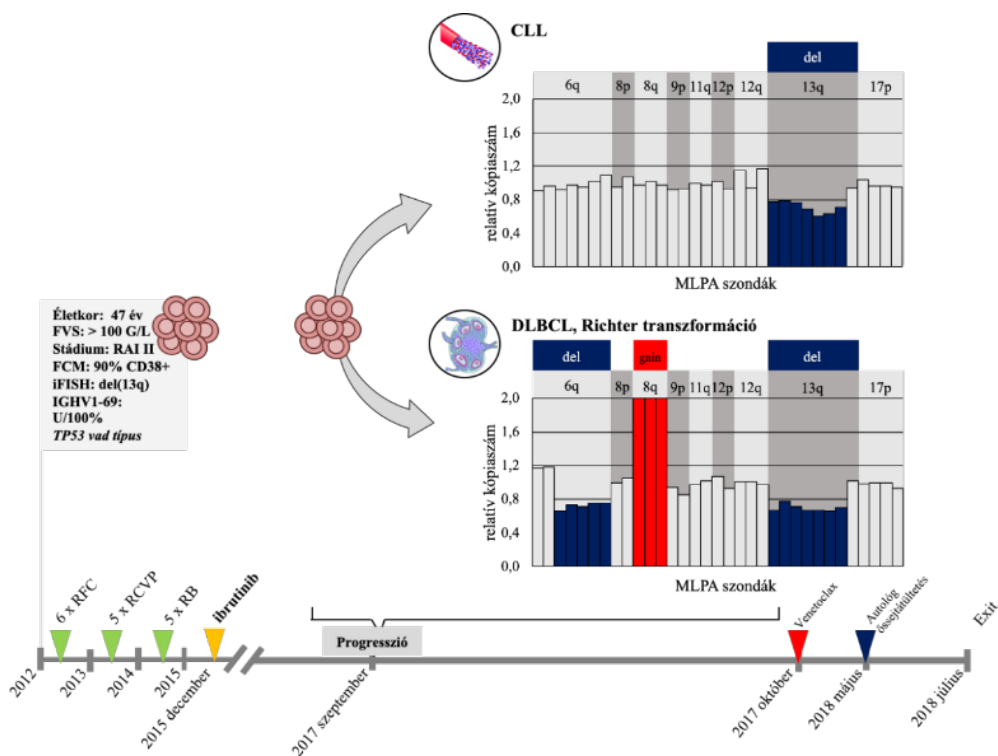
1. beteg - kezelés előtti és alatti (3. havi) minta**2. beteg - kezelés előtti és alatti (12. havi) minta****3. beteg - kezelés előtti és alatti (8. havi) minta****4. beteg - kezelés előtti és alatti (12. havi) minta****5. beteg - kezelés előtti és alatti (12. havi) minta**

7. ábra. Ibrutinib terápiaiban részesülő CLL-es betegek kezelés előtti és kezelés során vett mintapárjainak kópiaszám eltérései MLPA-val.

A felső profil minden esetben a kezelés előtti minta, az alsó a kezelés során vett minta MLPA profilját ábrázolja. A mintákat SALSA MLPA P037 CLL-1 szonda keverékkel vizsgáltuk. Az x-tengelyeken a vizsgált régiókat, az y tengelyen azok relatív kópiaszámát tüntettük fel. Az egyes lókuszek esetében akkor határoztunk meg többletet, ha a relatív kópiaszám 1,2 felettinek mutatkozott, a deléció jelenlétét 0,8 alatti kópiaszámhoz kötöttük. A kópiaszám többletekre utaló eredményeket vörössel, a deléciókra utalókat kézzel jelöltük.

4.1.3. Klonális evolúció ibrutinib rezisztencia során

Az ibrutinibbel kezelt, ám klinikai progresszó jeleit nem mutató betegek mellett vizsgáltuk egy magas rizikójú, többvonalbeli kemoimmunoterápiás kezelésen átesett CLL-es beteg ibrutinib kezelését követő relapszusakor vett perifériás vér és nyirokcsomó mintáit. A megnagyobbodott, szövettani vizsgálat alapján Richter transzformáción átesett tumorsejteket tartalmazó nyirokcsomóból izolált DNS minta konvencionális MLPA vizsgálata során 6q hiányt, 8q többletet és 13q hiányt mutattunk ki, míg a perifériás vérben keringő CLL-sejtek vizsgálata során csupán a 13q hiányt detektáltuk (8. ábra). Ezek az eredmények alátámasztották azon, egyéb molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeire alapozott feltételezésünket, mely szerint a vizsgált beteg terápia rezisztenciája és következményes relapszusa a daganatsejtek komplex, térbeli heterogenitáson alapuló konvergens evolúciója nyomán alakult.



8. ábra. CLL ibrutinib kezelése alatt kialakuló terápia rezisztencia tér és időbeli vonatkozásainak vizsgálata konvencionális MLPA-val

Magas rizikójú, ibrutinib kezelés mellett progrediáló beteg párhuzamos perifériás vér és nyirokcsomó mintáinak konvencionális MLPA profilja. A kópiaszám többletekre utaló eredményeket vörössel, a deléciókra utalókat késsel jelöltük.

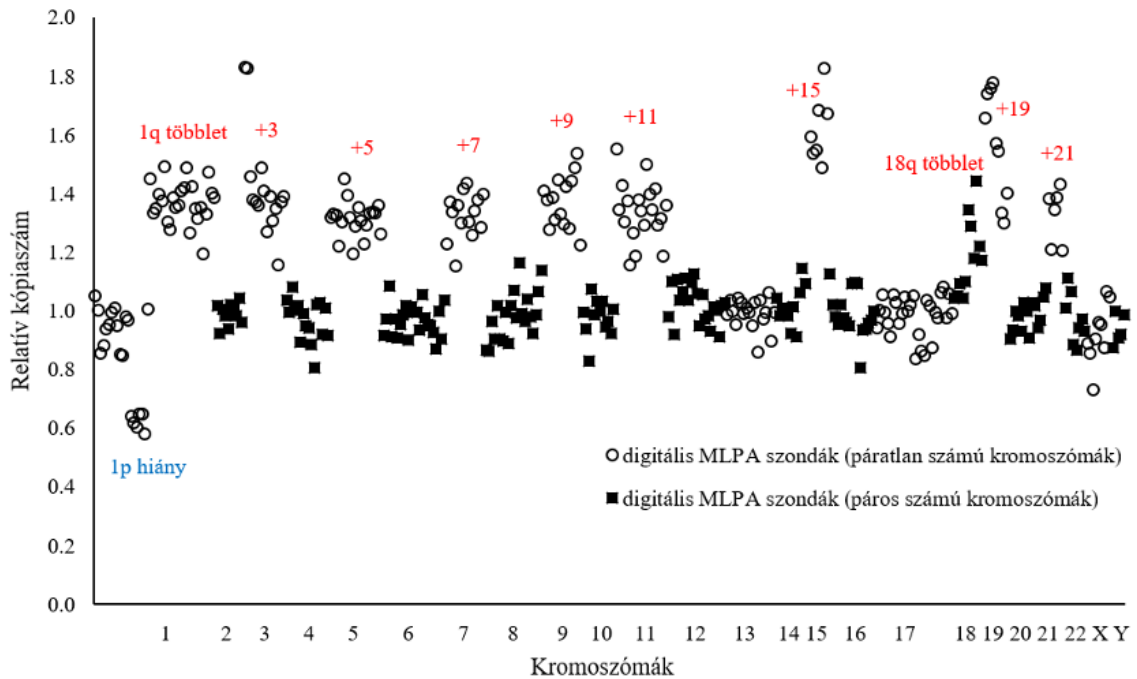
RFC: rituximab, fludarabin, ciklofoszfamid; RCVP: rituximab, ciklofoszfamid; vinkrisztin, prednizolon; RB: rituximab, bendamutin;

4.2. MM kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val

dMLPA módszerrel minden betegmintában 371 genomikus lókuszt relatív kópiaszámát vizsgáltuk. Két szonda esetében a negatív kontroll mintában mért relatív kópiaszámok standard deviációja meghaladta az általunk meghatározott 0,09-es megbízhatósági határértéket, így ezeket a szondákat a további analízisből kizártuk. A laboratóriumi munkafolyamatot kevesebb, mint 24 óra alatt végeztük el, beleértve a dMLPA szondák éjszakán át tartó hibridizációját, és az elkészült könyvtárak Illumina MiSeq készülékbe való beltöltését is. Standard v3-as flow cell-t alkalmazva, a 115 bázispár hosszán elvégzett *single-read* futás körülbelül 9,5 órát vett igénybe, és szondánként 1169 ± 184 *read*-et eredményezett.

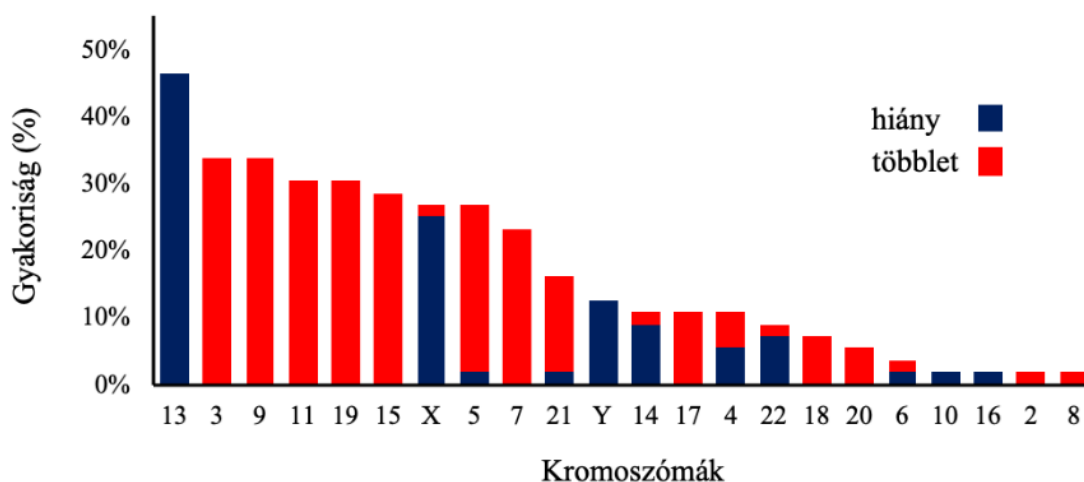
4.2.1. Numerikus kromoszóma eltérések detektálása

Vizsgálatunk során dMLPA-val összesen 210 teljes kromoszómát érintő aberrációt detektáltunk 47 betegben (84%), melyből 65 hiánynak, 145 többletnek mutatkozott. Leggyakoribb eltérés a 13-as kromoszóma monoszómiája volt, mely az esetek többségében a nem HD esetekben fordult elő. A triszómiák döntő többsége (94%) a húsz HD kariotípusú betegben volt megfigyelhető. Ezen esetekben a páratlan számú kromoszómák addicionális kópiái mutatkoztak (9. ábra), leggyakrabban a 3-as és 9-es kromoszómák triszómiái fordultak elő, melyeket csökkenő gyakorisággal követtek a 11-es, 19-es, 15-ös, 5-ös, 7-es és 21-es kromoszómák többletei (10. ábra).



9. ábra. Hiperdiploid dMLPA profil egy MM-ben szenvedő beteg demonstratív mintáján

A digitális MLPA a 3-as, 5-ös, 7-es, 9-es, 11-es, 15-ös, 19-es és 21-es kromoszómák többletét mutatta ki. A páratlan számú kromoszómák triszómiái jellemzőek a hiperdiploid kariotípust hordozó MM-es betegekre. A vizsgált, 15-ös sorszámú betegben a triszómiákon kívül 1p hiány, 1q többlet és 18q többletet is detektáltunk.



10. ábra. Számbeli kromoszómaaberrációk dMLPA-val megfigyelt gyakorisága MM-ben

A teljes kromoszóma hiányok és többletek kimutatását a digitális MLPA szondakeverék referencia szondái segítették, melyek lefedték minden kromoszóma centromer és telomer közeli régióit, valamint a kromoszóma karok középső tartományát. A 13-as kromoszóma monoszómiáján túl az eloszlást a páratlan kromoszómák triszómiái dominálták, mely jelenség az MM HD szubtypusának kifejezett jellemzője.

4.2.2. Szubkromoszómális kópiaszám eltérések

A dMLPA 246 szubkromoszómális CNA-t azonosított (5. táblázat). Az 1q többlet volt a leggyakrabban megfigyelt eltérés, 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 követtek (11. ábra). Esetenként átlagosan 4,4 CNA mutatkozott (tartomány: 0-13), mely átlag a hiperdiploid alcsoportban 3,7, a nem HD csoportban 4,8 volt. A dMLPA 53/56 (95%) esetben azonosított legalább egy szubkromoszómális CNA-t: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, ill. 13 aberráció 9, 7, 7, 4, 8, 6, 4, 1, 1, 4, 1, ill. 1 esetben volt azonosítható (5. táblázat) Tíz betegben biállélikus deléciók voltak megfigyelhetők, melyek a *CDKN2C*, *FAF1*, *BIRC3*, *TRAF3*, *CYLD* és *TP53* géneket érintették 2, 1, 2, 3, 2 és 1 esetben (6. táblázat).

5. táblázat. Digitális MLPA, MLPA és iFISH módszerekkel detektált genetikai aberrációk a vizsgált MM-ben szenvedő betegekben

Beteg	Nem	PC %	HD	Triszómiák HD esetekben	<i>IGH</i> transzlokáció	1p hiány / 1q többlet			12p hiány		Δ13			16q hiány		17p hiány		
					F	F	M	dM	M	dM	F	M	dM	M	dM	F	M	dM
1	N	70	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/+	-/+	+/+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	N	35	-		ismeretlen partner	-/-	-/-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3	N	56	-		ismeretlen partner	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	N	80	-		negatív	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	N	35	-		<i>IGH/MAF</i>	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
6	F	33	+	5,7,15,19	negatív	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
7	N	35	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
8	N	38	+	3,5,7,9,11,15,19,21	negatív	-/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	N	45	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
10	F	56	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/-	-/-	-/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11	N	43	+	7,15,19	negatív	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
12	F	40	-		negatív	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
13	N	35	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
14	F	52	-		ismeretlen partner	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
15	F	64	+	3,5,7,9,11,15,19,21	negatív	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	F	68	-		negatív	-/+	-/+	-/+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	N	53	-		<i>IGH/MAF</i>	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
18	F	28	+	3,5,7,9,11,15,19,21	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	F	60	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5. táblázat folytatása.

Beteg	Nem	PC %	HD	Triszómiák HD esetekben	<i>IGH</i> transzlokáció	1p hiány / 1q többlet			12p hiány		Δ13			16q hiány		17p hiány		
					F	F	M	dM	M	dM	F	M	dM	M	dM	F	M	dM
20	F	65	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
21	N	45	-		negatív	+/+	+/+	+/+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
22	N	29	+	9,11,18,19	negatív	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
23	F	41	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	N	21	+	3,7,9,11,14,17,19	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	N	25	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/+	-/+	-/+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
26	F	58	+	3,5,7,9,11,15,19,21	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
27	N	39	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/-	-/-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
28	F	78	-		negatív	+/+	+/+	+/+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	F	71	+	3,5,6,9,11,17,19,20	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	F	28	+	3,5,9,11,15,17,19	negatív	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	F	52	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
32	F	57	+	3,5,7,8,9,11,15,19,20,21	negatív	-/+	+/+	+/+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
33	N	46	-		<i>IGH/CCND1</i>	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
34	N	44	-		negatív	+/-	+/+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	F	31	-		<i>IGH/FGFR3-MMSET</i>	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
36	N	56	-		negatív	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
37	N	29	-		negatív	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	N	82	-		<i>IGH/MAF</i>	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

5. táblázat folytatása.

Beteg	Nem	PC %	HD	Triszómiák HD esetekben	IGH transzlokáció	1p hiány / 1q többlet			12p hiány		Δ13			16q hiány		17p hiány		
					F	F	M	dM	M	dM	F	M	dM	M	dM	F	M	dM
39	N	55	-		IGH/CCND1	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
40	F	43	-		IGH/MAF	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
41	F	26	+	3,4,5,7,9,11,15,18,19	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	F	32	+	2,3,5,7,9,11,15,19,20,X	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
43	F	59	+	3,5,7,9,15	negatív	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
44	F	34	+	3,11,15,17,18,19	negatív	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
45	N	89	-		IGH/CCND1	-/-	-/-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
46	F	31	-		IGH/CCND1	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	N	70	-		negatív	+/+	+/+	+/+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
48	F	72	-		ismeretlen partner	+/+	+/+	+/+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49	N	46	+	3,5,7,9,11,15,17,19	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
50	F	68	+	3,4,5,9,15,19	negatív	-/+	-/+	-/+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
51	N	42	-		IGH/FGFR3-MMSET	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
52	N	55	+	3,5,7,9,11,15,21	ismeretlen partner	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
53	F	72	-		ismeretlen partner	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
54	N	79	-		IGH/CCND1	-/+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
55	N	39	+	3,9,11,18,22	negatív	-/-	-/-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
56	N	33	+	3,9,11,15,19	negatív	-/+	-/+	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

5. táblázat folytatása.

Beteg	További eltérések		
	F	M	dM
1			-X, 6q hiány, 8p vesztes, 8q nyerés
2			14q nyerés
3			
4		16q nyerés	-X, 14q nyerés, 18p vesztes
5			-14
6			8p vesztes, 9q nyerés, 14q nyerés, 20p vesztes, 22q vesztes, Xq nyerés
7	-5	5q vesztes	-5
8			
9			-X, +4, +9, -10
10			14q nyerés
11			-X, 8p vesztes, 10q vesztes, 14q vesztes, 20p vesztes
12			+3, -14, -Y
13			+9, 11p nyerés, 20p vesztes
14	5q nyerés (20%)		2q vesztes, 20q vesztes
15			18q nyerés
16	5q nyerés	5q nyerés	3p vesztes, 5q nyerés, -14, 17q vesztes, -Y
17			-X, Xq nyerés, 2q vesztes, 8p vesztes, 9q nyerés, -14, 18p vesztes, 18p nyerés, 20q vesztes
18			
19			6q vesztes, 12q vesztes

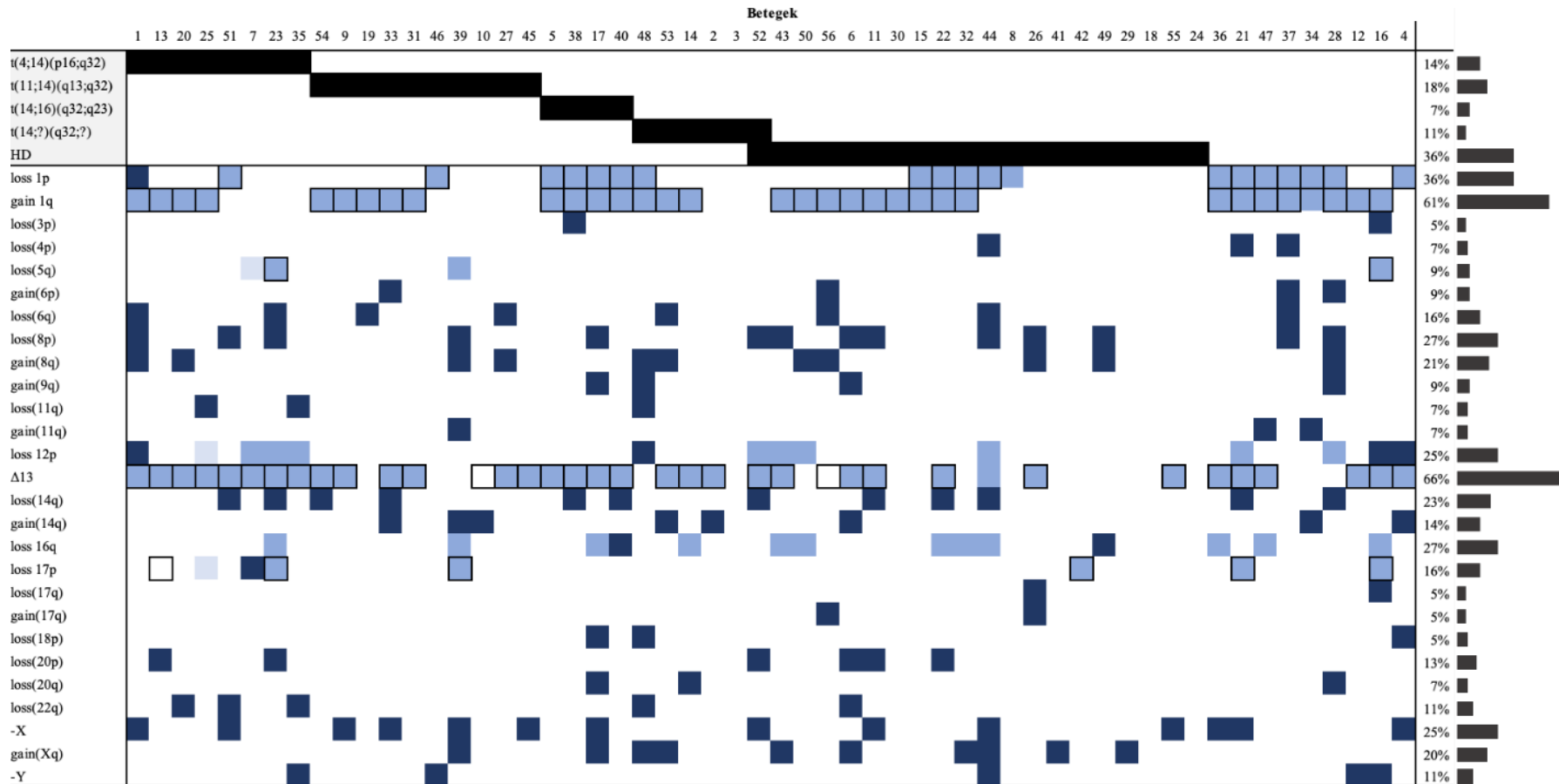
5. táblázat folytatása.

Beteg	További eltérések		
	F	M	dM
20			8q nyerés, 18q nyerés, 22q vesztés
21			-X, 3p nyerés, 4p vesztés, 10p vesztés, 14q vesztés, -22
22			3p nyerés, 14q vesztés, 20p vesztés
23	5q nyerés	5q nyerés	5p nyerés, 5q nyerés, 6q nyerés, 7q nyerés, 8p vesztés, 14q vesztés, 20p vesztés, -22
24			
25			+3, 6q nyerés, 11q vesztés
26			8p vesztés, 8q nyerés, 12p nyerés, 12q vesztés, 17q vesztés, 17q nyerés
27		16q nyerés	6q vesztés, 8q nyerés, 16q nyerés
28			3q nyerés, 4q vesztés, 6p nyerés, 8p vesztés, 8q nyerés, 9q nyerés, 14q vesztés, 19p nyerés, 20q vesztés, 20q nyerés, +21, -22
29			Xq nyerés, 17p vesztés (<i>TP53</i> nem érintett)
30			
31			
32			Xq nyerés
33			-X, 6p nyerés, 14q vesztés, 14q nyerés
34			11q nyerés, 12p nyerés, 14q nyerés
35			-Y, 11q vesztés, 22q vesztés
36			-X, 1q vesztés, 3p nyerés, -4, 10p vesztés, 10q vesztés, +11, 11p vesztés, 13q nyerés, 16p vesztés, 16p nyerés, -22
37			4p vesztés, 6p nyerés, 6q nyerés, 8p vesztés
38			3p vesztés, -4, 14q vesztés, +17, 18p nyerés, 18q nyerés, +21

5. táblázat folytatása.

Beteg	További eltérések		
	iFISH	MLPA	dMLPA
39		5q nyerés	-X, Xq nyerés, 4q vesztés, 5q nyerés, 8p vesztés, 8q nyerés, 11q nyerés, 14q nyerés
40			-4, 14q vesztés
41			Xq nyerés
42			18q nyerés
43			Xq nyerés, -4, 8p vesztés, 8q vesztés, 19p nyerés
44			-X, Xq nyerés, -Y, 4p vesztés, 4q vesztés, 6q nyerés, 8p vesztés, 14q vesztés, 16p vesztés
45			-X
46			-Y
47			-6, 9p vesztés, 9q vesztés, 11q nyerés
48			Xq nyerés, 8q nyerés, 9q nyerés, 10p vesztés, 11q vesztés, 18p vesztés, 22q vesztés
49			8p vesztés, 8q nyerés
50			6q nyerés, 8q nyerés
51			-X, 3p nyerés, 8p vesztés, -14, 14q vesztés, -21, 22q vesztés
52			-X, 8p vesztés, 14q vesztés, 19p nyerés, 20p vesztés
53			Xq nyerés, 6q vesztés, 7q nyerés, 8q nyerés, 14q nyerés
54			14q vesztés
55			-X
56			6p nyerés, 6q vesztés, 8q nyerés, 17q nyerés

PC: plazma sejt; HD: hiperdiploid; F: interfázis fluoreszcencia in situ hibridizáció; M: multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció; dM: digitális multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció; *IGH*: immunoglobulin nehézlánc gén, *FGFR3*: fibroblast growth factor receptor 3; *MMSET*: multiple myeloma SET domain; *MAF*: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog; *CCND1*: Cyclin D1



11. ábra. dMLPA, MLPA és iFISH módszerekkel detektált, visszatérő aberrációk MM-ben

Leggyakoribb észlelt eltérés a 13-as kromoszóma deléciója volt, melyet két esetben egyedül iFISH vizsgálat mutatott ki, a fennmaradó betegek esetében a dMLPA, MLPA és iFISH módszerek kongruens eredményt mutattak.

Jelmagyarázat:

- iFISH
- MLPA
- MLPA+dMLPA
- dMLPA
- iFISH+MLPA+dMLPA
- iFISH-el detektált transzlokáció

6. táblázat. Digitális MLPA módszerrel kimutatott biallélikus deléciók MM-ben

Beteg sorszám	Kromoszóma kar	Érintett gének
21	1p	<i>CDKN2C</i>
47	1p	<i>FAF1, CDKN2C</i>
25	11q	<i>BIRC3</i>
35	11q	<i>BIRC3</i>
23	14q	<i>TRAF3</i>
40	14q	<i>TRAF3</i>
51	14q	<i>TRAF3</i>
32	16q	<i>CYLD</i>
50	16q	<i>CYLD</i>
16	17p	<i>TP53</i>

4.2.3. Az 1-es kromoszóma kópiaszám eltéréseinek részletes feltérképezése

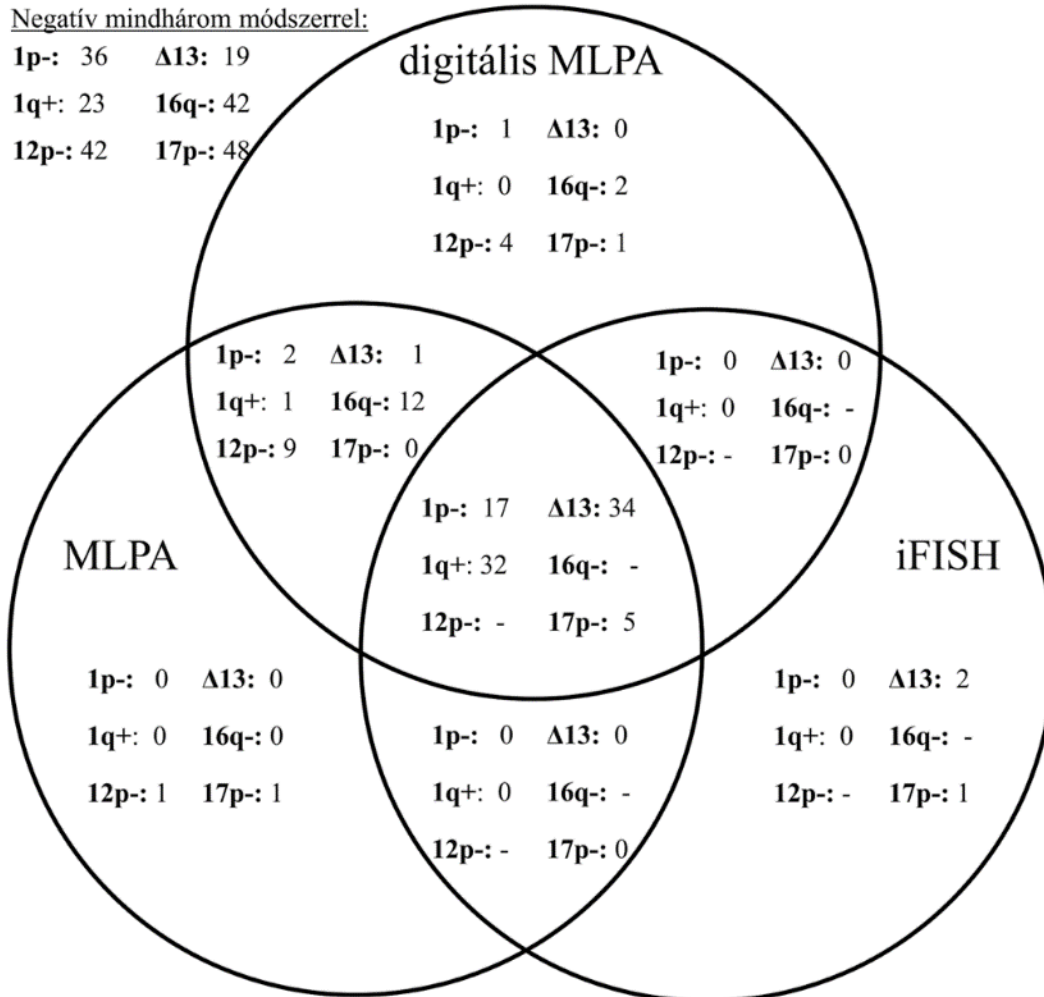
Az alkalmazott D006 dMLPA szondakeverék az 1-es kromoszómán 44 különböző genomikus lókuszt fed le, 19 szonda a rövid, 25 a hosszú kar eltérő régióit. Ebből adódóan lehetőségünk volt részletesen vizsgálni az 1-es kromoszómát érintő kópiaszám eltérések kiterjedését, lokalizációját és allélarányát. Összesen 38 mintában mutattunk ki 1-es kromoszómát érintő eltéréseket, 1p hiány 20, 1q többlet 33 esetben fordult elő. Mind a két kart érintő aberrációkat 15 esetben azonosítottunk. A szondák egy része 15 esetben csak a rövid, 7 esetben pedig csak a hosszú karon mutatott ki aberrációt. A fennmaradó esetekben a karon minden szonda érintett volt, beleértve a pericentromerikus és telomerikus elhelyezkedésű szondákat is. Kromoszóma karon belüli nem folytonos eltéréseket 3 beteg mintájában észleltünk. Szubklonális hiányt 1, biallélikus hiányt 2 esetben mutattunk ki, míg több mint 3 kópiát eredményező, iFISH vizsgálattal is validált 1q többletet 12 esetben detektáltunk. Különböző allélarányú kópiaszám eltérések a 21-es, 25-ös és 47-es betegekben voltak azonosíthatók. A rövid karon deléciók leggyakrabban a következő régiókban elhelyezkedő géneket érintették: 1p12 (*FAM46C*) és 1p21 (*DPYD* és *COL11A1*), melyet gyakoriságban az 1p32 (*FAF1* and *CDKN2C*) követett. A hosszú kar többletei leginkább a következő régiókban helyezkedtek el: 1q21 (*BCL9, ANP32E, MCL1, NUP210L, ADAR* és *CKS1B*) és 1q23 (*SLAMF7, NUF2* és *PBX1*). Az 1-es kromoszóma kópiaszám eltéréseinek különböző jellemzőit vizsgálva a 24 minta között nagy változatosságot és több különböző mintázatot mutattunk ki elhelyezkedés, allélarány és kiterjedés tekintetében.

4.2.4. dMLPA, MLPA és iFISH eredmények összevetése

A dMLPA módszer hatékonyságának megítélése, illetve eredményeinek validálása érdekében a módszert a jelenleg rutin diagnosztikában alkalmazott iFISH és konvencionális MLPA-val szerzett adatokkal vetettük össze. Konvencionális MLPA-val a dMLPA által vizsgált eltérések csupán egy része analizálható, azonban az ugyanahhoz a régióhoz kapcsolódó szondák ligációs helyei eltérőek, így ezen esetekben lehetséges a dMLPA-val nyert eredmények konvencionális MLPA-val való validációja. A konvencionális MLPA így 121 aberrációt azonosított 49 betegben (88%) melyek közül a $\Delta 13$ volt a leggyakoribb, melyet gyakoriság szerint csökkenő sorrendben az 1q többlet, 1p hiány, 16q hiány, 12p hiány, 17p hiány és 5q hiány követett. Az iFISH 95 nem kiegyensúlyozott aberrációt detektált, melyek közül $\Delta 13$ 36, 1q többlet 32, 1p hiány 17, 17p hiány 6 és 5q hiány 4 betegben fordult elő. A 12p hiányt és a 16q hiányt iFISH-el nem vizsgáltuk, így a dMLPA módszer hatékonyságát direkt módon a konvencionális MLPA-hoz hasonlítva 6, iFISH-hez hasonlítva 4 eltérés tekintetében tudtuk vizsgálni. A három módszer összevetése alapján egybehangzó eredményeket kaptunk 319/336 adatpontban (56 beteg x 6 vizsgált eltérés) mely 95%-os kongruenciának felel meg (12. ábra). Az egyes módszerek szisztematikus, páronkénti összehasonlítása az egyes eltérések detektálásának tekintetében szintén magas statisztikai egyezést mutatott (Fischer-féle egzakt teszt: $p < 0,0001$). Az eltérések fő oka, hogy a dMLPA magasabb szondaszáma nagyobb biztonsággal teszi lehetővé a CNA-k azonosítását, és több, visszatérő genetikai eltérésekben érintett lókuszt fed le az iFISH-hez és konvencionális MLPA-hoz viszonyítva (pl.: *ETV6* és *CDKN1B* gének a 12p kromoszómán).

A dMLPA 20 betegmintában lehetővé tette a HD kariotípushoz társuló numerikus kromoszómaaberrációk kiterjedt vizsgálatát, mely iFISH és konvencionális MLPA módszerekkel az alacsony szondaszám következtében nem gazdaságos, így ezen adatok nem álltak rendelkezésre. Kizárólag a dMLPA vizsgálat a nem HD esetekben 58 teljes kromoszómát érintő aberrációt, HD és nem HD esetekben együttesen 156 szubkromoszómális eltérést azonosított, döntően az iFISH-hez és MLPA-hoz képest magasabb szondaszámának köszönhetően. Az iFISH azonban 28 olyan kiegyensúlyozott kromoszómaaberrációt mutatott ki, melyek azonosítása konvencionális MLPA-val és dMLPA-val nem lehetséges, beleértve az *IGH* gén különböző transzlokációit az *FGFR3-MMSET* génekkel 8, a *CCND1* génnel 10, a *c-MAF* génnel 4, egyéb ismeretlen partner

régiókkal pedig 6 esetben. Az 56 betegmintában detektált összes eltérést az 5. táblázat foglalja össze.

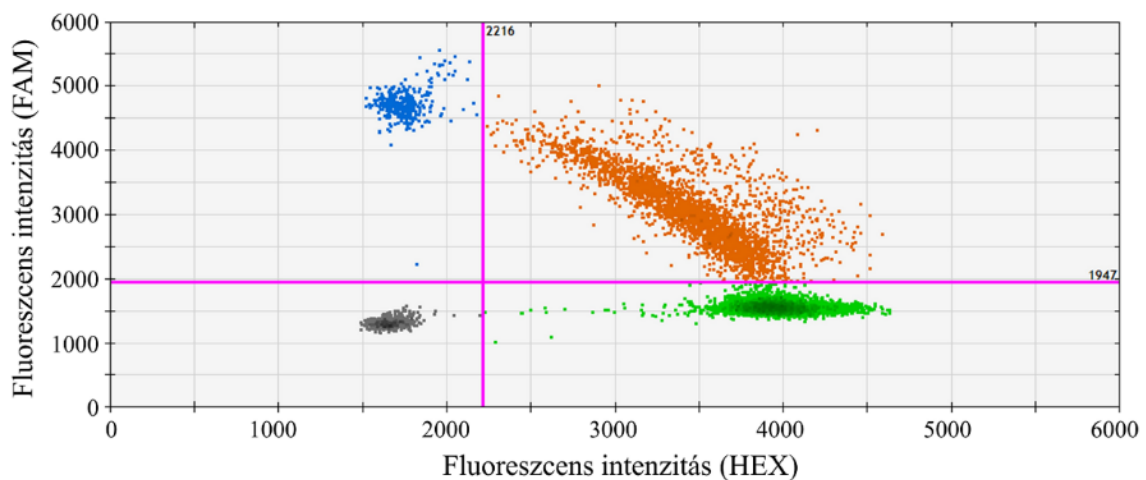


12. ábra. Digitális MLPA, MLPA és iFISH módszerekkel nyert eredmények összevetése MM-ben

Az 1p hiány, 1q többlet, 12 hiány, 13-as kromoszóma abnormalitásai ($\Delta 13$), 16q hiány és 17p hiány irányába végzett vizsgálatok eredményei az esetek 95, 98, 91, 95, 96 és 95%-ában mutattak egyezést. A feltüntetett értékek az adott aberrációra nézve pozitívnak bizonyult betegek számát mutatják. A 12p hiányt és 16q hiányt iFISH módszerrel nem vizsgáltuk.

4.2.5. *BRAF* V600E mutáció detektálása

A dMLPA D006 szondakeverék részét képezi egy *BRAF* gén 15-ös exonját lefedő szonda, mely a c.1799T>A (p.V600E) pontmutáció specifikus kimutatását teszi lehetővé. Ezt az eltérést két betegben (51 és 55) azonosítottuk dMLPA-val, azonban jelenlétét piroszekvenálással csupán az 51-es beteg mintájában sikerült validálnunk. Mivel a mutációt mindkét betegben két egymástól független dMLPA reakció is jelezte, a mutáció analízist ddPCR-rel is elvégeztük az 55-ös betegben, amely magasabb szenzitivitásából adódóan megerősítette a dMLPA vizsgálattal nyert eredményt (13. ábra).



13. ábra. *BRAF* V600E mutáció validálása digitális droplet PCR módszerrel az 55-ös számú MM-ben szenvedő beteg mintájában

A HEX, illetve FAM pozitív dropleték a vad, illetve mutációt hordozó molekulákat reprezentálják. A vizsgált DNS molekulák 12,9%-ában detektált a módszer mutáns *BRAF* allélt.

4.3. Gyermekkori ALL kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val

dMLPA-val mind a 105, gyermekkori ALL-ben szenvedő betegtől gyűjtött mintát (91 diagnosztikus és 14 relapszuskori minta) sikeresen analizáltuk. A szekvenálás során dMLPA szondáknaként átlagosan 861 NGS *read* keletkezett, mely lehetővé tette a mintákban előforduló CNA-k precíz meghatározását és analízisét. Egy, a szomatikus kromoszómáin 7 mono- és 2 biállélikus hiányt hordozó (51-es számú) beteg mintájából hígítási sorozatot készítettünk, a hígított mintákban a dMLPA 30%-os leukémiás

sejtarányig megbízhatóan észlelte a klonális kópiaszám eltéréseket (7. táblázat), mely határértéket minden általunk vizsgált minta tumorsejt aránya meghaladta.

7. táblázat. Eltérést jelző szondák relatív kópiaszám értékei az 51-es számú, ALL-ben szenvedő beteg diagnosztikus mintájának hígítási sorából

Gén; exon	Aberráció	Blasztarány (%)					határérték*
		81	50	30	20	10	
<i>CD200</i> ; 3,4,6	monoallélikus hiány	0,54	0,68	0,85	0,89	0,92	0,89
<i>BTLA</i> ; 2,5	monoallélikus hiány	0,52	0,72	0,80	0,90	0,95	0,91
<i>LEF1</i> ; 3	monoallélikus hiány	0,60	0,78	0,85	0,90	0,96	0,86
<i>IKZF1</i> ; 4-7	monoallélikus hiány	0,52	0,72	0,83	0,88	0,95	0,87
<i>MLLT3</i> ; 2,7	monoallélikus hiány	0,54	0,73	0,81	0,84	0,97	0,86
<i>CDKN2A</i> ; 2-5	monoallélikus hiány	0,56	0,71	0,82	0,89	0,96	0,88
<i>CDKN2A</i> ; 1 + up	biallélikus hiány	0,09	0,41	0,63	0,75	0,86	0,88
<i>CDKN2B</i> ; 1-2	biallélikus hiány	0,10	0,44	0,63	0,79	0,89	0,91
<i>PAX5</i> ; 1-10	monoallélikus hiány	0,53	0,70	0,82	0,88	0,92	0,88
<i>RBI</i> ; 19,24,26	biallélikus hiány	0,08	0,44	0,64	0,78	0,91	0,87
<i>TP53</i> ; 1-11	monoallélikus hiány	0,57	0,73	0,81	0,91	0,93	0,88
<i>VPREB1</i> ; 2	monoallélikus hiány	0,53	0,70	0,79	0,85	0,94	0,86

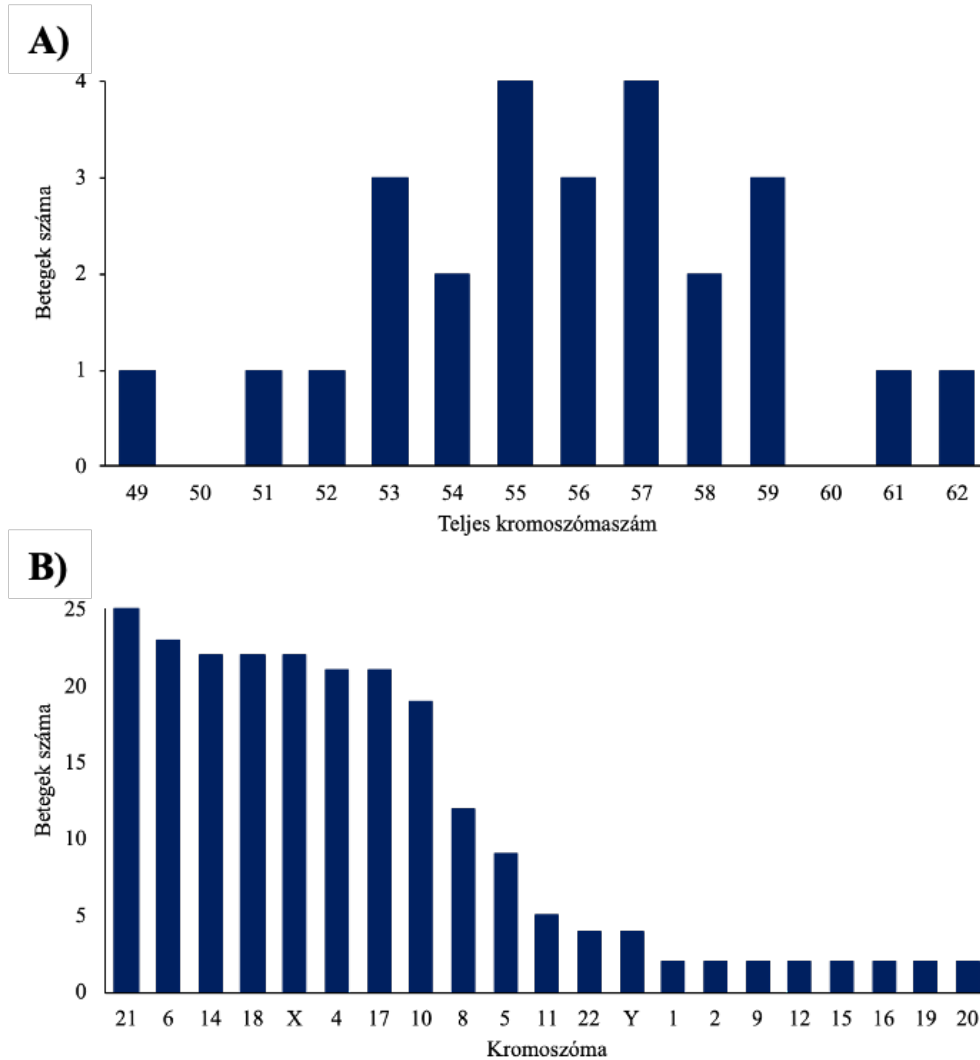
* A hiányok meghatározásához használt határértékek a negatív kontroll mintákban mért relatív kópiaszámok alapján, az átlag – 3 standard deviáció értékeket figyelembe véve lettek meghatározva. A sötétszürke háttér előtt félkövérrel írt értékek ennek alapján hiányként értékelendők.

4.3.1. Kópiaszám eltérések diagnosztikus betegmintákban

Vizsgálatunk során összesen 502 kópiaszám eltérést mutattunk ki 87/91 diagnosztikus mintában (96%) (B-ALL: 73/76, T-ALL 14/15), melyek közül 458-at B-ALL-ben, 44-et pedig T-ALL-ben azonosítottunk. Átlagosan betegenként 5,4 CNA-t észleltünk (B-ALL: 6, T-ALL: 2,6), míg a szubkromozómális eltérések átlagos betegenkénti előfordulása 2,8 volt (B-ALL: 2,9; T-ALL: 2,5).

A teljes kromozómát érintő aberrációk azonosítását a dMLPA D007 szondakeverék kariotipizáló szondái segítették, melyek minden kromozómán a telomer, centromer és a kar középső régiójához hibridizálódnak. A teljes kromozómát érintő eltérések 95%-át HD kariotípusú betegekben azonosítottuk (3-14 érintett kromozóma betegenként), melyek a HD ALL-re jellemzően, döntően az X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 és 21-es kromozómák többletei voltak. Többszörös többlet az X, 18-as és 21-es

kromoszómaánál volt megfigyelhető. A teljes kromoszómaszám a 27 HD betegben 49 és 62 között változott (medián érték: 56) (14. ábra).



14. ábra. Teljes kromoszómaszámok és a teljes kromoszómákat érintő többletek gyakorisága HD prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedő betegekben

(A) A dMLPA-val meghatározott teljes kromoszómaszám alapján egy kivétellel minden beteg HD kariotípusú volt 51 és 67 közötti kromoszómaszámmal. (B) A kromoszómatöbbletekért döntően at X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 és 21-es kromoszómák extra kópiái feleltek. A diagnózis felállítása során a betegek HD státuszát kariotipizálás és/vagy DNS index vizsgálattal határoztuk meg.

Szubkromoszómális CNA-kat 77 betegben azonosítottunk (B-ALL: 63, T-ALL: 14), B-ALL-es betegek mintáiban összesen 218-at, T-ALL-es esetekben 33-at. A leggyakoribb eltérés a *CDKN2A/B* hiány volt, mely B-ALL-ben 38%-ban, T-ALL-ben

87%-ban fordult elő. További eltérések gyakoriság szerinti csökkenő sorrendben a különböző sejtciklus szabályozásért, limfoid sejtek éréséért, jelátviteli útvonalak és tumorszupressziós folyamatok szabályozásáért felelős gének aberrációi voltak, úgymint az *ABL1*, *BTG1*, *CASP8AP2*, *CD200/BTLA*, *ETV6*, *IKZF1*, *LEF1*, *MLLT3*, *NF1*, *PAX5*, *PHF6*, *PTEN*, *PTPN2*, *RBI*, *RUNX1*, *TBLX1*, *TP53* és *VPREB1*, illetve a *PAR1* régió (8. táblázat). Biallélikus hiány 36 beteg diagnosztikus mintájában volt jelen (B-ALL: 23, T-ALL: 13), mely eltérések körülbelül kétharmada a 9p21-es régiót érintette (*CDKN2A/B* és *MLLT3*). B-ALL-ben további biallélikus hiányt a *VPREB1*, *RBI*, *IKZF2* és *TBLX1* génekben, T-ALL-ben a *PTPN2*, *PHF6*, *LEF1* és *RBI* génekben azonosítottunk.

8. táblázat. dMLPA-val gyermekkori ALL-ben detektált szubkromoszómális CNÁ-k előfordulása gyakoriság szerint

Lézió	Gén	B-ALL (N = 76)	T-ALL (N = 15)
Hiány	<i>CDKN2A/B</i>	29	13
	<i>VPREB1</i>	29	1
	<i>ETV6</i>	24	0
	<i>PAX5</i>	18	0
	<i>MLLT3</i>	13	3
	<i>IKZF1</i>	11	1
	<i>BTLA/CD200</i>	10	0
	<i>TBL1XR1</i>	10	0
	<i>RB1</i>	8	2
	<i>CASP8AP2</i>	7	2
	<i>BTG1</i>	6	0
	<i>PAR1</i>	5	0
	<i>TP53</i>	3	1
	<i>PTEN</i>	1	3
	<i>NF1</i>	3	0
	<i>LEF1</i>	2	1
	<i>PTPN2</i>	1	2
	<i>PHF6</i>	0	3
	<i>EZH2</i>	2	0
	<i>SUZ12</i>	2	0
	<i>EBF1</i>	1	0
	<i>IKZF2</i>	1	0
	<i>NR3C2</i>	1	0
<i>ERG</i>	1	0	
<i>NOTCH1</i>	0	1	
Többlet	<i>RUNX1</i>	11	0
	<i>ABL1</i>	3	0
	<i>MYB</i>	0	1

A kópiaszám eltérések feltérképezésén túl a dMLPA D007-es szondakeverék lehetőséget ad kópiaszám eltérésekkel együtt megjelenő fúziós gének indirekt detektálására is. Intrakromoszómális fúziós gén jelenlétére utaló szubkromoszómális aberrációt 5 T-ALL-ben szenvedő beteg mintájában azonosítottunk. *STIL-TAL1* génfúziót a 77-es és 78-as betegnél mutattunk ki, amplifikálódott fúziós gén jelenlétét a meghatározott relatív kópiaszámok alapján a *NUP214* és *ABL1* gének esetében detektáltunk a 81-es, 83-as és 84-es betegek mintájában.

4.3.2. Diagnózis és relapszuskori minták kópiaszám eltéréseinek összehasonlítása

Összesen 12 beteg (B-ALL: 8, T-ALL: 4) 26 diagnózis és relapszuskori mintapárját vizsgáltunk (9. táblázat). Kromoszómális és szubkromoszómális kópiaszám eltéréseket 11 betegben azonosítottunk, 1 betegnél minden vizsgált mintában normál kópiaszámot észleltünk. Teljes kromoszómákat érintő eltéréseket egyedül HD B-ALL-es betegek mintáiban figyeltünk meg (22-es, 23-as, 24-es, 25-ös és 26-os betegek). Ezen betegek közül három esetében a kromoszóma többletek stabilnak bizonyultak, míg a 23-as betegnél a 8-as kromoszóma relatív kópiaszám emelkedése alapján a relapszuskori mintában egy extra többlet mutatkozott. A 26-os betegnél 6 különböző kromoszóma kópiaszám változását detektáltuk a diagnózis és az első relapszus ideje között. A 11 kimutatható CNA-t hordozó betegben a detektált szubkromoszómális eltérések száma 1 és 11 között változott (a biallélikus eltéréseket két külön eseményként vettük figyelembe), a relapszuskori mintákban emelkedett számú aberráció mellett (átlag: 3,5 vs 5,1). Ezzel összhangban nagyobb számú biallélikus hiányt figyeltünk meg a betegség progressziójakor 3 betegben (22-es, 57-es és 58-as betegek). B-ALL-es betegek kizárólag relapszuskori mintáiban megjelenő kópiaszám eltérések a B-sejt differenciációban, sejtciklus és tumorszuppressziós folyamatok szabályozásáért felelős génekben mutatkoztak, mint az *EBF1*, *ETV6*, *CDKN2A/B*, *IKZF1*, *PAX5* és *PTEN*, míg T-ALL-ben a *MYB* többlet, illetve a *NUP214-ABL1* fúzió és az *IKZF1*, *TP53* és *PTPN2* géneket érintő hiányok voltak megfigyelhetők.

9. táblázat. dMLPA-val azonosított kópiaszám eltérések diagnózis- és relapszuskori ALL mintapárokban

Beteg ID / időpont	Nem / Kor (év)	Diagnózis	Relapszusig eltelt idő	Genetikai eltérések	Klonális viszony
#22 / Dx	Lány / 6	B-ALL		+X, dup(1)(q21q44), +6, del(9)(p21), +10, +14, +17, +18, +18, +21, +21	Klonális evolúció
#22 / Rel			37 hónap	+X, dup(1)(q21q44), +6, del(9)(p21), <u>del(9)(p13p21)</u> , +10, +14, +17, +18, +18, +21, +21	
#23 / Dx	Fiú / 4	B-ALL		+X, +X, +4, +5, del(7)(p12), +8, +14, +17, +18, +21, +22	Klonális evolúció
#23 / Rel			43 hónap	+X, +X, +4, +5, del(7)(p12), +8, <u>+8</u> , +14, +17, +18, +21, +22	
#24 / Dx	Lány / 7	B-ALL		+X, +X, +4, +5, +6, <u>del(7)(p12)*</u> , +10, +14, +17, +18, +18, +20, +21, +21	Közös eredetet követő párhuzamos evolúció
#24 / Rel			17 hónap	+X, +X, +4, +5, <u>del(5)(q31q35)</u> , +6, +10, <u>del(10)(q22q26)</u> , +14, +17, +18, +18, +20, +21, +21	
#25 / Dx	Fiú / 2	B-ALL		+X, dup(1)(q21q44), +4, +6, +8, +10, +14, +17, +18, +18, +21, +21	Klonális evolúció
#25 / Rel			52 hónap	+X, dup(1)(q21q44), +4, <u>+5</u> , +6, +8, <u>del(9)(p21)</u> , +10, +14, +17, +18, +18, +21, +21	
#26 / Dx	Fiú / 12	B-ALL		+X, +Y, <u>+1</u> , <u>+2</u> , del(3)(q26), del(3)(q26), <u>+5</u> , <u>+6</u> , del(9)(p21), del(9)(p21), <u>dup(9)(q21q34)</u> , +10, +11, +15, +18, +19, +21, +21, +22	Közös eredetet követő párhuzamos evolúció
#26 / Rel1			18 hónap	+X, +Y, <u>dup(1)(p36)</u> , <u>dup(1)(q21)</u> , <u>dup(1)(q21)</u> , del(3)(q26), del(3)(q26), <u>+5</u> , <u>+8</u> , del(9)(p21), del(9)(p21), <u>dup(9)(q21q34)</u> , +11, +15, +18, +19, +21, +21	
#26 / Rel2			25 hónap	+X, +Y, <u>dup(1)(p36)</u> , <u>dup(1)(q21)</u> , <u>dup(1)(q21)</u> , del(3)(q26), del(3)(q26), <u>dup(5)(q31q35)</u> , <u>+6</u> , <u>+8</u> , del(9)(p21), del(9)(p21), +11, <u>+14</u> , +15, +18, +19, <u>+20</u> , +21, +21	

.9. táblázat folytatása.

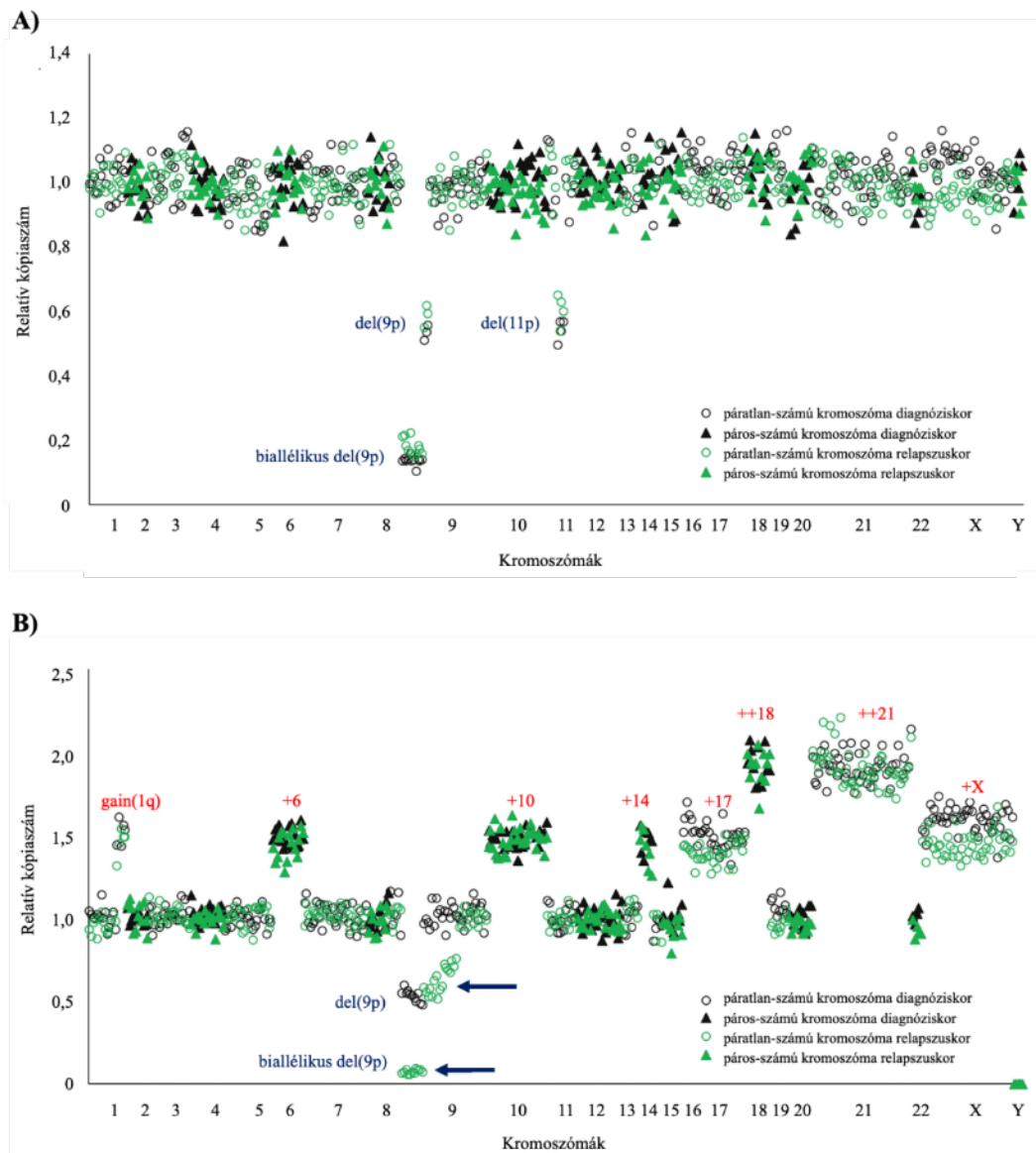
Beteg ID / időpont	Nem / Kor (év)	Diagnózis	Relapszusig eltelt idő	Genetikai eltérések	Klonális viszony
#58 / Dx	Lány / 15	B-ALL		del(X)(p22), del(3)(q13), del(7)(p12), del(9)(p13p24), del(9)(p21), del(12)(p13), del(12)(q21), del(22)(q11)	
#58 / Rel			13 hónap	del(X)(p22), del(3)(q13), del(7)(p12), <u>del(7)(p12p22)</u> , del(9)(p13p24), del(9)(p21), del(12)(p13), <u>del(12)(p12p13)</u> , del(12)(q21), del(22)(q11)	Klonális evolúció
#76 / Dx	Fiú / 5	B-ALL		del(7)(p12)*, <u>del(12)(q21)</u>	
#76 / Rel			61 hónap	del(7)(p12), <u>del(12)(p13)</u>	Közös eredetet követő párhuzamos evolúció
#88 / Dx	Fiú / 9	T-ALL		del(9)(p21), del(9)(p21), del(11)(p12p13)	
#88 / Rel			5 hónap	del(9)(p21), del(9)(p21), del(11)(p12p13)	Azonos klón
#89 / Dx	Fiú / 7	T-ALL		del(5)(q35), del(7)(p12), del(9)(p21), del(9)(p21), del(16)(q22)	
#89 / Rel			17 hónap	del(5)(q35), <u>dup(6)(q23)</u> , del(7)(p12), del(9)(p21), del(9)(p21), del(16)(q22)	Klonális evolúció
#90 / Dx	Fiú / 4	T-ALL		-	
#90 / Rel			5 hónap	-	Nem meghatározható
#91 / Dx	Fiú / 13	T-ALL		del(X)(q26), del(9)(p21), del(9)(p21), <u>del(13)(q14)</u>	
#91 / Rel1			29 hónap	del(X)(q26), <u>del(7)(p12)</u> , del(9)(p21), del(9)(p21), <u>del(18)(p11)</u>	Közös eredetet követő
#91 / Rel2			50 hónap	del(X)(q26), <u>del(7)(p12)</u> , del(9)(p21), del(9)(p21), <u>dup(9)(q21q34)</u> , <u>del(17)(p11p13)</u> , <u>del(18)(p11)</u>	párhuzamos evolúció & Klonális evolúció

*szubklonális eltérés.

Az aláhúzott CNA-k nem szerepelnek az adott beteg minden mintájában.

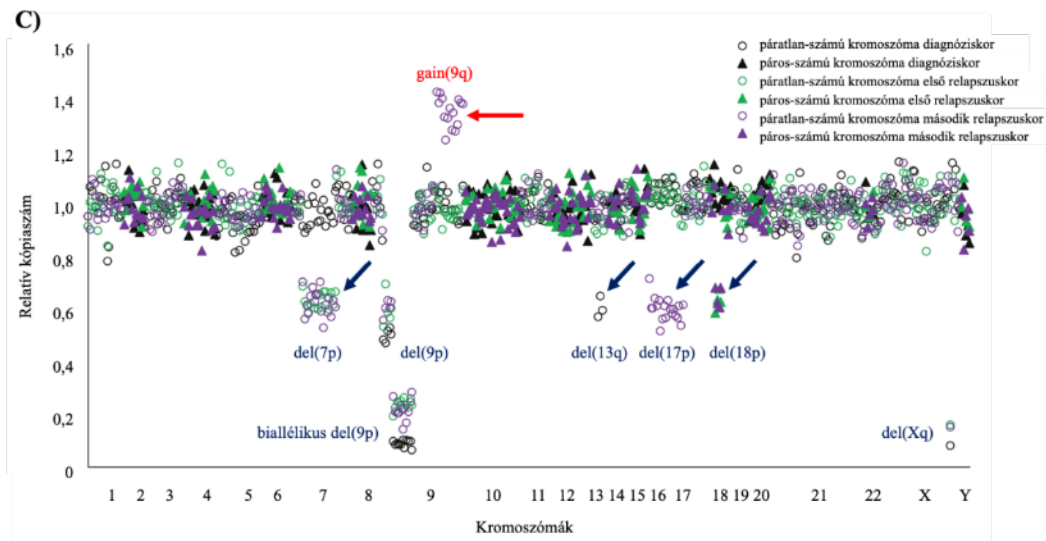
A klonális viszonyok meghatározása a minták dMLPA profilja alapján történt.

A diagnózis- és relapszuskori minták összehasonlító vizsgálata, és a közöttük fennálló klonális összefüggések feltárása során három különböző mintázatot azonosítottunk: (i) a 88-as beteg diagnózis- és relapszuskori mintáiban teljesen azonos kópiaszám eltérések voltak azonosíthatók (15. ábra /A); (ii) hat beteg (22-es, 23-as, 25-ös, 57-es, 58-as és 89-es betegek) a diagnóziskori mintájában jelenlévő CNA-k közül mindegyik jelen volt a relapszuskor is, ezen felül azonban megjelentek új eltérések is (15. ábra /B); (iii) négy beteg (24-es, 26-os, 76-os és 91-es) relapszuskori mintájában az újonnan megjelenő aberrációk mellett a diagnóziskori eltéréseknek csak egy része volt kimutatható. Ennek legvalószínűbb magyarázata az, hogy a relapszus idején uralkodó szubklón és a diagnóziskori mintában domináns sejtek egy közös korábbi klónból, párhuzamos evolúcióval alakultak ki (15. ábra /C). Két betegnél 3 időpillanattól is rendelkezésre álltak minták, így ezen esetekben a betegség második relapszusakor is lehetőség nyílt a CNA-k vizsgálatára. A 26-os betegben a második relapszuskor megjelenő leukémiás sejtpopuláció feltehetőleg egy korábbi közös sejtpopulációból alakult ki, míg a 91-es betegben az első és második relapszus során látott CNA profilok direkt klonális kapcsolatot valószínűsítene (15. ábra /C).



15. ábra. dMLPA-val azonosított kópiaszám eltérések diagnózis és relapszus idején vett T- és B-ALL-es betegmintákban

(A) A 88-as számú, T-ALL-ben szenvedő beteg diagnózis és relapszus kori (5. hónap) mintáiban azonosított mono- és biallélikus deléció a 9-es kromoszómán (9p21; *CDKN2A*), és monoallélikus hiány a 11-es kromoszómán (11p12-13; *RAG2*, *SLC1A2* és *CD44*). (B) HD kariotípus a 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, 18-as, 21-es és X kromoszómák extra kópiáival, illetve egy monoallélikus hiánnyal a 9-es kromoszómán (9p21; *CDKN2A*), a 22-as számú B-ALL-ben szenvedő beteg diagnóziskori mintájában. Relapszuskor (37. hónap) további mono- és biallélikus kópiaszám hiányok jelentek meg a 9-es kromoszómán, mely a másik allélt érintő kiterjedtebb deléció (9p13-21; számos érintett gén, mint a *CDKN2A/B* és *PAX5*) következtében jött létre.

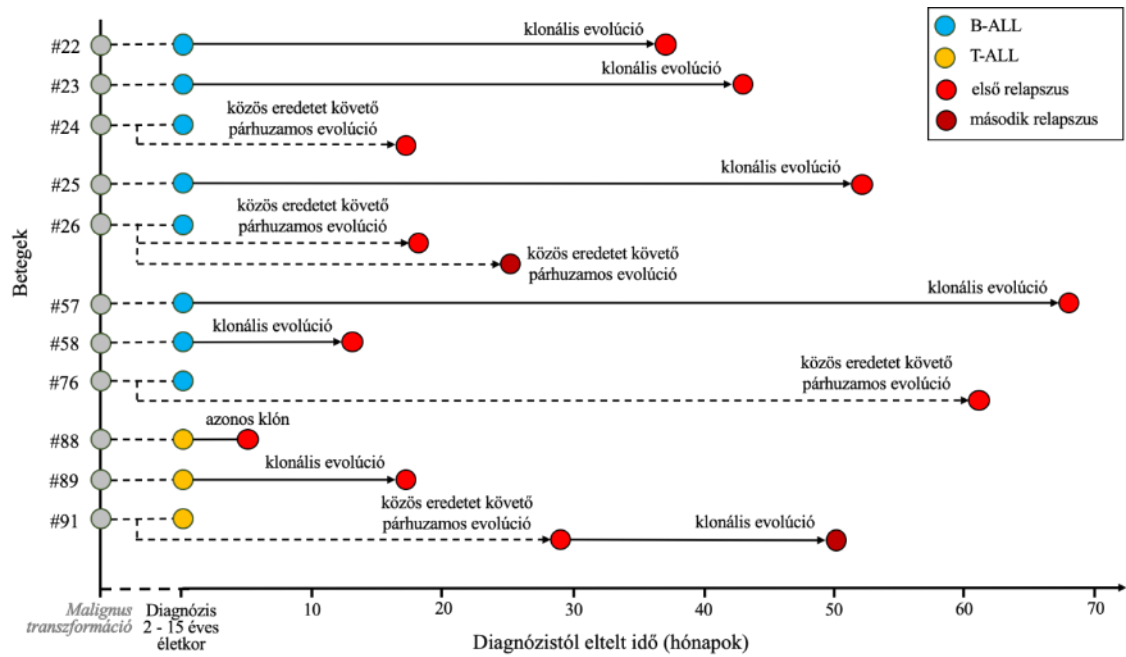


15. ábra folytatása.

(C) A 91-es számú, T-ALL-ben szenvedő beteg diagnóziskori mintájában monoallélikus deléciót azonosítottunk a 9-es (9p21, *CDKN2A*), a 13-as (13q14; *RBI*) és X kromoszómákon (Xq26; *PHF6*), valamint biállélikus hiányt a 9-es kromoszómán (9p21; *CDKN2A* és *CDKN2B*). Az első relapszus idejében (29 hónap) további monoallélikus hiány jelent meg a 7-es (7p12; *IKZF1*) és 18-as (18p11; *PTPN2*) kromoszómákon. A második relapszus idején (50. hónap) új eltérésként a 9-es kromoszóma monoallélikus többletét (9q21-34; számos érintett gén, mint a *ABL1*, *NUP214* és *NOTCH1*), és a 17-es kromoszóma (17p11-13; számos érintett gén, mint a *TP53*) monoallélikus delécióját mutattuk ki. A beteg diagnóziskori mintájában megfigyelt 13-as kromoszóma hiányt a relapszusok idejéből származó mintákban nem azonosítottuk.

A vörös és kék nyilakkal a különböző időpillanatban vett mintákban nem egységesen megjelenő eltéréseket jelöltük.

A T-ALL diagnózisa és az első relapszus között eltelt idő a relapszus háttérében klonális evolúcióra jellemző, vagy közös eredetet követő párhuzamos evolúciót feltételező CNA mintázat esetében igen megnyúlt volt (89-es beteg, 17 hónap; 91-es beteg, 29 hónap). Ezzel szemben azonos klón visszatérésével járó relapszusban (88-as beteg) a betegség már a kezelést követő 5. hónapban visszatért (*16. ábra*). A 90-es betegben a diagnózis és az igen rövid idő alatt bekövetkező relapszus (5 hónap) idejéből származó mintában egyaránt normális kópiaszám értékeket detektáltunk. Mindezen megfigyeléseink alapján feltételezhető, hogy az előbbi, komplex klonális szelekción, illetve direkt klonális evolúción alapuló betegség progressziója több időt vesz igénybe, míg a diagnóziskor domináns klón újabb, relapszushoz vezető expansziója igen gyorsan végbemehet. Ehhez hasonló trend a diagnózis és relapszus közötti időket illetően az általunk vizsgált B-ALL-es betegekben nem volt megfigyelhető.



16. ábra. Diagnózis- és relapszuskori sejtek klonális viszonyai a detektált CNA-k alapján T- és B-ALL-ben szenvedő betegek mintapárjaiban

A gyermekkori ALL kialakulása során a malignus transzformáció gyakran már méhen belül megkezdődik, és limitált klonális expanszió keresztül heterogén genetikai háttérrel, elágazó klonális szerkezettel rendelkező pre-leukémiás sejtpopuláció kialakulásához vezet. A klinikailag manifeszt leukémia megjelenése általában másodlagos aberrációk következtében jön létre, melyek szelektív proliferációs előnnyel ruházzák fel az érintett sejteket. Ennek megfelelően a betegség relapszusa több, eltérő folyamat révén is kialakulhat: (i) azonos leukémiás klón visszatérése; (ii) klonális evolúció; vagy (iii), egy korábbi klónból származó sejtpopuláció felszaporodása, mely párhuzamosan fejlődik a diagnóziskor észlelt leukémiás sejtekkel.

4.3.3. A dMLPA és konvencionális MLPA eredmények összevetése

A B- és T ALL vizsgálatára kifejlesztett konvencionális MLPA szondakeverékek, és a dMLPA D007 szondakeverék szondáinak ligációs helyei különbözőek, így felhasználhatók a dMLPA-val szerzett adatok megerősítésére. A dMLPA-val detektált kópiaszám eltéréseket 121 konvencionális MLPA reakcióval validáltuk a tanulmányba bevont 97/105 betegmintán. A két vizsgálat eredményeinek statisztikai összehasonlítása magas konkordanciát igazolt 936/949 (98,6%) (10. táblázat). Az eltérő eredmények döntő többsége a *CDKN2A/B* génekben volt megfigyelhető, mely régiót a dMLPA több mint ötször annyi szondával fedte le, mint a konvencionális MLPA, ezzel hatékonyabb, magasabb felbontású CNA azonosítást téve lehetővé. Minden dMLPA-val detektált *ETV6* hiányt, *RUNX1* többletet/amplifikációt és *ABL1* többletet/amplifikációt mutató esetben megerősítő iFISH vizsgálatot végeztünk. A 77-es és 78-as betegek mintáiban detektált *STIL-TAL1* gén fúziót a rutin diagnosztikában is alkalmazott PCR vizsgálattal validáltuk.

10. táblázat. Gyermekkori ALL vizsgálatával nyert dMLPA és konvencionális MLPA eredmények statisztikai összehasonlítása

			dMLPA		Fisher-féle egzakt teszt:
			pozitív	negatív	
<i>STIL-TAL1</i> fúzió (1p33)	MLPA	pozitív	2	0	p<0.0001
		negatív	0	19	
<i>IKZF2</i> (2q34) hiány	MLPA	pozitív	0	0	p<0.0001
		negatív	0	34	
<i>LEF1</i> (4q25) hiány	MLPA	pozitív	1	0	p<0.0001
		negatív	0	20	
<i>EBF1</i> (5q33) hiány	MLPA	pozitív	1	0	p<0.0001
		negatív	0	45	
<i>CASP8AP2</i> (6q15) hiány	MLPA	pozitív	2	0	p<0.0001
		negatív	0	19	
<i>MYB</i> (6q23) hiány	MLPA	pozitív	3	0	p<0.0001
		negatív	0	18	
<i>IKZF1</i> (7p12) hiány	MLPA	pozitív	13	0	p<0.0001
		negatív	0	65	
<i>EZH2</i> (7q36) hiány	MLPA	pozitív	0	0	p<0.0001
		negatív	0	21	
<i>MLLT3</i> (9p21) hiány	MLPA	pozitív	5	0	p<0.0001
		negatív	0	16	
<i>CDKN2A</i> (9p21) hiány	MLPA	pozitív	46	0	p<0.0001
		negatív	4	49	
<i>CDKN2B</i> (9p21) hiány	MLPA	pozitív	37	0	p<0.0001
		negatív	7	55	
<i>PAX5</i> (9p13) hiány	MLPA	pozitív	15	1	p<0.0001
		negatív	0	30	
<i>NUP214-ABL1</i> fúzió (9q34)	MLPA	pozitív	4	0	p<0.0001
		negatív	0	17	
<i>PTEN</i> (10q23) hiány	MLPA	pozitív	2	0	p<0.0001
		negatív	0	19	
11p12-13 hiány	MLPA	pozitív	2	0	p<0.0001
		negatív	0	19	
<i>ETV6</i> (12p13) hiány	MLPA	pozitív	17	0	p<0.0001
		negatív	0	29	
<i>BTG1</i> (12q21) hiány	MLPA	pozitív	3	0	p<0.0001
		negatív	0	43	
		negatív	0	16	

10. táblázat folytatása.

	MLPA		dMLPA		Fisher-féle egzakt teszt:
			pozitív	negatív	
<i>RBI</i> (13q14) hiány		pozitív	5	0	p<0.0001
		negatív	0	41	
14q32 többlet		pozitív	11	0	p<0.0001
		negatív	0	23	
<i>NF1</i> (17q11) hiány		pozitív	0	0	p<0.0001
		negatív	0	21	
<i>SUZ12</i> (17q11) hiány		pozitív	0	0	p<0.0001
		negatív	0	21	
<i>IKZF3</i> (17q12) hiány		pozitív	0	0	p<0.0001
		negatív	0	56	
<i>PTPN2</i> (18p11) hiány		pozitív	4	0	p<0.0001
		negatív	0	17	
PAR régió (Xp22) hiány		pozitív	5	0	p<0.0001
		negatív	1	40	
<i>PHF6</i> (Xq26) hiány		pozitív	5	0	p<0.0001
		negatív	0	16	

4.3.4. *IGH* klonotípusok összehasonlító vizsgálata diagnózis és relapszus idején

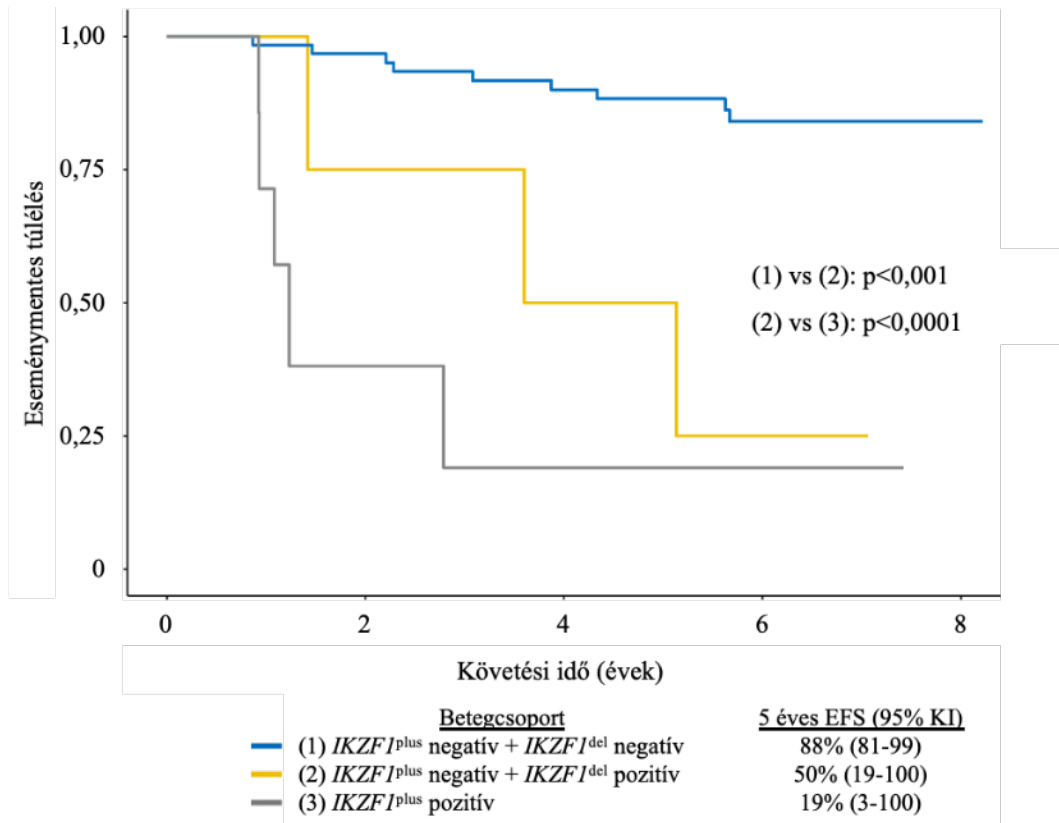
A 8 B-ALL-ben szenvedő beteg diagnózis és relapszuskori mintapárjain *IGH* génátrendeződés meghatározását végeztük el a két időpontban domináns leukémiás sejtek közötti klonális kapcsolat alaposabb feltérképezése érdekében. Összesen mintegy 17 mintán végeztük el a vizsgálatot, ugyanis a 26-os beteg esetében a második relapszus idejéből is rendelkezünk mintával. A kimutathatósági küszöböt meghaladó *IGH*-klonotípusokat 7 betegben azonosítottunk, közülük 4 beteg egyetlen domináns klónnal rendelkezett, míg a fennmaradó 3 betegben 2, 3, illetve 4 klonális VDJ átrendeződést mutattunk ki. Egy adott *IGH*-klonotípust reprezentáló *read*-ek aránya átlagosan 40,5% volt, mely 3,0% és 93,2% között változott a különböző minták és reakciók között. Az FR1 és FR2 reakciók által meghatározott klonotípus arányok erős korrelációt mutattak ($r=0,9734$). A diagnózis- és relapszuskori mintákban detektált *IGH* génátrendeződéseket vizsgálva 6/7 betegnél a két időpontban megegyező klonális összetételt figyeltünk meg. Azonban, a 26-os beteg diagnóziskori mintájában azonosított 4 *IGH*-klonotípus feltehetően egyazon allélról származott, mely feltételezés valószínűségét erősíti a közös *joining* szegmens, a 13 megegyező N2 bázis, illetve a 44%-os kumulatív klonotípus

előfordulás (FR1: 41,8%, FR2: 46,2%) intakt 14-es kromoszómák és 87%-os blasztarány mellett. Mindezen megfigyelések a RAG enzim aktivitásából adódó rekombinációra utalnak, mely szintén a legvalószínűbb magyarázata annak is, hogy ebben a betegben az első és második relapszus idejében nem volt jelen detektálható *IGH*-klonotípus.

4.3.5. Genetikai rizikó-stratifikáció

A dMLPA által meghatározott CNA-k alapján az egyes B-ALL-es betegeket genetikai rizikó csoportokba soroltuk. Korábbi kópiaszám eltérés alapú prognosztikai osztályozást felállító tanulmányokhoz hasonlóan elsődleges végpontként az eseménymentes túlélést tekintettük, 72 hónapos medián követési idő mellett (tartomány: 10-99 hónap). Mivel az alkalmazott kezelési protokoll különböző változatai (ALL IC-BFM 2002 és 2009) nem mutattak jelentősen eltérő hatást az eseménymentes túlélésre az általunk vizsgált betegcsoportban, a B-ALL-es betegek eredményeit összevonva, együtt értékeltük.

Az *IKZF1* transzkripciós faktor gén hiányát már korábbi tanulmányok is leírták, mint a betegség kimenetelét kedvezőtlenül befolyásoló tényezőt, egy közelmúltbeli tanulmány pedig meghatározott egy nagyon kedvezőtlen prognózisú, úgynevezett *IKZF1^{plus}* alcsoportot is, melyre az *IKZF1* hiányon túl jellemzőek a *PAX5*, *CDKN2A/B* és/vagy *PARI* hiányok, illetve a normál funkciójú *ERG* gén jelenléte (126). Az általunk vizsgált betegcsoportban *IKZF1* hiány esetén szignifikánsan rövidebb EFS-t találtunk az *IKZF1^{plus}* csoport kritériumainak meglététől függetlenül (17. ábra).



17. ábra. B-ALL-ben szenvedő betegek eseménymentes túlélése *IKZF1* kópiaszám státusz alapján (n=76)

Az *IKZF1*^{plus} genotípus kritériumaként az *IKZF1* hiány mellett a *PAX5*, *CDKN2A/B* vagy *PARI* génekben/régiókban jelenlévő további hiányt tekintettük az *ERG* hiánya nélkül Stanulla és mksai. közleménye alapján (126).

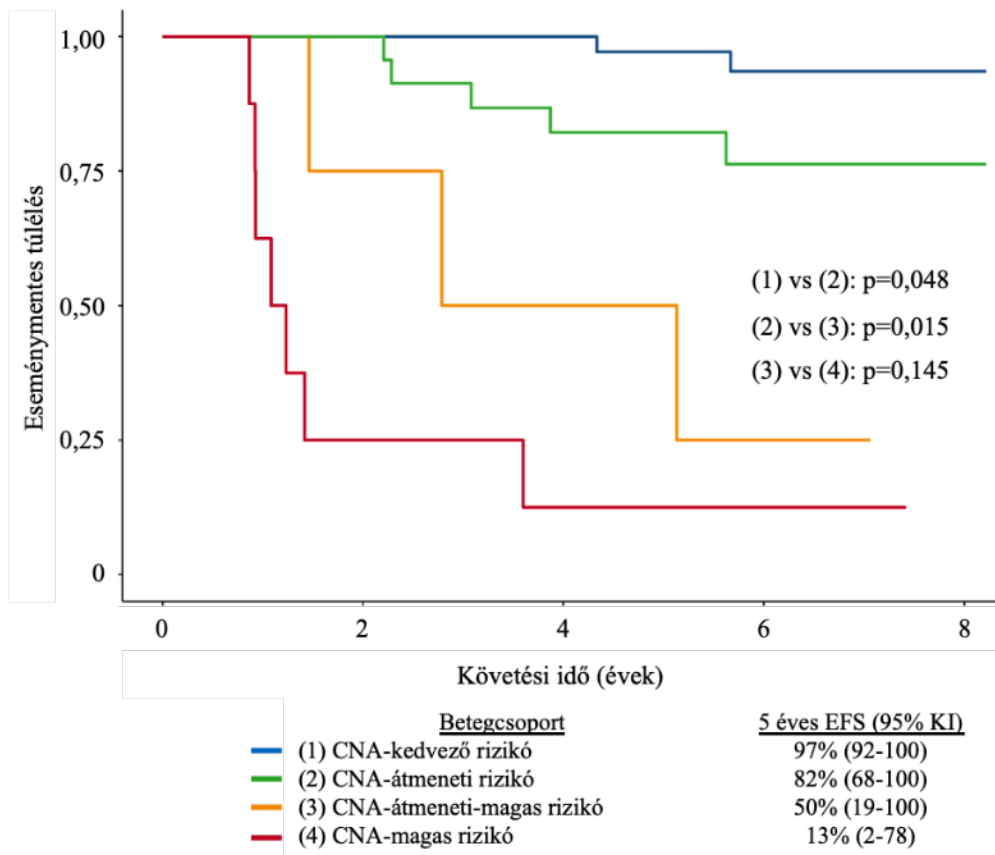
A Moorman és munkatársai által bevezetett CNA alapú UKALL-CNA osztályozás 8 B-ALL-ben gyakran érintett gén/genomikus régió (*EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI*, *PAR1*) kópiaszám eltérései alapján csoportosítja a betegeket, melyek a forgalomban lévő konvencionális MLPA szondakeverékekkel is vizsgálhatók (43). Ezen osztályozás módosított változatát, illetve annak kombinációját a hagyományos citogenetikai rizikó besorolással az utóbbi időben számos nagy betegszámú B-ALL tanulmányban vizsgálták (125). A konvencionális MLPA szondakeverékekhez képest a dMLPA D007 számos további, B-ALL-ben gyakran érintett gén/genomikus régió vizsgálatát is lehetővé teszi, ezért megvizsgáltuk a lehetőségét egy alternatív rizikó-klasszifikáció felállításának, mely a B-ALL-es betegeknek az eddigieknél részletesebb, betegség szempontjából releváns régiók CNA profilján alapul. Kizárólag a dMLPA-val kimutatott kópiaszám eltéréseket figyelembe véve 4 különböző EFS-sel jellemezhető csoportot határoztunk meg (11. táblázat, 18. ábra).

11. táblázat. B-ALL rizikócsoportok a CNA alapú osztályozáshoz

Rizikócsoport*	Kritérium**
CNA-GR	Nincs eltérés egyik vizsgált régióban sem Izolált <i>ETV6</i> , <i>TBL1XR1</i> vagy <i>ERG</i> deléció <i>ETV6</i> és/vagy <i>TBL1XR1</i> deléció az <i>EBF1</i> , <i>CDKN2A/B</i> , <i>PAX5</i> gének egyikének deléciójával vagy <i>RUNX1</i> többlettel
CNA-IR	Bármilyen más CNA profil
CNA-IHR	<i>ABL1</i> többlet és/vagy <i>IKZF1</i> deléció CNA-HR kritériumainak teljesítése nélkül
CNA-HR	Izolált <i>IKZF1</i> vagy <i>IKZF2</i> deléció <i>IKZF1</i> , <i>CDKN2A/B</i> és <i>PAX5</i> deléció <i>ERG</i> deléciók nélkül

*GR: kedvező rizikó; IR: átmeneti rizikó; IHR: átmeneti-magas rizikó; HR: magas rizikó

**A kópiaszám eltérés (CNA) alapú osztályozáshoz figyelembe vett gének/régiók: *CD200*, *BTLA*, *TBL1XR1*, *NR3C2*, *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ABL1*, *ETV6*, *RBI*, *TP53*, *RUNX1*, *ERG* és *PAR1*



18. ábra. B-ALL-ben szenvedő betegek eseménymentes túlélési adatai CNA alapú rizikó besorolás alapján (n=76)

Az eseménymentes túlélési adatokat Kaplan Meier görbéken ábrázoltuk a 10. táblázatban részletezett CNA alapú rizikócsoportokba sorolt betegek esetében.

A UKALL rizikóbecslési stratégiához hasonlóan integráltuk a dMLPA adatokon alapuló CNA klasszifikációkat a citogenetikai rizikó csoportokkal, mely utóbbiakat a UKALL rendszerének megfelelően definiáltunk (125). A különböző kópiaszám eltérések és citogenetikai rizikócsoportok kombinálásával létrejövő eseménymentes túlélési görbék vizuális értékelését követően 4 kombinált genetikai csoportot határoztunk meg, melyek szignifikánsan különböző túlélési aránnyal jellemezhetők (12. táblázat, 19. ábra).

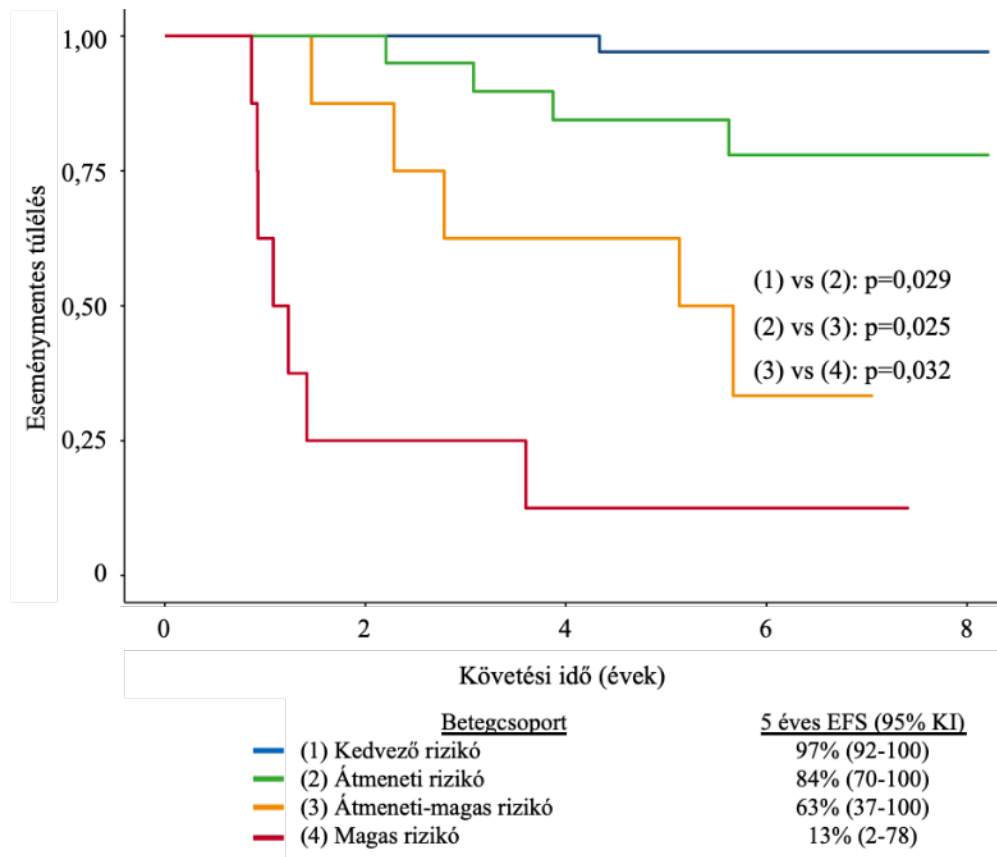
12. táblázat. dMLPA kópiaszám eltéréseken, és a UKALL citogenetikai rizikó csoportosítás kombinációján alapuló B-ALL rizikó klasszifikáció.

A kombinált rizikócsoportokat a dMLPA-CNA alapú, illetve a citogenetikai rizikócsoportok egyes kombinációi alapján jöttek létre.

Kombinált rizikócsoport*	dMLPA- CNA alapú rizikócsoport	Citogenetikai rizikócsoport**
GR	GR	GR
	GR	IR
IR	IR	GR
	IR	IR
IHR	IHR	GR
	IHR	IR
	IHR	HR
	GR	HR
	IR	HR
HR	HR	GR
	HR	IR
	HR	HR

* GR: kedvező rizikó; IR: átmeneti rizikó; IHR: átmeneti-magas rizikó; HR: kedvezőtlen rizikó

** A citogenetikai rizikó csoportokat az UKALL rendszer szerint határoztuk meg (125, 43).



19: ábra. B-ALL-ben szenvedő betegek túlélési adatai kombinált CNA és citogenetikai eltérések alapján (n=76)

Kombinált citogenetikai és dMLPA alapú CNA profil szerint a 11. táblázat-ban részletezett módon rizikócsoportokba sorolt betegek eseménymentes túlélési adatai. KI: konfidencia intervallum.

5. Megbeszélés

Az elmúlt évtizedek kutatásai mélyrehatóan feltárták a malignus hematológiai betegségekhez asszociáltan megjelenő genetikai és genomikai eltéréseket, ezzel lehetővé téve az entitások részletesebb klasszifikációját, pontosabb diagnózis és prognózis felállítását, valamint molekuláris célpontokat azonosítását (7). A leukémiák és limfómák patogenezise gyakran komplex folyamat, melyhez számos genetikai abnormalitás társulhat, beleértve a DNS kópiaszám változással járó aberrációkat is. A mindennapi diagnosztikában jelenleg alkalmazott módszerek sok esetben nem alkalmasak a klinikai relevanciával bíró elváltozások gazdaságos és hatékony azonosítására, így egyre növekvő igény mutatkozik olyan új módszerek bevezetésére, melyek lehetővé teszik ezen eltérések átfogó szűrését (98, 99).

Tanulmányunk során elemeztük a konvencionális és a digitális MLPA módszerek hatékonyságát, és alkalmazhatóságának lehetőségeit malignus hematológiai kórképekben megjelenő genetikai abnormalitások vizsgálatához. Ezen módszereket összevetettük a rutin diagnosztikában használatos arany standard eljárásokkal a leggyakrabban előforduló, klinikai jelentőséggel bíró visszatérő CNA-k detektálásának tekintetében. Munkánk során az MLPA/dMLPA módszerek alkalmazásakor a prognosztikus és prediktív értékkel bíró eltérések, valamint az egyes betegségek relapszusához és progressziójához vezető aberrációk azonosítására fókuszáltunk.

5.1. CLL-ben megjelenő DNS kópiaszám eltérések vizsgálata konvencionális MLPA-val

Konvencionális MLPA vizsgálattal szerzett eredményeink nagymértékben megegyeznek a nemzetközi irodalomban publikált tapasztalatokkal, miszerint genomikus kópiaszám eltéréseket CLL-ben vizsgálva a konvencionális MLPA és iFISH eredmények erős korrelációt mutatnak, amennyiben az aberrációkat hordozó sejtek aránya a mintában eléri/meghaladja az MLPA 20-25%-os érzékenységi szintjét [20-22]. Vizsgálatunk során csupán négy esetben fordult elő ellentmondás a két módszer által nyújtott eredmények között, ahol a kérdéses aberráció aránya azonban 20% alattinak bizonyult a mintában az iFISH vizsgálat alapján. A diagnosztikai munkafolyamat során a minták tumorsejt aránya általában áramlási citometriás vizsgálattal meghatározásra kerül a rutin vizsgálatok során, alacsony CLL-es sejtarány esetén pedig a leukémiás sejtek mágneses antitestek

használatával könnyedén dúsíthatók. Ezen megfontolások figyelembevételével biztonsággal észlelhetők a CLL sejtpopulációban jelenlévő domináns kópiaszám eltérések. Természetesen a konvencionális MLPA detektálási küszöbét el nem érő, szubklonális aberrációk dúsítást követően is rejtve maradhatnak, így a daganatos sejtpopuláció heterogenitásának részletes feltérképezésére ez a módszer a viszonylag korlátozott érzékenysége miatt nem alkalmas. A pontmutációk kimutatása az eltérés alacsonyabb reprezentáltsága esetén is lehetséges, azonban ilyen esetben ezen aberrációk kimutatása gazdaságosabb valamilyen egyéb allélspecifikus PCR módszerrel.

A konvencionális MLPA előnye az iFISH módszerrel szemben, hogy egy reakcióban akár 55-60 különböző cél régió is vizsgálható, ezáltal a minta genetikai komplexitása átfogóbban feltérképezhető. Mivel kiegyensúlyozatlan aberrációk iFISH-sel való vizsgálatához az érintett cél régiót vizualizáló szonda mellett, ugyanazon kromoszóma többnyire intakt szakaszához kapcsolódó, úgynevezett kontroll szonda is használatos, iFISH analízissel minden genomikus aberráció vizsgálatát tipikusan külön szokás elvégezni, dedikált szondapár segítségével. Ez csak alacsony áteresztőképességű és viszonylag magas fajlagos költségű vizsgálatot enged meg, így a rutin diagnosztikai analízis általában néhány aberráció vizsgálatára korlátozódik (101, 134, 100), potenciálisan alábecsülve a minta genomikai komplexitását.

A rutin iFISH panel részét nem képező kromoszómák eltéréseinek specifikus jelentőségére példa a 6q hiány, mely kedvezőtlen prognózist jelezhet, illetve a potenciális terápiás célpontot jelentő, FOXO3 transzkripció faktor alacsony expressziójával társul (135).

iFISH analízissel legjobb esetben is csupán a 20-50 kilobázisnál hosszabb DNS szakaszokat érintő eltérések vizsgálhatók biztonsággal (136), mely miatt rejtve maradhatnak ennél a nagyságrendnél kisebb kiterjedésű aberrációk, mint például a 13q és 11q kromoszóma karok exon szintű mikrodélációi (137, 80). Az MLPA által nyújtott nagyobb felbontás jelentőségére jó példa a 13q hiány analízise, mely eltérés izolált jelenléte kedvező prognózissal társul, viszont az RB1 deléciót hordozó betegeknél kedvezőtlenebb TTFT figyelhető meg, mint azoknál, akiknél az *RBI* gén nem érintett [26]. Vizsgálatunk 12 betegben mutatott ki 13q hiányt konvencionális MLPA-val, ebből 4 esetben az *RBI* gén érintetlen volt, egy esetben pedig csak részleges deléció volt

megfigyelhető. Hagyományos iFISH vizsgálattal ez a két alcsoport nem lett volna elkülöníthető.

Munkánk során a CLL-es betegminták konvencionális MLPA-val számos olyan DNS kópiaszám eltérést is felfedtünk, melyek kizárólag iFISH alkalmazása mellett rejtve maradtak volna. A mindkét módszerrel vizsgált betegek 72%-ában (13/18) mutattunk ki legalább 3 aberrációt, mely jelentősen magasabb arány a komplex kariotípus irodalomban közölt, körülbelül 20%-os előfordulásához képest (138). Ennek oka egyrészt abban keresendő, hogy az MLPA és az iFISH összehasonlításához technikai jellegű vizsgálatunkba olyan betegeket vontunk be, akiknél valamely diagnosztikai iFISH vizsgálat pozitív eredménnyel zárult, másrészt a komplex kariotípus egy konvencionális citogenetikai fogalom, mely minimum 3-10 megabázis kiterjedésű aberrációk együttes jelenlétére utal. Az általunk kimutatott, esetenként rövid szubkromoszómális vagy akár exon szintű aberrációk G-sávós kariotípus elemzéssel nem detektálható eltérések. Ebből következően a legalább 3 genetikai eltérést hordozó betegek egy része valójában nem rendelkezett komplex kariotípussal. Mindazonáltal jelenlegi ismereteink szerint a szubkromoszómális kópiaszám eltérésekből fakadó genetikai komplexitás is független markere a rossz prognózisnak (138), így az általunk alkalmazott, kombinált módszertani megközelítés segíthet kiszűrni a hagyományos értelemben komplex kariotípust nem hordozó, mégis kedvezőtlen prognózissal rendelkező betegek egy részét. A komplex kariotípus a CLL prognózisának meghatározására használatos nemzetközi prognosztikus indextől (CLL-IPI) és a *TP53* státusztól független jelzője a betegség kedvezőtlen kimenetelének (139, 140). Ebből adódóan a több kópiaszám eltérést hordozó betegek azonosítása kiemelt jelentőségű.

Az elmúlt években számos új gyógyszer jelent meg a CLL kezelésében, mint a BTK gátló ibrutinib és acalabrutinib, a Bcl-2 gátló venetoclax, vagy a PI3K gátló idelalisib (141-144). Ezen új és rendkívül hatékony terápiás modalitások megjelenése tovább növeli a komplex genetikai eltéréseket hordozó esetek azonosításának jelentőségét, ugyanis amellet, hogy ezen betegeknél egyrészt nem hatékony a standard kemo-immunoterápia, ibrutinib kezelés során is rosszabb prognózis várható, ellentétben az izolált 17p hiánnyal (145, 146).

A konvencionális MLPA használata előnyös lehet a CLL sejtpopuláció összetételének terápia során végbemenő genetikai változásainak elemzésében is. Egyes

kemoterápiás készítmények alkalmazása például a 2-es kromoszóma rövid karjának többletét hordozó kemorezisztens szubklónok felszaporodásával jár (147), de jól ismert a *TP53* aberrációkat hordozó szubklónok pozitív szelekciója is kemo-immunoterápia hatására (148). Az új, célzott gyógyszerek alkalmazása során bekövetkező genomikus kópiaszám változások megismerése segíthet megérteni ezen készítmények által létrehozott szelektív nyomásokat, illetve az ennek nyomán végbemenő klonális evolúciós folyamatokat. Vizsgálatunkban ibrutinib kezelt betegek mintapárjain több kromoszómaaberráció megjelenését és eltűnését is megfigyeltük, ami felveti egy nagyobb betegnyagon, hosszabb követési idővel elvégzendő tanulmány létjogosultságát, különös tekintettel arra, hogy egy ibrutinib rezisztens betegben a konvencionális MLPA vizsgálattal a relapszus hátterében CNA-k térbeli heterogenitását is fel tudtuk térképezni.

5.2. dMLPA alkalmazásával szerzett tapasztalatok

Tanulmányunk során szerzett tapasztalatink szerint a dMLPA módszer gyakorlati előnye, hogy (i) igen jól skálázható és nagy áteresztő képességű, egy futásban akár 192 minta is vizsgálható párhuzamosan; (ii) kevés kiindulási DNS-t igényel, csupán 20 ng elegendő a könyvtár készítéshez; (iii) rövid átfutási ideje van, akár 36 órán belül eredményt szolgáltat (11, 149). A dMLPA célzott vizsgálat, így az adatfeldolgozás igénye számítógépes kapacitás szempontjából lényegesen kisebb, mint egyéb NGS-en alapuló módszerek esetében. A szondakeverék gondos tervezésének köszönhetően nagyobb áteresztőképesség mellett szolgáltat informatív eredményeket, mint az alternatív, genom szinten kópiaszám eltéréseket vizsgáló módszerek. Specifikus szonda összetételének köszönhetően a dMLPA lehetővé teszi a teljes kromoszómákat érintő aberrációk és nagy kiterjedésű kópiaszám eltérések vizsgálatát is, a driver géneket érintő nagy részletességű vizsgálat mellett, mely különösen vonzóvá teszi ezt a technikát hematológiai malignitások kutatása és diagnosztikája számára. A munkánk során vizsgált genomikus lókuszek száma egy nagyságrenddel magasabb volt a konvencionális MLPA-val megszokott tartományhoz képest, és az egyazon reakcióban felhasznált szondák száma a későbbiekben tovább növelhető. Ez a módszerben rejlő rugalmasság biztosítja azt, hogy a dMLPA képes lesz lépést tartani a driver eltéréseket, prognosztikus és prediktív értékkel bíró aberrációkat kimutatni kívánó panelek várható bővítési igényeivel.

5.2.1. dMLPA alkalmazása MM-ben

Az MM-re heterogén genetikai háttér és változatos klinikai lefolyás jellemző. Számos vizsgálat tűzte már ki céljául e két jelenség közötti kapcsolat feltárását annak érdekében, hogy a betegeket különböző rizikó csoportokba lehessen sorolni, mely segítheti az egyes terápiákra adott válasz előrejelzését, ezáltal a betegség személyre szabott kezelésének optimalizálását. Az elmúlt években a széleskörű molekuláris citogenetikai vizsgálatoknak és nagy áteresztő képességű szekvenálási technológiáknak köszönhetően a betegségben visszatérő módon megjelenő genetikai léziókkal kapcsolatos ismereteink nagymértékben bővültek (150).

MM-ben a korai genetikai események közé tartoznak a *IGH* gént érintő transzlokációk, illetve a HD státusz kialakulása, melyek meghatározása a mai napig a betegség biológiai osztályozásának sarokkövét képezi (151). Általánosságban a HD státusz kedvező kimenetellel társul, azonban nem mindegyik, ilyen esetben megjelenő triszómiának azonos a prognosztikus súlya (110); ebből adódóan az egyidejűleg jelentkező összes kromoszóma többlet specifikus meghatározása klinikai jelentőséggel bír. Továbbá, szubkromoszómális CNA-k és SNP-k részletes vizsgálata révén számos klinikai gyakorlatban jelentőséggel bíró prognosztikus, és néhány prediktív marker is leírásra került (116, 108, 152, 115, 153). Ezen genetikai eltérések jelentőségét jól mutatja, hogy az *International Myeloma Working Group* számos eltérés vizsgálatát integrálta szakmai protokolljába, mint például a 17p13 hiány és az 1q21 többlet szűrését (154, 155).

Az MM citogenetikai eltéréseinek rutin diagnosztikában alkalmazott arany standard vizsgálati módszere továbbra is az iFISH, mely azonban a korábban részletezett technikai okok miatt igen limitált számú lókuszt egyidejű vizsgálatát teszi csak lehetővé. Ezzel szemben a molekuláris array, illetve NGS módszerek teljes genom szinten képesek információt szolgáltatni. Ugyanakkor az MM szomatikus mutációk és CNA-k egyes betegeknél megjelenő prevalenciája szempontjából a skála közepén helyezkedik el, ugyanis több aberráció jelenléte jellemző MM-ben, mint számos egyéb hematológiai malignitásban, azonban kevesebb, mint a legtöbb szolid tumorban (2). Ebből adódóan a daganatos betegségek azon körébe tartozik, ahol kézenfekvő egy multiplex, de továbbra is célzott megközelítésnek a klinikai relevanciával járó driver genetikai eltérések rutin diagnosztikai vizsgálatában.

Munkánk során vizsgáltuk az új, NGS-en alapuló dMLPA módszer felhasználási lehetőségeit az MM-ben visszatérő módon megjelenő teljes kromoszómaaberrációk és szubkromoszómális kópiaszám eltérések kimutatásához, valamint egy célzott terápia szempontjából jelentőséggel bíró pontmutáció szűréséhez is. A vizsgálat során észlelt eltérések betegenkénti száma a korábbi teljes genom szintű vizsgálatok során leírt értékekkel azonos tartományba esett (156, 157), emellett kiemelendő, hogy a dMLPA egy kivétellel minden betegben kimutatott valamilyen genetikai eltérést (5. táblázat). A dMLPA-val észlelt teljes kromoszómákat érintő aberrációk döntő többségét, és a szubkromoszómális CNA-k 63%-át (156/246) a konvencionális MLPA és iFISH vizsgálatok nem mutatták ki. Továbbá, az összes prognosztikus szempontból releváns CNA mellett a dMLPA terápiás szempontból is jelentős eltérések kimutatását is lehetővé tette, mint az *MCL1* vagy *SLAMF7* gének, illetve lehetőséget adott az olyan prediktív markerek kimutatására, mint a *CRBN* hiány, mely a betegség immunmoduláns gyógyszerekre adott válaszát negatívan befolyásolja (153).

Ezeket felül a dMLPA azonosította a BRAF kináz V600E aktiváló mutációját két betegmintában, mely eltérés esetén alkalmazható a MM kezelésében a vemurafenib, a mutáns BRAF kináz szelektív inhibitora. Ez demonstrálja a módszer sokrétű felhasználási lehetőségeit, beleértve a klinikailag releváns pontmutációk észlelését is (158).

A tumorszupresszor gének biállélikus inaktivációja a MM progressziójának egyik feltételezett *driver* mechanizmusa (159, 160). A dMLPA D006-os szondakeverék segítségével a vizsgált MM-es betegmintákban azonosítottuk a *CKN2C/FAF1*, *BIRC3*, *TRAF3* és *TP53* gének homozigóta hiányát, mely eltérések más munkacsoportok korábbi tanulmányai alapján relapszus idején jellemzően gyakrabban mutatkoznak. Továbbá említésre méltó, hogy a *CYLD* gén homozigóta hiányát is azonosítottuk, mely egy betegben már leírásra került egy korábbi vizsgálatban (161), azonban ez a gén a célzott *FoundationOne Heme* panelben vizsgálatunk idején nem volt benne, így az elmúlt évek egyik jelentős tanulmányában az eltérést az említett, széles körben használt NGS pannellel nem tudták kimutatni (159).

A dMLPA szondakeverék mintegy 400 szondája (i) lehetővé tette jelenleg piaci forgalomban elérhető konvencionális MLPA és iFISH tesztek által nem vizsgálható genomi régiók analízisét; (ii) többlet bizonyosságot nyújtott az olyan CNA-k azonosításában, melyek konvencionális MLPA-val vizsgálhatók ugyan, azonban

lényeges kevesebb szonda által és (iii) lehetővé tette az eltérések lényegesen magasabb felbontással történő vizsgálatát. Ezt a magasabb felbontást jól példázza, hogy dMLPA-val csupán az 1-es kromoszóma körülbelül annyi szondával volt lefedve, mint amennyi a P425-ös konvencionális MLPA szondakeverékben összesen megtalálható, ezzel elősegítve az ezt a kromoszómát érintő CNA-k elhelyezkedésben, kiterjedésben, és allélarányban mutatkozó, nagymértékű változatosságának feltárását. Az allélarány heterogenitása nem csupán biológiai szempontból érdekes megfigyelés, ugyanis a korábban említett 1p hiány mellett a *CKS1B* (1q21) amplifikációja az adott lókuszt egyszerű többlettel szemben kedvezőtlen túléléssel társul az MRC Myeloma IX vizsgálat tanulsága szerint, mely jelzi az allélarányok meghatározásának klinikai jelentőségét (96).

Technikai szempontokat tekintve, vizsgálatunk során dMLPA szondaként és betegenként átlagosan több mint 1000 megfelelő minőségű *read*-et tudtunk analizálni, mely lehetővé tette a magas minőségű adatfeldolgozást, a precíz relatív *read* kvantifikációt, illetve a CNA-k hatékony azonosítását. Elméletileg a kópiaszám eltérések megbízható észlelése már dMLPA szondaként körülbelül 600 *read* megléte esetén is lehetséges (11), ebből adódóan a mintegy 500 szondát tartalmazó D006 szondakeveréket alkalmazva egy MiSeq futás során 70 minta párhuzamos vizsgálata válik lehetségessé a kontroll mintákat leszámítva. Ez az áteresztő képesség lehetővé teszi egyszerre nagy mennyiségű archív minta vizsgálatát, azonban a mindennapi rutin diagnosztikai gyakorlatban, ahol a minták átfutási ideje kulcsfontosságú, a kisebb szekvenáló *flow cell*-ek alkalmazása célravezetőbb lehet (pl. MiSeq Standard v2: 42 minta, MiSeq Micro v2: 1 minta). A dMLPA könyvtárak poolozása és szekvenálása lehetséges továbbá más amplicon vagy hybrid-capture alapú, SNV-k és indelek vizsgálatára tervezett célzott könyvtárakkal együtt is.

A MM kutatás és diagnosztika speciális igényeinek tükrében a dMLPA-nak, mint MLPA alapú módszernek, számos limitációja van, amivel számolnunk kell: (i) a konvencionális MLPA-hoz hasonlóan ezzel a módszerrel sem lehetséges kópiaszám eltéréssel nem járó citogenetikai aberrációk detektálása, mint például az *IGH* gén egyes transzlokációi, így a módszer kombinálása iFISH-sel vagy egyéb DNS/RNS alapú módszerrel mindenképpen szükséges a klinikailag is releváns génátrendeződések feltárásának érdekében; (ii) bár az általunk alkalmazott D006 szondakeverék igen

nagymennyiségű szondát tartalmaz, ez még mindig nem elégséges kromotripszis detektálására, mely a betegség egy agresszív klinikai lefolyással jellemezhető alcsoportjában jellemzően előforduló jelenség; (iii); a szubklonális biállélikus hiányok és a klonális monoallélikus deléciók egymástól való elkülönítése továbbra is nehéz, vagy adott esetben kivitelezhetetlen lehet; (iv) a dMLPA eredmények értékelésekor is fontos figyelembe venni a minta tisztaságát, így a módszer optimális alkalmazásához szükség van a vizsgálandó plazmasejtek arányának meghatározására, szükség szerint azoknak mágneses dúsítására, megfelelő minőségű izolált DNS használatára, valamint kellő mennyiségű szonda alkalmazására a legérzékenyebb régiókban; (v) a vizsgált DNS izolátum jellegéből adódóan nem nyújt a detektált aberrációról sejtszintű információt, mely a MM komplex genetikai összetételének feltárásában előnyös lenne; (vi) egyes szondák relatív kópiaszám arányainak csökkenése nem jár feltétlenül együtt kópiaszám eltérés jelenlétével, ugyanis a ligációs hely közelében jelenlévő szomatikus mutációk szintén befolyásolhatják a próbák ligációját és amplifikációját, ahogyan az konvencionális MLPA esetében is előfordulhat. Ez különösen fontos azon genomikus pozíciókban, melyek gyakran érintettek nem csupán CNA-kban, de olyan szomatikus mutációkban is, melyek nem feltétlenül jelentenek szelekciós előnyt, mint a *silent* vagy *passenger* mutációk a gyakorta érintett *driver* génekben. Ilyen esetben több, egymással közeli genomikus lokalizációhoz hibridizálódó próba használata, és ezek együttes analízise segítheti az eredmények interpretációját. Kérdéses esetekben ajánlott az eredmény validációja egy másik módszerrel is. Munkánk során 50 különböző lókuszt vizsgáltunk konvencionális MLPA-val és iFISH-sel is, azonban vizsgálatunk egy alapvető limitációja, hogy az iFISH és/vagy MLPA által lefedett régiókon kívül eső kópiaszám eltéréseket nem állt módunkban validálni.

Eredményeink alapján ez az új módszer megbízható, és a betegség szempontjából releváns kiegyensúlyozatlan kópiaszám eltérések és bizonyos pontmutációk tekintetében átfogó adatokat képes szolgáltatni rövid átfutási idő mellett. Ezen tulajdonságai alapján a dMLPA hasznos kiegészítő lehetőség a MM citogenetikai vizsgálatában mai napig arany standardnak tekintett iFISH módszer mellett.

5.2.2. dMLPA alkalmazása gyermekkori ALL-ben

A gyermekkori ALL kezelése rendkívül sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben, melynek köszönhetően immáron a legtöbb fejlett országban 90%-os 5 éves túlélés

jellemző (162). A betegség klinikai kimenetelének jelentős javulása az egyre pontosabb rizikóbecslésnek köszönhető, mely többek között a betegségben visszatérő, a diagnózis időpontjában prediktív és prognosztikus értékkel bíró genetikai eltérések meghatározásán alapszik (163). A nagy áteresztő képességű szekvenálási technológiákkal nyert eredmények alapján növekszik az igény ebben a betegségben is a klinikai gyakorlat szempontjából releváns *driver* és egyéb addicionális genetikai eltérések részletes és hatékony vizsgálatára a rutin diagnosztikai munkafolyamatokban (164).

A gyermekkori T- és B-sejtes ALL-ben végzett munkánk során kifejezetten ezen betegségek visszatérő genetikai lézióinak vizsgálatára kifejlesztett dMLPA szondakeveréket vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott D007-es dMLPA szondakeverék minden olyan kiegyensúlyozatlan genetikai aberráció által érintett lókuszt lefed, melyeket az NCCN (*National Comprehensive Cancer Network®*) ajánlás (1.2020-as verzió) tartalmaz a gyermekkori B-ALL rizikó-stratifikációjában. Ez igazolja, hogy a dMLPA érdemben képes kiegészíteni a hazai klinikai gyakorlatban jelenleg használt konvencionális genetikai módszereket.

ALL-ben a kariotipizálás különösképpen kihívást jelent, ugyanis főleg a HD esetekben, az abnormális metafázisok kromoszóma morfológiát tekintve rosszabb minőségűek, mint az ugyanazon mintában megfigyelhető normál metafázisok. A diagnosztikában alkalmazott DNS index vizsgálat, mellyel a HD esetek gyorsan és rutinszerűen szűrhetők, az egyes kromoszómák eltéréseiről nem nyújt információt.

dMLPA-val kiegyensúlyozatlan aberrációk vizsgálhatók, és ugyan nem ad sejt-szintű információt, lehetővé teszi egyidőben többszáz lókuszt vizsgálatát is exon-szintű felbontás mellett fókuszált, racionalizált módon. Ezen vizsgálatok előnyei és korlátai hatással voltak az általunk vizsgált betegcsoport genetikai karakterizálására is: kiegyensúlyozott aberrációkat (pl. *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1* és *MLL* fúziók) kizárólag a diagnosztikus munkafolyamat részét képező iFISH-sel és kariotipizálással detektáltunk, míg a kiegyensúlyozatlan aberrációk döntő többségét, beleértve a teljes kromoszómákat érintő változásokat, szubkromoszómális léziókat és intrakromoszómális génfúziókat, melyeket a konvencionális módszerekkel nem detektáltunk, dMLPA-val tudunk azonosítani.

Munkánk során a dMLPA módszer gyermekkori ALL vizsgálatában való technikai és felhasználásbeli erősségeit számos módon demonstráltuk: (i) diagnosztikus

betegmintákban a korábbi tanulmányok eredményeivel összemérhető mennyiségű betegenkénti CNA-t azonosítottunk, tekintettel arra, hogy az általunk használt assay a várhatóan eltéréseket hordozó driver gének genomikus lókuszeit célozta (121); (ii) a teljes kromoszómaszám meghatározása mellett módszerünk lehetővé tette adott kromoszómák többleteinek specifikus karakterizálását, különösképpen a HD betegekben, mely lehetetlen DNS index vizsgálattal, gyakorta nehézkes kariotipizálással, igen munkaigényes iFISH-sel, és nem gazdaságos array, vagy egyéb NGS alapú módszerekkel; (iii) részletesen vizsgáltuk a B- és T-sejtes ALL-ben szenvedő betegek szubkromoszómális driver kópiaszám eltéréseit, beleértve az intrakromoszómális fúziókhoz társuló eltéréseket; (iv) korábbi tanulmányokkal összhangban a diagnózis- és relapszuskori minták összehasonlító vizsgálata során a betegség progressziójakor nagyobb számú CNA-t azonosítottunk (122), számos olyan relapszus háttérében álló klonális mintázat mellett, melyek klinikai szempontból relevánsak lehetnek; (v) a dMLPA eredmények teljesen egybevágóak voltak a rutin diagnosztikus folyamat során nyert iFISH és PCR vizsgálati adatokkal, a konvencionális MLPA-val történt megerősítő vizsgálat pedig 99%-os konkordanciát mutatott eredményeinkkel.

Limfoid malignitásokban az immunglobulin nehézlánc gén átrendeződés a sejtek egyedi azonosító kódjának tekinthető, mely specifikus markerként használható a diagnosztikus mintában való klonális proliferáció kimutatásában, követés során a reziduális tumortömeg meghatározásában, a leukemogenezis során szelekciós előnyre szert tett sejtcsoportok összetételének és heterogenitásának vizsgálatában, illetve a betegség progressziója során létrejövő klonális változások azonosításában (165-169). Ebből adódóan ezen fiziológiásan is jelenlévő, betegspecifikus genetikai markerek vizsgálata lehetőséget nyújtott a betegség különböző időpillanataiban domináns sejtpopulációk klonális viszonyainak elemzésére, melyek a dMLPA-val meghatározott kópiaszám eltérésekért is döntően felelősek. Az *IGH* lókuszt szekvenálása B-ALL-ben szenvedő betegeinkben egy kivétellel minden esetben azonos VDJ régiót mutatott ki dominánsként diagnosztikus és relapszuskori mintákban egyaránt. Ez az eredmény illeszkedik a korábban B-ALL-ben *IGH* szekvenálást végző tanulmányok sorába (170, 171), és azt sugallja, hogy még ha a kópiaszám eltérések vizsgálata fel is fedett elágazódó evolúciós folyamatot egy betegben, a relapszus döntően olyan sejtcsoportból jött létre, mely már átesett a RAG-enzim általi *IGH* génátrendeződésen, és közeli klonális

viszonyban van a diagnóziskor domináns leukémiás sejtekkel. Az *IGH* gén strukturálisan rendkívül komplex és jelentős rekombinációs potenciállal bír, ebből adódóan az *IGH* génátrendeződések betegspecifikus, teljesen unikális markerei a daganatnak, melyek elméletben lehetővé teszik a klonális összetétel változásainak követését a legmagasabb lehetséges felbontás és precizitás mellett. Ugyanakkor vizsgálataink során az *IGH* génátrendeződések részletes *repertoár analízise* nem fedett fel további komplexitást a klonális eredetben, pl. nem mutatta ki közös korai klónból kiinduló párhuzamos evolúció jelenlétét olyan betegben, akiknél a diagnosztikus és relapszkori minták kópiaszám eltérés profiljainak összehasonlítása direkt klonális evolúcióra engedett következtetni. Ezzel szemben a dMLPA egy további, minőségileg új információs réteget nyújtott, mivel nem csak a klonális kapcsolatot fedte fel a diagnózis és relapszus idején domináló sejtpopulációk között, hanem egyes driver CNA-k megjelenését és eltűnését is.

Gyermekkori ALL-ben a visszatérő CNA-knak nem csak biológiai, hanem prognosztikus és prediktív értéke is van a nagy genetikai és klinikai tanulmányok eredményei alapján (172, 121, 173, 174). Az egyes jól ismert, klinikailag releváns CNA-k kimutatásának (mint például az *IKZF1* hiány) jelentőségét, saját beteganyagunkon is demonstráltuk (17. ábra). Az egyes driver aberrációk egyedi betegmintákban való egyidejű feltérképezése, emellett lehetővé tehet egy még inkább személyre szabott prognózis meghatározást és terápiás válasz előrejelzést (175). Ezzel összhangban egyre több bizonyíték mutat arra, hogy a kópiaszám eltérések klinikai jelentősége függ a tágabb genomikai kontextustól, mely alapot szolgáltatott a kópiaszám eltéréseket és egyéb genetikai eltéréseket integráló osztályozások bevezetésére az ALL rizikóstratifikációjában (125, 176, 43, 177). Az általunk meghatározott citogenetikai adatok és dMLPA által nyújtott CNA adatok integrálásán alapuló új klasszifikáció a korábbi rendszerekhez képest nagyobb hangsúlyt fektet a CNA adatokra (11. táblázat). Ebben, kombinált osztályozással négy, szignifikánsan különböző klinikai kimenetellel jellemezhető csoportot tudunk elkülöníteni még a mi 76 beteget számláló, viszonylag kicsinek számító betegcsoportunkban is (19. ábra), ami tanulmányunkban nem volt kivitelezhető a UKALL klasszifikációval. Ez arra utal, hogy a dMLPA alapú osztályozás potenciális előrelépést jelenthet a B-ALL-es betegek rizikóbesorolásában, ezért hatékonyságát érdemes nagyobb betegcsoportokon validálni.

Vizsgálatunk alapján tehát a dMLPA egy megbízható módszer gyermekkori ALL egyes genetikai alcsoportjait meghatározó, és/vagy prognózissal összefüggő (pl. HD, *iAMP21*) kópiaszám eltéréseinek, vagy potenciálisan az egyes célzott terápiákra prediktív értékel bíró fúziós gének (pl. *NUP214-ABLI*) kimutatására (178-180). A nagyszámú genomikus lókuszt vizsgálataival végzett részletes analízis hasznos információkat szolgáltat a relapszus eredetéről, mely egyéb alternatív klonalitást vizsgáló módszerekkel nem feltétlenül kerül felderítésre. Eredményeink továbbá demonstrálják a dMLPA módszer rugalmas felhasználási lehetőségeit és erősen ajánlják a gyermekkori ALL klinikai kutatási és rutin diagnosztikai folyamataiba való integrálását.

5.3. Az MLPA helye az onkohematológiai diagnosztikában

Az onkohematológiai betegségek genetikai kutatása és diagnosztikája több mint 50 évvel a Philadelphia kromoszóma felfedezése után, még ma is rendkívül dinamikusan fejlődő terület. Ez jelentős mértékben köszönhető az utóbbi 10-15 évben bekövetkezett technológiai fejlődésnek, mely az orvosbiológiai minták genomikai tanulmányozását mind mélység, mind átfogó- és áteresztőképesség tekintetében magasabb szintre emelte. Az NGS korában egyre gyakrabban merül fel kérdésként a klasszikus és molekuláris citogenetikai technikák létjogosultsága, illetve alkalmazásuknak várható élettartama. Az elkövetkezendő években az NGS jelentős térnyerése várható a kutatás mellett a rutin diagnosztikában is, köszönhetően sokoldalú alkalmazhatóságának, egységnyi adatmennyiségre vonatkoztatva fokozatosan csökkenő árának, valamint az adatok értékelését egyre könnyebbé tevő, grafikus kezelési felületű szoftvereknek.

Jelenleg azonban úgy tűnik, hogy a hazai diagnosztikai munkafolyamatnak még sokáig szüksége lesz olyan módszerekre, melyek gyorsaságuk és megbízhatóságuk mellett költséghatékonyak is. Valószínűleg részben ez a szempont vezetett ahhoz is, hogy az „array” alapú vizsgálatok - kutatási célú alkalmazásaik ellenére - végül nem váltak rutinszerűen használatos eszközzé hazánkban. Emellett ismereteink szerint az egyes hematológiai entitások többségére viszonylag limitált számú visszatérő genetikai eltérés jellemző, mely alapján a célzott vizsgáló módszerek használata kézenfekvőnek tűnik.

A hazai diagnosztikában jelenleg a kariotipizálás és az iFISH a legelterjedtebb módszerek hematológiai betegségek kópiaszám eltéréseinek vizsgálatához, míg

pontmutációk, valamint kisméretű inzerciók, deléciók és inverziók kimutatásához a Sanger szekvenálás a leginkább használatos.

Kariotipizálással a teljes kromoszómakészlet vizsgálható, lókusztól és preparálási protokolltól függően 3-10 megabázis feloldással. A módszer időigényes és magasan képzett technikusokat kíván, teljes automatizációja a kromoszómák morfológiai variabilitása miatt nem valósítható meg. Az eljárás lehetővé tesz egyedi sejt alapú vizsgálatot, az alkalmanként 20, legfeljebb 30 osztódás analízise azonban szubklonális aberrációk kimutatását erősen limitálja. Kiindulási mintaként a technika osztódó sejteket kíván, az alkalmazott *in vitro* tenyésztés pedig klonális szelekciót idézhet elő, melynek következtében a vizsgált osztódásokban a malignus klón alulreprezentálttá válhat. További nehézség, hogy néhány entitásnál, például ALL egyes szubtípusaiban, az abnormális osztódások minősége, kromoszómáik felismerhetősége lényegesen rosszabb a mintában megjelenő, normál osztódásokéhoz képest, mely a vizsgálatot elfogulttá teheti.

Az iFISH nem igényel élő sejtet, a reakció bármely patológiai mintatípuson elvégezhető és a kariotipizálással ellentétben legkésőbb 24 órán belül eredményt szolgáltat. A vizsgálat leggyakrabban 200 interfázisban lévő sejt analízisét foglalja magában, mely a kromoszóma preparátumok értékeléséhez képest nagyobb statisztikai megbízhatóságot nyújt (181). Emellett a módszer felbontása is magasabb, a diagnosztikában használatos szondákkal tipikusan 1-2 megabázis és 100 kilobázis közötti tartomány érhető el, míg az ennél kisebb kiterjedésű (40-50 kilobázis) eltérések vizsgálatához kutatási céllal létrehozott szondák használatosak (182). Az iFISH célzott vizsgálatot tesz lehetővé, tipikusan kettő-három, ritkábban négy lókuszt egyidejű analízisével, mely a fluoreszcens jelölőanyagok részben átfedő gerjesztési és emissziós spektrumainak, valamint a detektálható fény korlátozott terjedelmű hullámhossz tartományának köszönhető. Bár az iFISH a kariotipizáláshoz képest jobban automatizálható, mikromorfológiai módszerről lévén szó, a jelek mintázatának helyes értelmezése és az eredmények precíz értékelése szintén igényel előképzettséget, valamint bizonyos mértékű manuális interakciót, mely szűk keresztmetszetet jelent nagy mintamennyiség értékelésekor.

Mutációk és kisméretű strukturális aberrációk kimutatásához a Sanger szekvenálás a legelterjedtebb technika, mely bázispár feloldással képes a mintában

legalább 20%-ban reprezentált genetikai eltéréseket vizsgálni. A módszer a nukleinsav mintáról átlagolt, nem egyedi sejt szintű információt nyújt, körülbelül 500 nukleotid terjedelemben. Egymástól távolabb elhelyezkedő genomikus régiók vizsgálatához több reakció elvégzése szükséges és nagy kiterjedésű kópiaszám eltérések kimutatása az eljárással nem lehetséges.

Ebben a környezetben az MLPA hatékony kiegészítő technikának tűnik (i) mikrodeléciók kimutatásához, akár egyedi exon szinten, mely kariotipizálással és iFISH analízissel nem érhető el; (ii) klinikailag releváns, gyakran megjelenő pontmutációk Sanger szekvenálásnál érzékenyebb szűréséhez; (iii) olyan esetekben, amikor több mint kettő-három genomikus lókuszt kópiaszám eltérésének együttes, költséghatékony vizsgálata indokolt, valamint (iv) molekuláris patológiai laboratóriumokban, ahol mikroszkópos vagy „array” alapú citogenetikai vizsgálatokra műszer vagy képzett személyzet hiányában nem nyílik lehetőség. Az MLPA reakció, mellyel kópiaszám változások, pontmutációk, illetve metilációs mintázatok egyidejűleg vizsgálhatók, bármely szövettípuson elvégezhető, és alkalmazását nem akadályozza a formalinos fixálás és paraffinba történő ágyazás sem, mely patológiai minták vizsgálatánál kiemelt fontosságú. A szonda keverék rugalmas módosíthatóságából adódóan újabb markerek vizsgálata könnyedén megvalósítható, melynek az NGS megjelenése miatt bekövetkezett genomikus forradalom idején különösen nagy jelentősége van. Emellett a módszert könnyű automatizálni, az értékelés menete néhány óra alatt elsajátítható, a módszer pedig a legnagyobb hazai laboratóriumok számára is elegendő áteresztőképességet biztosít, kevesebb, mint 24 órás átfordulási idővel.

Mindezeket figyelembe véve az MLPA hatékonyan alkalmazható eljárás, a kereskedelmi forgalomban számos betegséghez érhető el specifikus szonda keverék, akár igény szerinti módosításokkal is. Továbbá az NGS nyújtotta új lehetőségek megteremtették a feltételeit az MLPA módszer új szintre emelésének a dMLPA formájában, melynek MLPA-hoz viszonyított előnye az egyidejűleg vizsgálható lókusztok számának jelentős, körülbelül tízszeres emelkedése, ami a jövőben még tovább bővíthető, akár 1000 genomikus lókuszt együttes vizsgálatát is lehetővé téve (11). Bár irodalmi adatok a dMLPA alkalmazásáról az általunk végzett kutatásoktól eltekintve csupán ALL analízisével kapcsolatban állnak rendelkezésre, a jövőben számos új szonda keverékek megjelenése várható, ezzel tovább bővítve a vizsgálható hemopoetikus betegségek körét.

6. Következtetések

Dolgozatom új megállapításai a következők:

- A konvencionális MLPA alkalmas módszer komplex genetikai aberrációkat hordozó CLL-es esetek azonosítására, valamint ibrutinib kezelés során kialakuló CNA változások feltérképezésére, beleértve a terápia rezisztenciához vezető térbeli heterogenitás vizsgálatát is.
- Elsőként vizsgáltuk a dMLPA alkalmazhatóságát MM-ben. Eredményeink alapján a módszer magas szenzitivitás és specificitás mellett képes a teljes kromoszómákat érintő, illetve szubkromoszomális CNA-k, egyes kópiaszám eltéréssel járó intrakromoszomális fúziós gének, valamint a BRAF V600E mutáció szimultán kimutatására.
- Gyermekkori T- és B-sejtes ALL-ben a dMLPA alkalmazásával diagnóziskori és relapszuskori minták CNA profilja alapján a betegség relapszusához 3 különböző mintázatot azonosítottunk: *(i)* azonos klón visszatérése; *(ii)* klonális evolúció; valamint *(iii)* közös eredetet követő párhuzamos evolúció.
- Új rizikóbesorolást hoztunk létre gyermekkori B-sejtes ALL-ben a dMLPA által meghatározott különböző CNA-k és UKALL citogenetikai rizikócsoportok kombinálásával. Eredményeink alapján az így létrehozható 4 kombinált genetikai csoport szignifikánsan különböző túlélési aránnyal jellemezhető.

7. Összefoglalás

Az onkohematológiai betegségek rutin diagnosztikájában fontos szerepet kap a DNS kópiaszám eltéréssel (CNA) járó genetikai aberrációk kimutatása. Mivel ezen eltérések gyakorta klinikai jelentőséggel bírnak, gyors és költséghatékony vizsgálatukra nagy igény mutatkozik. A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA) egy olyan PCR alapú módszer, mely egyidőben 50-60 genomiális lókuszt CNA vizsgálatát teszi lehetővé, valamint ezzel párhuzamosan pontmutációk detektálására is alkalmas. Az új-generációs szekvenálás alapú digitális MLPA (dMLPA) pedig akár 500-1000 lókuszt CNA státuszának egyidejű vizsgálatára is elvégezhető.

Munkánk során vizsgáltuk a konvencionális MLPA módszer hatékonyságát 18 frissen diagnosztizált, valamint 6 ibrutinibbel kezelt CLL-es beteg mintáin. Teszteltük egy új, MM vizsgálatára létrehozott dMLPA szondakeverék hatékonyságát 56 MM beteg diagnóziskori csontvelő mintáján, valamint B- és T-sejtes ALL vizsgálatára alkalmas dMLPA szondakeverék felhasználásával vizsgáltuk 96 beteg csontvelői mintáját. Különös figyelmet fordítottunk a klinikailag releváns eltérések azonosítására, valamint a relapszushoz vezető folyamatok feltérképezésére.

Konvencionális MLPA-val CLL-ben számos esetben azonosítottunk prognózist befolyásoló aberrációkat, valamint sikerrel alkalmaztuk a módszert ibrutinib kezelés hatására kialakuló klonális változások vizsgálatában. MM dMLPA-val végzett vizsgálatával a nemzetközi irodalomban elsőként bizonyítottuk a módszer hatékonyságát a betegségben prognosztikus és prediktív értékkel bíró CNA-k részletes analizisében. Gyermekkori ALL-ben a dMLPA módszerrel a klinikailag releváns CNA-k feltérképezése mellett a relapszuskori minták CNA profilja alapján 3 különböző klonális mechanizmust fedtünk fel. Emellett, a dMLPA-val meghatározott CNA-k és a citogenetikai eltérések kombinálásával egy új rizikó osztályozást határoztunk meg.

Tanulmányunk alapján az MLPA alapú technikák hasznos kiegészítői lehetnek a rutin diagnosztikában alkalmazott módszereknek, valamint az onkohematológiai kutatásban is sikerrel alkalmazhatók.

8. Summary

Analysis of DNA copy number aberrations (CNAs) plays an important role in the routine diagnostic workup of hematological malignancies. Since these alterations are frequently of clinical significance there is a need for their fast and cost-efficient detection. The multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a PCR based method enabling assessment of CNAs at 50-60 different loci and is also capable of the simultaneous detection of point mutations. The next generation sequencing based digital MLPA (dMLPA) can be even more efficient with analyzing the CNA status of 500 to 1000 loci in one run.

In our study, we examined the efficacy of the conventional MLPA in samples from 18 newly diagnosed and 6 ibrutinib treated CLL patients. We also tested a novel dMLPA assay developed for MM in bone marrow samples of 56 MM patients. Additionally, we utilized a dMLPA assay in pediatric ALL for the detection of clinically relevant aberrations and dissection of mechanisms leading to disease relapse. We paid special attention to the identification of clinically relevant abnormalities and the dissection of the genetic alterations leading to relapse.

Using conventional MLPA in CLL, we identified prognostic aberrations in several cases and we also successfully applied the method to reveal patterns of clonal evolution induced by ibrutinib treatment. In MM, we were the first in the international literature to demonstrate the effectiveness dMLPA in detailed analysis of CNAs with prognostic and predictive value in the disease. In childhood ALL, in addition to mapping clinically relevant CNAs using dMLPA, three different clonal mechanisms were discovered based on the CNA profiles in paired diagnostic and relapsed samples. Furthermore, we introduced a new risk classification system by combining dMLPA-defined CNAs and cytogenetic abnormalities.

Based on our study, MLPA-based techniques represent useful complementary approaches to methods used in the routine diagnostic setting and can also be successfully applied in research of malignant hematological diseases.

9. Irodalomjegyzék

1. Greaves M. (2016) Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment. *Nat Rev Cancer*, 16: 163-172.
2. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500: 415-421.
3. Nowell P. HD. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*: 1497.
4. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2: 561-566.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127: 2391-2405.
6. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127: 2375-2390.
7. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. (2017) Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 130: 410-423.

8. Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD. (1994) The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood*, 83: 2780-2786.
9. Reams AB, Roth JR. (2015) Mechanisms of gene duplication and amplification. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
10. Cao P, Wang M, Wang F, Zhang Y, Zhang Y, Chen X, Tan Y, Ma X, Guo Y, Liu H. (2018) Copy Number Monitoring from Tumor-Only Targeted Gene Sequencing in Hematological Malignancies. *Blood*, 132: 4086-4086.
11. Benard-Slagter A, Zondervan I, de Groot K, Ghazavi F, Sarhadi V, Van Vlierberghe P, De Moerloose B, Schwab C, Vettenranta K, Harrison CJ, Knuutila S, Schouten J, Lammens T, Savola S. (2017) Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Detection of Key Copy Number Alterations in T- and B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *J Mol Diagn*, 19: 659-672.
12. Kiss R, Kosztolanyi S, Gango A, Szuhai K, Bodor C, Alpar D. (2018) [Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research]. *Orv Hetil*, 159: 583-592.
13. Kiss R, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bártai B, Mátrai Z, Bödör C, Alpár D. (2018) Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 31-40.
14. Homig-Holzel C, Savola S. (2012) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol*, 21: 189-206.
15. Moelans CB, Atanesyan L, Savola SP, van Diest PJ. (2018) Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA). *Methods Mol Biol*, 1708: 537-549.
16. Lee C-J, Evans J, Kim K, Chae H, Kim S. Determining the Effect of DNA Methylation on Gene Expression in Cancer Cells. In: MF Ochs (szerk.), *Gene Function Analysis*. Humana Press, Totowa, NJ, 2014: 161-178.

17. Atanesyan L, Steenkamer MJ, Horstman A, Moelans CB, Schouten JP, Savola SP. (2017) Optimal Fixation Conditions and DNA Extraction Methods for MLPA Analysis on FFPE Tissue-Derived DNA. *Am J Clin Pathol*, 147: 60-68.
18. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, Ryan SL, Yigittop H, Schouten JP, Harrison CJ. (2010) 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*, 49: 1104-1113.
19. Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, Richards SM, Morrison H, Masic D, Jones L, Kinsey SE, Vora AJ, Mitchell CD, Harrison CJ, Moorman AV. (2011) Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*, 117: 2129-2136.
20. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, Jones L, Masic D, Minto L, Morrison H, Ryan S, Robinson H, Sinclair P, Moorman AV, Strefford JC, Harrison CJ. (2011) Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 117: 6848-6855.
21. Branford S, Yeung DT, Prime JA, Choi SY, Bang JH, Park JE, Kim DW, Ross DM, Hughes TP. (2012) BCR-ABL1 doubling times more reliably assess the dynamics of CML relapse compared with the BCR-ABL1 fold rise: implications for monitoring and management. *Blood*, 119: 4264-4271.
22. Alpar D, de Jong D, Savola S, Yigittop H, Kajtar B, Kereskai L, Pajor L, Szuhai K. (2012) 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*, 205: 465-469.
23. Buitenkamp TD, Pieters R, Gallimore NE, van der Veer A, Meijerink JP, Beverloo HB, Zimmermann M, de Haas V, Richards SM, Vora AJ, Mitchell CD, Russell LJ, Schwab C, Harrison CJ, Moorman AV, van den Heuvel-Eibrink MM, den Boer ML, Zwaan CM. (2012) Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia*, 26: 2204-2211.

24. Marks DI, Moorman AV, Chilton L, Paietta E, Enshaie A, DeWald G, Harrison CJ, Fielding AK, Foroni L, Goldstone AH, Litzow MR, Luger SM, McMillan AK, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Wiernik P, Lazarus HM. (2013) The clinical characteristics, therapy and outcome of 85 adults with acute lymphoblastic leukemia and t(4;11)(q21;q23)/MLL-AFF1 prospectively treated in the UKALLXII/ECOG2993 trial. *Haematologica*, 98: 945-952.
25. Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, Masic D, Patel B, Rowe JM, Tallman M, Goldstone AH, Fielding AK, Harrison CJ. (2012) IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 30: 3100-3108.
26. Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, Longinotti G, Frison D, Cario G, Shochat C, Stanulla M, Rossi V, Di Meglio AM, Villa T, Giarin E, Fazio G, Leszl A, Schrappe M, Basso G, Biondi A, Izraeli S, Conter V, Valsecchi MG, Cazzaniga G, Te Kronnie G. (2012) Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 26: 2245-2253.
27. Waanders E, Scheijen B, van der Meer LT, van Reijmersdal SV, van Emst L, Kroeze Y, Sonneveld E, Hoogerbrugge PM, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Kuiper RP. (2012) The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. *PLoS Genet*, 8: e1002533.
28. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, Drunat S, Soulier J, Gandemer V, Baruchel A, Bertrand Y, Cavé H, Clappier E. (2013) Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 98: 597-601.
29. Dorge P, Meissner B, Zimmermann M, Moricke A, Schrauder A, Bouquin JP, Schewe D, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Ratei R, Ludwig WD, Koehler R, Bartram CR, Schrappe M, Stanulla M, Cario G. (2013) IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*, 98: 428-432.

30. Dupuis A, Gaub MP, Legrain M, Drenou B, Mauvieux L, Lutz P, Herbrecht R, Chan S, Kastner P. (2013) Biclonal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations. *Leukemia*, 27: 503-507.
31. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, Strehl S, Nebral K, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Zimmerman M, Dastuge N, Baruchel A, Soulier J, Auclerc MF, Attarbaschi A, Mann G, Stark B, Cazzaniga G, Chilton L, Vandenberghe P, Forestier E, Haltrich I, Raimondi SC, Parihar M, Bourquin JP, Tchinda J, Haferlach C, Vora A, Hunger SP, Heerema NA, Haas OA. (2014) An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*, 28: 1015-1021.
32. Krentz S, Hof J, Mendioroz A, Vaggopoulou R, Dorge P, Lottaz C, Engelmann JC, Groeneveld TW, Korner G, Seeger K, Hagemeyer C, Henze G, Eckert C, von Stackelberg A, Kirschner-Schwabe R. (2013) Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 27: 295-304.
33. Meyer C, Zur Stadt U, Escherich G, Hofmann J, Binato R, Barbosa TC, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Horstmann M, Marschalek R. (2013) Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res*, 3: 165-173.
34. Ofverholm I, Tran AN, Heyman M, Zachariadis V, Nordenskjold M, Nordgren A, Barbany G. (2013) Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia*, 27: 1936-1939.
35. Palmi C, Valsecchi MG, Longinotti G, Silvestri D, Carrino V, Conter V, Basso G, Biondi A, Kronnie GT, Cazzaniga G. (2013) What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica*, 98: 1226-1231.
36. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, Russell LJ, Moorman AV, Harrison CJ. (2013) Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica*, 98: 1081-1088.

37. Yamashita Y, Shimada A, Yamada T, Yamaji K, Hori T, Tsurusawa M, Watanabe A, Kikuta A, Asami K, Saito AM, Horibe K. (2013) IKZF1 and CRLF2 gene alterations correlate with poor prognosis in Japanese BCR-ABL1-negative high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60: 1587-1592.
38. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal SV, Russell LJ, Harrison CJ, Evans WE, van der Velden VH, Hoogerbrugge PM, Van Leeuwen F, Escherich G, Horstmann MA, Mohammadi Khankahdani L, Rizopoulos D, De Groot-Kruseman HA, Sonneveld E, Kuiper RP, Den Boer ML. (2013) Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*, 122: 2622-2629.
39. Asai D, Imamura T, Yamashita Y, Suenobu S-i, Moriya-Saito A, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Endo M, Hatakeyama N, Kawasaki H, Hori H, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Watanabe A, Kikuta A, Oda M, Sato A, for the Japan Association of Childhood Leukemia S, Children's C, Leukemia Study G. (2014) Outcome of TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Japan: a collaborative study of Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) and Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG). *Cancer Medicine*, 3: 623-631.
40. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, Bakkus M, Caye A, Khemiri A, Giroux C, Hernandez L, Kabongo E, Savola S, Leblanc T, Yakouben K, Plat G, Costa V, Ferster A, Girard S, Fenneteau O, Cayuela JM, Sigaux F, Dastugue N, Suciú S, Benoit Y, Bertrand Y, Soulier J, Cave H. (2014) An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia*, 28: 70-77.
41. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, Swidenbank I, Ponthan F, Kirschner-Schwabe R, Groeneveld-Krentz S, Hof J, Allan J, Harrison C, Vormoor J, von Stackelberg A, Eckert C. (2014) Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*, 124: 3420-3430.

42. Konialis C, Savola S, Karapanou S, Markaki A, Karabela M, Polychronopoulou S, Ampatzidou M, Voulgarelis M, Viniou NA, Variami E, Koumarianou A, Zoi K, Hagnefelt B, Schouten JP, Pangalos C. (2014) Routine application of a novel MLPA-based first-line screening test uncovers clinically relevant copy number aberrations in haematological malignancies undetectable by conventional cytogenetics. *Hematology*, 19: 217-224.
43. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, Richardson S, Hancock J, Kinsey SE, Mitchell CD, Goulden N, Vora A, Harrison CJ. (2014) A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 124: 1434-1444.
44. Othman MA, Rincic M, Melo JB, Carreira IM, Alhourani E, Hunstig F, Glaser A, Liehr T. (2014) A Novel Cryptic Three-Way Translocation t(2;9;18)(p23.2;p21.3;q21.33) with Deletion of Tumor Suppressor Genes in 9p21.3 and 13q14 in a T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Res Treatment*, 2014: 357123.
45. Rohde M, Bonn BR, Zimmermann M, Szczepanowski M, Damm-Welk C, Stanulla M, Burkhardt B. (2015) Multiplex ligation-dependent probe amplification validates LOH6q analyses and enhances insight into chromosome 6q aberrations in pediatric T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 56: 1884-1887.
46. Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, Kiyokawa N, Oda M, Sato A. (2014) An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*, 53: 815-823.
47. van der Veer A, Zaliouva M, Mottadelli F, De Lorenzo P, Te Kronnie G, Harrison CJ, Cave H, Trka J, Saha V, Schrappe M, Pieters R, Biondi A, Valsecchi MG, Stanulla M, den Boer ML, Cazzaniga G. (2014) IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood*, 123: 1691-1698.
48. Walsh KM, de Smith AJ, Welch TC, Smirnov I, Cunningham MJ, Ma X, Chokkalingam AP, Dahl GV, Roberts W, Barcellos LF, Buffler PA, Metayer C, Wiemels JL. (2014) Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age

- at diagnosis in Hispanic children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*, 89: 721-725.
49. Barbosa TC, Terra-Granado E, Quezado Magalhaes IM, Neves GR, Gadelha A, Guedes Filho GE, Souza MS, Melaragno R, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS. (2015) Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. *Cancer Genet*, 208: 492-501.
 50. Boer JM, Koenders JE, van der Holt B, Exalto C, Sanders MA, Cornelissen JJ, Valk PJ, den Boer ML, Rijneveld AW. (2015) Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica*, 100: e261-264.
 51. Clappier E, Gardel N, Bakkus M, Rapon J, De Moerloose B, Kastner P, Caye A, Vivent J, Costa V, Ferster A, Lutz P, Mazingue F, Millot F, Plantaz D, Plat G, Plouvier E, Poiree M, Sirvent N, Uyttebroeck A, Yakouben K, Girard S, Dastugue N, Suciú S, Benoit Y, Bertrand Y, Cave H. (2015) IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia*, 29: 2154-2161.
 52. Fuka G, Farias-Vieira TM, Hummel L, Blunck CB, Santoro JC, Terra-Granado E, Conceição Barbosa T, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS. (2015) Evaluation of multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for identification of acute lymphoblastic leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) in a Brazilian population. *Molecular Cytogenetics*, 8: 35.
 53. Janczar K, Janczar S, Pastorczak A, Mycko K, Paige AJ, Zalewska-Szewczyk B, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Mlynarski W. (2015) Preserved global histone H4 acetylation linked to ETV6-RUNX1 fusion and PAX5 deletions is associated with favorable outcome in pediatric B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 39: 1455-1461.
 54. Kim M, Park J, Kim DW, Kim YJ, Jeon YW, Yoon JH, Shin SH, Yahng SA, Lee SE, Cho BS, Eom KS, Kim HJ, Min CK, Cho SG, Kim Y, Lee JW, Han K, Min

- WS, Lee S. (2015) Impact of IKZF1 deletions on long-term outcomes of allo-SCT following imatinib-based chemotherapy in adult Philadelphia chromosome-positive ALL. *Bone Marrow Transplant*, 50: 354-362.
55. Othman MA, Grygalewicz B, Pienkowska-Grela B, Rincic M, Rittscher K, Melo JB, Carreira IM, Meyer B, Marzena W, Liehr T. (2015) Novel Cryptic Rearrangements in Adult B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Involving the MLL Gene. *J Histochem Cytochem*, 63: 384-390.
 56. Othman MA, Melo JB, Carreira IM, Rincic M, Glaser A, Grygalewicz B, Gruhn B, Wilhelm K, Rittscher K, Meyer B, Silva ML, de Jesus Marques Salles T, Liehr T. (2015) High rates of submicroscopic aberrations in karyotypically normal acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cytogenet*, 8: 45.
 57. Othman MA, Melo JB, Carreira IM, Rincic M, Alhourani E, Wilhelm K, Gruhn B, Glaser A, Liehr T. (2015) MLLT10 and IL3 rearrangement together with a complex four-way translocation and trisomy 4 in a patient with early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A case report. *Oncol Rep*, 33: 625-630.
 58. van der Sligte NE, Scherpen FJ, Ter Elst A, Guryev V, van Leeuwen FN, de Bont ES. (2015) Effect of IKZF1 deletions on signal transduction pathways in Philadelphia chromosome negative pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Exp Hematol Oncol*, 4: 23.
 59. Gupta SK, Bakhshi S, Kumar L, Seth R, Kumar R. (2016) IKZF1 (IKAROS) deletions in B-ALL and its clinical correlation: A prospective study from a tertiary care centre in Northern India. *Leuk Res*, 41: 7-11.
 60. Imamura T, Yano M, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu SI, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Yumura-Yagi K, Hara J, Horibe K, Sato A. (2016) IKZF1 deletion is enriched in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients showing prednisolone resistance. *Leukemia*, 30: 1801-1803.
 61. Lopes BA, Meyer C, Barbosa TC, Zur Stadt U, Horstmann M, Venn NC, Heatley S, White DL, Sutton R, Pombo-de-Oliveira MS, Marschalek R, Emerenciano M. (2016) COBL is a novel hotspot for IKZF1 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 7: 53064-53073.

62. Kim J, Lyu CJ, Shin S, Lee ST, Choi JR. (2016) Frequency and Clinical Characteristics of Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21 in Korean Childhood B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Ann Lab Med*, 36: 475-480.
63. Kunz JB, Rausch T, Bandapalli OR, Eilers J, Pechanska P, Schuessele S, Assenov Y, Stutz AM, Kirschner-Schwabe R, Hof J, Eckert C, von Stackelberg A, Schrappe M, Stanulla M, Koehler R, Avigad S, Elitzur S, Handgretinger R, Benes V, Weischenfeldt J, Korbelt JO, Muckenthaler MU, Kulozik AE. (2015) Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica*, 100: 1442-1450.
64. Marcinkowska-Swojak M, Handschuh L, Wojciechowski P, Goralski M, Tomaszewski K, Kazmierczak M, Lewandowski K, Komarnicki M, Blazewicz J, Figlerowicz M, Kozłowski P. (2016) Simultaneous detection of mutations and copy number variation of NPM1 in the acute myeloid leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mutat Res*, 786: 14-26.
65. Schwab C, Ryan SL, Chilton L, Elliott A, Murray J, Richardson S, Wragg C, Moppett J, Cummins M, Tunstall O, Parker CA, Saha V, Goulden N, Vora A, Moorman AV, Harrison CJ. (2016) EBF1-PDGFRB fusion in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): genetic profile and clinical implications. *Blood*, 127: 2214-2218.
66. Yao Q-M, Liu K-Y, Gale RP, Jiang B, Liu Y-R, Jiang Q, Jiang H, Zhang X-H, Zhang M-J, Chen S-S, Huang X-J, Xu L-P, Ruan G-R. (2016) Prognostic impact of IKZF1 deletion in adults with common B-cell acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, 16: 269.
67. Bhandari P, Ahmad F, Das BR. (2017) Molecular profiling of gene copy number abnormalities in key regulatory genes in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia: frequency and their association with clinicopathological findings in Indian patients. *Med Oncol*, 34: 92.
68. Braun M, Pastorczak A, Fendler W, Madzio J, Tomasik B, Taha J, Bielska M, Sedek L, Szczepanski T, Matysiak M, Derwich K, Lejman M, Kowalczyk J, Kazanowska B, Badowska W, Styczynski J, Irga-Jaworska N, Trelinska J,

- Zalewska-Szewczyk B, Pierlejewski F, Wlodarska I, Mlynarski W. (2017) Biallelic loss of CDKN2A is associated with poor response to treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 58: 1162-1171.
69. Gupta SK, Bakhshi S, Kumar L, Kamal VK, Kumar R. (2017) Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 58: 333-342.
70. Katerndahl CDS, Heltemes-Harris LM, Willette MJL, Henzler CM, Fietze S, Yang R, Schjerven H, Silverstein KAT, Ramsey LB, Hubbard G, Wells AD, Kuiper RP, Scheijen B, van Leeuwen FN, Muschen M, Kornblau SM, Farrar MA. (2017) Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nat Immunol*, 18: 694-704.
71. Reyes-Nunez V, Galo-Hooker E, Perez-Romano B, Duque RE, Ruiz-Arguelles A, Garces-Eisele J. (2018) Simultaneous use of multiplex ligation-dependent probe amplification assay and flow cytometric DNA ploidy analysis in patients with acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 94: 172-181.
72. Ribera J, Zamora L, Morgades M, Mallo M, Solanes N, Batlle M, Vives S, Granada I, Junca J, Malinverni R, Genesca E, Guardia R, Mercadal S, Escoda L, Martinez-Lopez J, Tormo M, Esteve J, Pratcorona M, Martinez-Losada C, Sole F, Feliu E, Ribera JM, Spanish PG, the Spanish Society of H. (2017) Copy number profiling of adult relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia reveals potential leukemia progression mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer*, 56: 810-820.
73. Richter-Pechanska P, Kunz JB, Hof J, Zimmermann M, Rausch T, Bandapalli OR, Orlova E, Scapinello G, Sagi JC, Stanulla M, Schrappe M, Cario G, Kirschner-Schwabe R, Eckert C, Benes V, Korbelt JO, Muckenthaler MU, Kulozik AE. (2017) Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*, 7: e523.
74. Vazquez-Reyes A, Bobadilla-Morales L, Barba-Barba C, Macias-Salcedo G, Serafin-Saucedo G, Velazquez-Rivera ME, Almodovar-Cuevas MC, Marquez-Mora A, Pimentel-Gutierrez HJ, Ortega-de-la-Torre C, Cruz-Osorio RM, Nava-Gervasio S, Rivera-Vargas J, Sanchez-Zubieta F, Corona-Rivera JR, Corona-Rivera A. (2017) Aneuploidy identification in pre-B acute lymphoblastic

- leukemia patients at diagnosis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Leuk Res*, 59: 117-123.
75. Mackus WJ, Kater AP, Grummels A, Evers LM, Hooijbrink B, Kramer MH, Castro JE, Kipps TJ, van Lier RA, van Oers MH, Eldering E. (2005) Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. *Leukemia*, 19: 427-434.
 76. Buijs A, Krijtenburg PJ, Meijer E. (2006) Detection of risk-identifying chromosomal abnormalities and genomic profiling by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 91: 1434-1435.
 77. Santidrian AF, Cosialls AM, Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, de Frias M, Gonzalez-Girones DM, Campas C, Domingo A, Pons G, Gil J. (2007) The potential anticancer agent PK11195 induces apoptosis irrespective of p53 and ATM status in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 92: 1631-1638.
 78. Coll-Mulet L, Santidrián AF, Cosialls AM, Iglesias-Serret D, De Frias M, Grau J, Menoyo A, González-Barca E, Pons G, Domingo A, Gil J. (2008) Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 142: 793-801.
 79. Hanlon K, Harries LW, Ellard S, Rudin CE. (2009) Evaluation of 13q14 Status in Multiple Myeloma by Digital Single Nucleotide Polymorphism Technology. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 11: 450-457.
 80. Stevens-Kroef M, Simons A, Gorissen H, Feuth T, Weghuis DO, Buijs A, Raymakers R, Geurts van Kessel A. (2009) Identification of chromosomal abnormalities relevant to prognosis in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Genet Cytogenet*, 195: 97-104.
 81. Mous R, Jaspers A, Luijks DM, Mellink CH, van Oers MH, Kater AP, Eldering E. (2009) Detection of p53 dysfunction in chronic lymphocytic leukaemia cells through multiplex quantification of p53 target gene induction. *Leukemia*, 23: 1352-1355.

82. Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, Riddell DC, Greer WL. (2010) Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Versus Multiprobe Fluorescence in Situ Hybridization To Detect Genomic Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Tertiary Center Experience. *The Journal of Molecular Diagnostics* : JMD, 12: 197-203.
83. Abdool A, Donahue AC, Wohlgenuth JG, Yeh C-H. (2010) Detection, Analysis and Clinical Validation of Chromosomal Aberrations by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Chronic Leukemia. *PLOS ONE*, 5: e15407.
84. Groenen PJTA, Raymakers R, Rombout PDM, de Prenter M, Kossen L, Philipsen-Jansen C, Feuth T, Meijer JWR, van Kessel AG, van Krieken JHJM, Stevens-Kroef M. (2011) High prevalence of adverse prognostic genetic aberrations and unmutated IGHV genes in small lymphocytic lymphoma as compared to chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematopathology*, 4: 189-197.
85. Fabris S, Scarciolla O, Morabito F, Cifarelli RA, Dininno C, Cutrona G, Matis S, Recchia AG, Gentile M, Ciceri G, Ferrarini M, Ciancio A, Mannarella C, Neri A, Fragasso A. (2011) Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization to detect chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: a comparative study. *Genes Chromosomes Cancer*, 50: 726-734.
86. Veronese L, Tournilhac O, Combes P, Prie N, Pierre-Eymard E, Guieze R, Veyrat-Masson R, Bay JO, Vago P, Tchirkov A. (2013) Contribution of MLPA to routine diagnostic testing of recurrent genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet*, 206: 19-25.
87. Alhourani E, Rincic M, Othman MAK, Pohle B, Schlie C, Glaser A, Liehr T. (2014) Comprehensive chronic lymphocytic leukemia diagnostics by combined multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH). *Molecular Cytogenetics*, 7: 79.
88. te Raa GD, Moerland PD, Leeksma AC, Derks IA, Yigittop H, Laddach N, Loden-van Straaten M, Navrkalova V, Trbusek M, Luijks DM, Zenz T, Skowronska A, Hoogendoorn M, Stankovic T, van Oers MH, Eldering E, Kater AP. (2015)

- Assessment of p53 and ATM functionality in chronic lymphocytic leukemia by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cell Death Dis*, 6: e1852.
89. Rendeiro AF, Schmidl C, Strefford JC, Walewska R, Davis Z, Farlik M, Oscier D, Bock C. (2016) Chromatin accessibility maps of chronic lymphocytic leukaemia identify subtype-specific epigenome signatures and transcription regulatory networks. *Nat Commun*, 7: 11938.
 90. van der Sligte NE, Krumbholz M, Pastorczyk A, Scheijen B, Tauer JT, Nowasz C, Sonneveld E, de Bock GH, Meeuwsen-de Boer TG, van Reijmersdal S, Kuiper RP, Bradtke J, Metzler M, Suttorp M, de Bont ES, van Leeuwen FN. (2014) DNA copy number alterations mark disease progression in paediatric chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 166: 250-253.
 91. Lavrov AV, Ustaeva OA, Adilgereeva EP, Smirnikhina SA, Chelysheva EY, Shukhov OA, Shatokhin YV, Mordanov SV, Turkina AG, Kutsev SI. (2017) Copy number variation analysis in cytochromes and glutathione S-transferases may predict efficacy of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *PLoS One*, 12: e0182901.
 92. Havranek O, Kleiblova P, Hojny J, Lhota F, Soucek P, Trneny M, Kleibl Z. (2015) Association of Germline CHEK2 Gene Variants with Risk and Prognosis of Non-Hodgkin Lymphoma. *PLoS One*, 10: e0140819.
 93. Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, Wohlgemuth JG, Yeh CH. (2011) Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 35: 1477-1483.
 94. Delfau-Larue MH, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, Casasnovas O, Feugier P, Haioun C, Ribrag V, Thieblemont C, Unterhalt M, Dreyling M, Macintyre E, Pott C, Hermine O, Hoster E. (2015) High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*, 126: 604-611.
 95. Alpar D, de Jong D, Holczer-Nagy Z, Kajtar B, Savola S, Jakso P, David M, Kosztolanyi S, Kereskai L, Pajor L, Szuhai K. (2013) Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization are

- complementary techniques to detect cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, 52: 785-793.
96. Boyle EM, Proszek PZ, Kaiser MF, Begum D, Dahir N, Savola S, Wardell CP, Leleu X, Ross FM, Chiecchio L, Cook G, Drayson MT, Owen RG, Ashcroft JM, Jackson GH, Anthony Child J, Davies FE, Walker BA, Morgan GJ. (2015) A molecular diagnostic approach able to detect the recurrent genetic prognostic factors typical of presenting myeloma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 54: 91-98.
 97. Zang M, Zou D, Yu Z, Li F, Yi S, Ai X, Qin X, Feng X, Zhou W, Xu Y, Li Z, Hao M, Sui W, Deng S, Acharya C, Zhao Y, Ru K, Qiu L, An G. (2015) Detection of recurrent cytogenetic aberrations in multiple myeloma: a comparison between MLPA and iFISH. *Oncotarget*, 6: 34276-34287.
 98. Campregher PV, Hamerschlak N. (2014) Novel prognostic gene mutations identified in chronic lymphocytic leukemia and their impact on clinical practice. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 14: 271-276.
 99. Rodriguez-Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. (2013) Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genet*, 206: 49-62.
 100. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai KR, Byrd JC, Eichhorst B, O'Brien S, Robak T, Seymour JF, Kipps TJ. (2018) iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131: 2745-2760.
 101. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343: 1910-1916.
 102. Guipaud O, Deriano L, Salin H, Vallat L, Sabatier L, Merle-Beral H, Delic J. (2003) B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol*, 4: 505-514.
 103. Fesus V, Marosvari D, Kajtar B, Kiraly PA, Demeter J, Gurbity Palfi T, Egyed M, Plander M, Farkas P, Matrai Z, Matolcsy A, Bodor C. (2017) [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia]. *Orv. Hetil.*, 158: 220-228.

104. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, Herman SE, Tian X, Marti G, Soto S, Hughes TE, Jones J, Lipsky A, Pittaluga S, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Lee YS, Pedersen LB, Geisler CH, Calvo KR, Arthur DC, Maric I, Childs R, Young NS, Wiestner A. (2015) Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 16: 169-176.
105. Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJ, Smith G, Powell JE, Rudzki Z, Kearns P, Moss PA, Taylor AM, Stankovic T. (2010) The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood*, 116: 4578-4587.
106. Rajkumar SV. (2016) Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 91: 719-734.
107. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, Dawson KJ, Iorio F, Nik-Zainal S, Bignell GR, Hinton JW, Li Y, Tubio JMC, McLaren S, O' Meara S, Butler AP, Teague JW, Mudie L, Anderson E, Rashid N, Tai Y-T, Shammas MA, Sperling AS, Fulciniti M, Richardson PG, Parmigiani G, Magrangeas F, Minvielle S, Moreau P, Attal M, Facon T, Futreal PA, Anderson KC, Campbell PJ, Munshi NC. (2014) Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*, 5: 2997.
108. Boyd KD, Pawlyn C, Morgan GJ, Davies FE. (2012) Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert Rev Hematol*, 5: 603-617.
109. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE, Drier Y, Fonseca R, Gabriel SB, Hofmeister CC, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Krishnan A, Levy J, Liefeld T, Lonial S, Mahan S, Mfuko B, Monti S, Perkins LM, Onofrio R, Pugh TJ, Rajkumar SV, Ramos AH, Siegel DS, Sivachenko A, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Voet D, Winckler W, Zimmerman T, Carpten J, Trent J, Hahn WC, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471: 467-472.

110. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, Hulin C, Leleu X, Orsini-Piocelle F, Blade JS, Sohn C, Karlin L, Delbrel X, Hebraud B, Roussel M, Marit G, Garderet L, Mohty M, Rodon P, Voillat L, Royer B, Jaccard A, Belhadj K, Fontan J, Caillot D, Stoppa AM, Attal M, Facon T, Moreau P, Minvielle S, Avet-Loiseau H. (2015) Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*, 126: 2713-2719.
111. Jacobus SJ, Kumar S, Uno H, Van Wier SA, Ahmann GJ, Henderson KJ, Callander NS, Williams ME, Siegel DS, Greipp PR, Rajkumar SV, Fonseca R. (2011) Impact of high-risk classification by FISH: an eastern cooperative oncology group (ECOG) study E4A03. *Br J Haematol*, 155: 340-348.
112. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Hayman SR, Buadi FK, Dingli D, Knudson RA, Greenberg A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Lust JA, Kyle RA, Bergsagel L, Rajkumar SV. (2012) Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood*, 119: 2100-2105.
113. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12: 335-348.
114. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, Proszek PZ, Johnson DC, Kaiser MF, Melchor L, Aronson LI, Scales M, Pawlyn C, Mirabella F, Jones JR, Brioli A, Mikulasova A, Cairns DA, Gregory WM, Quartilho A, Drayson MT, Russell N, Cook G, Jackson GH, Leleu X, Davies FE, Morgan GJ. (2015) Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*, 33: 3911-3920.
115. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, Johnson DC, Gonzalez D, Dagrada GP, Protheroe RK, Konn ZJ, Stockley DM, Gregory WM, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ. (2010) A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 116: e56-65.
116. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, Attal M, Marit G, Mathiot C, Facon T, Moreau P, Anderson KC, Campion L,

- Munshi NC, Minvielle S. (2009) Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 27: 4585-4590.
117. Shah V, Sherborne AL, Walker BA, Johnson DC, Boyle EM, Ellis S, Begum DB, Proszek PZ, Jones JR, Pawlyn C, Savola S, Jenner MW, Drayson MT, Owen RG, Houlston RS, Cairns DA, Gregory WM, Cook G, Davies FE, Jackson GH, Morgan GJ, Kaiser MF. (2018) Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia*, 32: 102-110.
118. Iacobucci I, Mullighan CG. (2017) Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*, 35: 975-983.
119. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. (2009) Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*, 34: 1603-1612.
120. Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, McCastlain K, Edmonson M, Pounds SB, Shi L, Zhou X, Ma X, Sioson E, Li Y, Rusch M, Gupta P, Pei D, Cheng C, Smith MA, Auvil JG, Gerhard DS, Relling MV, Winick NJ, Carroll AJ, Heerema NA, Raetz E, Devidas M, Willman CL, Harvey RC, Carroll WL, Dunsmore KP, Winter SS, Wood BL, Sorrentino BP, Downing JR, Loh ML, Hunger SP, Zhang J, Mullighan CG. (2017) The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 49: 1211-1218.
121. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446: 758-764.
122. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 322: 1377-1380.
123. Alpar D, Pajor G, Varga P, Kajtar B, Poto L, Matics R, Vojcek A, Ottoffy G, Szuhai K, Pajor L. (2014) Sequential and hierarchical chromosomal changes and

- chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 61: 2208-2214.
124. Paulsson K, Johansson B. (2009) High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 637-660.
 125. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, Alonso CN, Attarbaschi A, Barbany G, den Boer ML, Boer JM, Braun M, Dalla Pozza L, Elitzur S, Emerenciano M, Fechina L, Felice MS, Fronkova E, Haltrich I, Heyman MM, Horibe K, Imamura T, Jeison M, Kovacs G, Kuiper RP, Mlynarski W, Nebral K, Ivanov Ofverholm I, Pastorczak A, Pieters R, Piko H, Pombo-de-Oliveira MS, Rubio P, Strehl S, Stary J, Sutton R, Trka J, Tsauro G, Venn N, Vora A, Yano M, Harrison CJ, Moorman AV. (2019) Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv*, 3: 148-157.
 126. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, Moricke A, Palmi C, Cazzaniga G, Eckert C, Te Kronnie G, Bourquin JP, Bornhauser B, Koehler R, Bartram CR, Ludwig WD, Bleckmann K, Groeneveld-Krentz S, Schewe D, Junk SV, Hinze L, Klein N, Kratz CP, Biondi A, Borkhardt A, Kulozik A, Muckenthaler MU, Basso G, Valsecchi MG, Izraeli S, Petersen BS, Franke A, Dorge P, Steinemann D, Haas OA, Panzer-Grumayer R, Cave H, Houlston RS, Cario G, Schrappe M, Zimmermann M. (2018) IKZF1(plus) Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*, 36: 1240-1249.
 127. Ma Y, Dobbins SE, Sherborne AL, Chubb D, Galbiati M, Cazzaniga G, Micalizzi C, Tearle R, Lloyd AL, Hain R, Greaves M, Houlston RS. (2013) Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 7429-7433.
 128. Usvasalo A, Savola S, Raty R, Vettenranta K, Harila-Saari A, Koistinen P, Savolainen ER, Elonen E, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S. (2008) CDKN2A deletions in acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults: an array CGH study. *Leuk Res*, 32: 1228-1235.
 129. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA,

- Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR, Children's Oncology G. (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 360: 470-480.
130. Pajor L, Szuhai K, Mehes G, Kosztolanyi G, Jakso P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtar P. (1998) Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry*, 34: 87-94.
131. Szuhai K, Mehes G, Kosztolanyi G, Kajtar P, Lendvai G, Szanyi I, Pajor L. (1997) [Application of interphase cytogenetics for the determination of changes in the DNA content in acute childhood lymphoid leukemia]. *Orv. Hetil.*, 138: 3111-3119.
132. Thakral D, Kaur G, Gupta R, Benard-Slagter A, Savola S, Kumar I, Anand R, Rani L, Verma P, Joshi S, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, Seth R, Singh V. (2019) Rapid Identification of Key Copy Number Alterations in B- and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Frontiers in oncology*, 9: 871-871.
133. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutierrez NC, Liebisch P, O'Connor S, Dalva K, Fabris S, Testi AM, Jarosova M, Hodgkinson C, Collin A, Kerndrup G, Kuglik P, Ladon D, Bernasconi P, Maes B, Zemanova Z, Michalova K, Michau L, Neben K, Hermansen NE, Rack K, Rocci A, Protheroe R, Chiecchio L, Poirel HA, Sonneveld P, Nyegaard M, Johnsen HE. (2012) Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*, 97: 1272-1277.
134. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai KR, Byrd JC, Eichhorst B, O'Brien S, Robak T, Seymour JF, Kipps TJ. (2018) Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.
135. Jarosova M, Hrubá M, Oltová A, Plevová K, Kruzová L, Kriegová E, Fillerová R, Koritáková E, Doubek M, Lysák D, Procházka V, Mraz M, Indrak K, Papajik T. (2017) Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low

- relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*, 92: 604-607.
136. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P. (1999) Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med (Berl)*, 77: 266-281.
 137. Abdool A, Donahue AC, Wohlgenuth JG, Yeh C-H. (2010) Detection, analysis and clinical validation of chromosomal aberrations by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic leukemia. *PLOS ONE*, 5: 15407.
 138. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Peres E, Kujawski L, Talpaz M, Kaminski M, Li C, Shedden K, Malek SN. (2011) Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118: 3051-3061.
 139. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xivillé N, Rivas-Delgado A, Luño E, González T, Navarro B, García-Malo MD, Valiente A, Hernández J, Ardanaz MT, Piñan M, Blanco ML, Hernández-Sánchez M, Batlle-López A, Salgado R, Salido M, Ferrer A, Abrisqueta P, Gimeno E, Abella E, Ferrá C, Terol MJ, Ortuño F, Costa D, Moreno C, Carbonell F, Bosch F, Delgado J, Espinet B. (2017) Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*, 8: 54297-54303.
 140. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, Guardalben E, Liberatore C, Faraci D, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Bardi MA, Volta E, Tammiso E, Melandri A, Negrini M, Cavazzini F, Cuneo A. (2017) In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*, 129: 3495-3498.
 141. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, Johnson AJ, Sukbuntherng J, Chang BY, Clow F, Hedrick E, Buggy JJ, James DF, O'Brien S. (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 369: 32-42.
 142. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, Chaves J, Wierda WG, Awan FT, Brown JR, Hillmen P, Stephens DM, Ghia P, Barrientos

- JC, Pagel JM, Woyach J, Johnson D, Huang J, Wang X, Kaptein A, Lannutti BJ, Covey T, Fardis M, McGreivy J, Hamdy A, Rothbaum W, Izumi R, Diacovo TG, Johnson AJ, Furman RR. (2016) Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 374: 323-332.
143. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. (2014) Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 370: 997-1007.
144. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF. (2016) Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 374: 311-322.
145. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, Burger JA, Estrov Z, Jain N, Kantarjian HM, Keating MJ. (2015) Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, 121: 3612-3621.
146. Thompson PA, Wierda WG, Ferrajoli A, Smith SC, O'Brien S, Burger JA, Estrov Z, Jain N, Kantarjian HM, Keating MJ. (2014) Complex Karyotype, Rather Than Del(17p), Is Associated with Inferior Outcomes in Relapsed or Refractory CLL Patients Treated with Ibrutinib-Based Regimens. *Blood*, 124: 22.
147. Cosson A, Chapiro E, Bougacha N, Lambert J, Herbi L, Cung HA, Algrin C, Keren B, Damm F, Gabillaud C, Brunelle-Navas MN, Davi F, Merle-Beral H, Le Garff-Tavernier M, Roos-Weil D, Choquet S, Uzunov M, Morel V, Leblond V, Maloum K, Lepretre S, Feugier P, Lesty C, Lejeune J, Sutton L, Landesman Y, Susin SA, Nguyen-Khac F. (2017) Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia*, 31: 1625-1629.

148. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Fama R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foa R, Rabadan R, Gaidano G. (2014) Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123: 2139-2147.
149. Kosztolanyi S, Kiss R, Atanesyan L, Gango A, de Groot K, Steenkamer M, Jakso P, Matolcsy A, Kajtar B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bodor C, Alpar D. (2018) High-Throughput Copy Number Profiling by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Multiple Myeloma. *J Mol Diagn*, 20: 777-788.
150. Robiou du Pont S, Cleyne A, Fontan C, Attal M, Munshi N, Corre J, Avet-Loiseau H. (2017) Genomics of Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*, 35: 963-967.
151. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S, Neri A, Barlogie B, Kuehl WM, Liebisch P, Davies F, Chen-Kiang S, Durie BG, Carrasco R, Sezer O, Reiman T, Pilarski L, Avet-Loiseau H. (2009) International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 23: 2210-2221.
152. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, Roussel M, Caillet D, Marit G, Karlin L, Hulin C, Gentil C, Guilhot F, Garderet L, Lamy T, Brechignac S, Pegourie B, Jaubert J, Dib M, Stoppa AM, Sebban C, Fohrer C, Fontan J, Fruchart C, Macro M, Orsini-Piocelle F, Lepeu G, Sohn C, Corre J, Facon T, Moreau P, Attal M, Avet-Loiseau H. (2014) Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*, 28: 675-679.
153. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S, Chang XB, Bjorklund CC, Fonseca R, Bergsagel PL, Orlovski RZ, Stewart AK. (2011) Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*, 118: 4771-4779.
154. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, Munshi N, Palumbo A, Miguel JS, Sonneveld P, Cavo M, Usmani S, Durie BG, Avet-Loiseau H. (2014) IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*, 28: 269-277.

155. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. (2015) Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33: 2863-2869.
156. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. (2017) Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 14: 100-113.
157. Smetana J, Frohlich J, Zaoralova R, Vallova V, Greslikova H, Kupska R, Nemecek P, Mikulasova A, Almasi M, Pour L, Adam Z, Sandecka V, Zahradová L, Hajek R, Kuglik P. (2014) Genome-Wide Screening of Cytogenetic Abnormalities in Multiple Myeloma Patients Using Array-CGH Technique: A Czech Multicenter Experience. *BioMed Research International*, 2014: 209670.
158. Andrulis M, Lehnert N, Capper D, Penzel R, Heining C, Huellein J, Zenz T, von Deimling A, Schirmacher P, Ho AD, Goldschmidt H, Neben K, Raab MS. (2013) Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov*, 3: 862-869.
159. Chavan SS, He J, Tytarenko R, Deshpande S, Patel P, Bailey M, Stein CK, Stephens O, Weinhold N, Petty N, Steward D, Rasche L, Bauer M, Ashby C, Peterson E, Ali S, Ross J, Miller VA, Stephens P, Thanendrarajan S, Schinke C, Zangari M, van Rhee F, Barlogie B, Mughal TI, Davies FE, Morgan GJ, Walker BA. (2017) Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying RB1 as an independent prognostic marker. *Blood Cancer J*, 7: e535.
160. Thanendrarajan S, Tian E, Qu P, Mathur P, Schinke C, van Rhee F, Zangari M, Rasche L, Weinhold N, Alapat D, Bellamy W, Ashby C, Mattox S, Epstein J, Yaccoby S, Barlogie B, Hoering A, Bauer M, Walker BA, Davies FE, Morgan GJ. (2017) The level of deletion 17p and bi-allelic inactivation of TP53 has a significant impact on clinical outcome in multiple myeloma. *Haematologica*, 102: e364-e367.

161. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL. (2007) Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12: 131-144.
162. Pui CH, Yang JJ, Bhakta N, Rodriguez-Galindo C. (2018) Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Child Adolesc Health*, 2: 440-454.
163. Terwilliger T, Abdul-Hay M. (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*, 7: e577.
164. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, Vora A, Baruchel A, Silverman LB, Schmiegelow K, Escherich G, Horibe K, Benoit YC, Izraeli S, Yeoh AE, Liang DC, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Mullighan CG. (2015) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*, 33: 2938-2948.
165. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, van Delft FW, Bateman CM, Titley I, Kearney L, Szczepanski T, Gonzalez D, Ford AM, Potter NE, Greaves M. (2015) Clonal origins of ETV6-RUNX1(+) acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia*, 29: 839-846.
166. Gawad C, Pepin F, Carlton VE, Klinger M, Logan AC, Miklos DB, Faham M, Dahl G, Lacayo N. (2012) Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120: 4407-4417.
167. Laszlo R, Alpar D, Kajtar B, Lacza A, Ottoffy G, Kiss C, Bartyik K, Nagy K, Pajor L. (2010) Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up. *Pediatr Blood Cancer*, 54: 158-160.
168. Peham M, Konrad M, Harbott J, Konig M, Haas OA, Panzer-Grumayer ER. (2004) Clonal variation of the immunogenotype in relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia indicates subclone formation during early stages of leukemia development. *Genes Chromosomes Cancer*, 39: 156-160.

169. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17: 2257-2317.
170. Bashford-Rogers RJ, Nicolaou KA, Bartram J, Goulden NJ, Loizou L, Koumas L, Chi J, Hubank M, Kellam P, Costeas PA, Vassiliou GS. (2016) Eye on the B-ALL: B-cell receptor repertoires reveal persistence of numerous B-lymphoblastic leukemia subclones from diagnosis to relapse. *Leukemia*, 30: 2312-2321.
171. Theunissen PMJ, de Bie M, van Zessen D, de Haas V, Stubbs AP, van der Velden VHJ. (2019) Next-generation antigen receptor sequencing of paired diagnosis and relapse samples of B-cell acute lymphoblastic leukemia: Clonal evolution and implications for minimal residual disease target selection. *Leuk Res*, 76: 98-104.
172. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM. (2007) High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*, 21: 1258-1266.
173. Szarzynska-Zawadzka B, Kunz JB, Sedek L, Kosmalka M, Zdon K, Biecek P, Bandapalli OR, Kraszewska-Hamilton M, Jaksik R, Drobna M, Kowalczyk JR, Szczepanski T, Van Vlierberghe P, Kulozik AE, Witt M, Dawidowska M. (2019) PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. *Am J Hematol*, 94: E93-e96.
174. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, Wang J, Morrison D, Devidas M, Hunger SP, Willman CL, Raetz EA, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Carroll WL. (2008) Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 112: 4178-4183.

175. Scheijen B, Boer JM, Marke R, Tijchon E, van Ingen Schenau D, Waanders E, van Emst L, van der Meer LT, Pieters R, Escherich G, Horstmann MA, Sonneveld E, Venn N, Sutton R, Dalla-Pozza L, Kuiper RP, Hoogerbrugge PM, den Boer ML, van Leeuwen FN. (2017) Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients. *Haematologica*, 102: 541-551.
176. Irving JA, Enshaei A, Parker CA, Sutton R, Kuiper RP, Erhorn A, Minto L, Venn NC, Law T, Yu J, Schwab C, Davies R, Matheson E, Davies A, Sonneveld E, den Boer ML, Love SB, Harrison CJ, Hoogerbrugge PM, Revesz T, Saha V, Moorman AV. (2016) Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 128: 911-922.
177. Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, Boeree A, de Haas V, de Groot-Kruseman HA, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, den Boer ML. (2019) Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*, 9: 4634.
178. Boer JM, van der Veer A, Rizopoulos D, Fiocco M, Sonneveld E, de Groot-Kruseman HA, Kuiper RP, Hoogerbrugge P, Horstmann M, Zaliova M, Palmi C, Trka J, Fronkova E, Emerenciano M, do Socorro Pombo-de-Oliveira M, Mlynarski W, Szczepanski T, Nebral K, Attarbaschi A, Venn N, Sutton R, Schwab CJ, Enshaei A, Vora A, Stanulla M, Schrappe M, Cazzaniga G, Conter V, Zimmermann M, Moorman AV, Pieters R, den Boer ML. (2016) Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. *Leukemia*, 30: 32-38.
179. De Keersmaecker K, Porcu M, Cox L, Girardi T, Vandepoel R, de Beeck JO, Gielen O, Mentens N, Bennett KL, Hantschel O. (2014) NUP214-ABL1-mediated cell proliferation in T-cell acute lymphoblastic leukemia is dependent on the LCK kinase and various interacting proteins. *Haematologica*, 99: 85-93.
180. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, Strehl S, Nebral K, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Zimmerman M, Dastuge N, Baruchel A, Soulier J, Auclerc MF, Attarbaschi A, Mann G, Stark B, Cazzaniga G, Chilton

- L, Vandenberghe P, Forestier E, Haltrich I, Raimondi SC, Parihar M, Bourquin JP, Tchinda J, Haferlach C, Vora A, Hunger SP, Heerema NA, Haas OA, Ponte di Legno International Workshop in Childhood Acute Lymphoblastic L. (2014) An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*, 28: 1015-1021.
181. Kajtar B, Mehes G, Jakso P, Kereskai L, Ivanyi JL, Losonczy H, Egyed M, Toth P, Toth A, Gasztonyi Z, Domotor M, Pajor L. (2006) [Cytogenetic and molecular monitoring of chronic myeloid leukemia]. *Orv. Hetil.*, 147: 963-970.
182. Pajor L. (1998) [Interphase cytogenetics in oncologic diagnosis]. *Orv Hetil*, 139: 2939-2946.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Kiss R**, Gango A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, de Groot K, Kiraly PA, Krizsan S, Kajtar B, Piko H, Pajor L, Vojcek A, Matolcsy A, Kovacs G, Szuhai K, Savola S, Bodor C, Alpar D. (2019) Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol*, 33: 812-824. IF: 5,988
2. **Kiss R**, Alpar D, Gango A, Nagy N, Eyupoglu E, Aczel D, Matolcsy A, Csomor J, Matrai Z, Bodor C. (2019) Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104: 38-41. IF: 7,116
3. Kotmayer L, **Kiss R**, Király PA, Csomor J, Kállay K, Alpár D, Bödör C. (2018) Familiáris myelodysplasiás szindrómában szenvedő család genomikus kópiaszám-változásainak vizsgálata multiplex ligatiofüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 214-220. IF: -
4. **Kiss R**, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bártai B, Mátrai Z, Bödör C, Alpár D. (2018) Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 31-40. IF: -
5. **Kiss R**, Kosztolanyi S, Gango A, Szuhai K, Bodor C, Alpar D. (2018) Multiplex ligatiofüggő szondaamplifikáció az onkohematológiai kutatásban és diagnosztikában. *Orv Hetil*, 159: 583-592. IF: 0,564
6. Kosztolanyi S, **Kiss R**, Atanesyan L, Gango A, de Groot K, Steenkamer M, Jakso P, Matolcsy A, Kajtar B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bodor C, Alpar D. (2018) High-Throughput Copy Number Profiling by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Multiple Myeloma. *J Mol Diagn*, 20: 777-788. IF: 4,426

10.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Aczél D, Mátrai Z, **Kiss R**, Balogh A, Illés S, Bődör C, Alpár D. (2019) Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában. *Hematológia–Transzfuziológia*, 52: 136-148. IF: -
2. Gango A, Alpar D, Galik B, Marosvari D, **Kiss R**, Fesus V, Aczel D, Eyupoglu E, Nagy N, Nagy A, Krizsan S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Adam E, Tasnady S, Reti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Matrai Z, Bodor C. (2019) Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Int J Cancer*, 146: 85-93. IF: 5,145
3. Csomor J, Györke T, **Kiss R**, Mátrai Z. (2019) Maxillatumor – Richter-szindróma. *Hematológia–Transzfuziológia*, 52: 28-29. IF: -
4. Fésüs V, Eyupoglu E, **Kiss R**, Ádám E, Kozma A, Mátrai Z, Bődör C. (2018) Az IGHV mutációanalízis jelentősége krónikus lymphocytás leukémiában. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 22-29. IF: -
5. Gango A, Mozes R, Boha Z, Kajtar B, Timar B, Kiraly PA, **Kiss R**, Fesus V, Nagy N, Demeter J, Korosmezey G, Borbenyi Z, Marton I, Szoke A, Masszi T, Farkas P, Varkonyi J, Plander M, Posfai E, Egyed M, Pal K, Radvanyi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpar D, Bodor C. (2018) Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*, 65: 42-48. IF: 2,066
6. Kiraly AP, Kallay K, Gango A, Kellner A, Egyed M, Szoke A, **Kiss R**, Valyi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, Bodor C. (2018) Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 24: 83-88. IF: 2,433
7. Uzonyi B, Macsik-Valent B, Lukacs S, **Kiss R**, Torok K, Kremlitzka M, Bajtay Z, Demeter J, Bodor C, Erdei A. (2017) Functional studies of chronic lymphocytic leukemia B cells expressing beta2-integrin type complement receptors CR3 and CR4. *Immunol Lett*, 189: 73-81. IF: 2,436
8. Gaál-Weisinger J, Mucsi O, Körösmezey G, Szili B, Eid H, **Kiss R**, Bődör C, Tárkányi I, Nagy Z, Demeter J. (2017) Újdonságok és tapasztalatok a krónikus

mieloid leukémia tirozinkináz-gátló kezelésében. Magyar Onkológia, 61: 67-74.
IF: -

9. **Kiss R**, Király PA, Gaál-Weisinger J, Marosvári D, Gángó A, Demeter J, Bödör C. (2017) A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. Magyar Onkológia, 61: 57-66. IF: -
10. Andrikovics H, Meggyesi N, Kajtár B, ifj. Nagy B, László Z, Bors A, Antal-Szalmás P, Kövy P, **Kiss R**, Gángó A, Vida L, Lacza Á, Kereskai L, Helen W, Nick CP C, Martin C M, Andreas H, Bödör C. (2017) A mély molekuláris válasz jelentősége a krónikus myeloid leukémiában – Beszámoló a BCR-ABL1-monitorozás haza standardációs előrelépéseiről. Hematológia–Transzfuziológia, 50(Suppl.2): 3-14. IF: -

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném hálámat kifejezni szüleimnek, amiért lehetővé tették tanulmányaimat, szerettek és támogattak mindvégig. Köszönöm páromnak a szüntelen biztatást és a támogató, szerető környezet biztosítását.

Köszönöm Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy intézetében végezhettem PhD tanulmányaimat.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Alpár Donátnak és Dr. Bödör Csabának a közös munkával töltött éveket, a szakmai tanácsokat és hogy munkámat mindvégig segítették.

Köszönettel tartozom az MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Munkacsoport minden tagjának.

Köszönettel tartozom továbbá Laczik Cecéliának, hogy bármikor segítségért fordulhattam hozzá.

Végezetül köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak a közös munkát.

A disszertáció alapját képező tanulmányok elvégzését a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) K16_119950, NVKP_16-1-2016-0004, KH_17-126718 és FK20_134253 számú pályázatait, a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programjának LP95021 számú pályázata és Bolyai János Kutatási Ösztöndíj programja (BO/00320/18/5), valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-17-4-III-SE, ÚNKP-18-3-I-SE-48, ÚNKP-18-4-SE-62, ÚNKP-19-3-I-SE-52, ÚNKP-19-4-SE-77 és ÚNKP-20-5-SE-22 kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programja támogatta, illetve a Semmelweis Egyetem Kiegészítő Kutatási Kiválósági Ösztöndíja az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázat keretében. Az MLPA és digitális MLPA vizsgálatokhoz a szondakeverékeket az MRC-Holland bocsátotta a szerzők rendelkezésére.