

Multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció  
alkalmazásának lehetőségei onkohematológiai  
kórképek DNS kópiaszám eltéréseinek  
vizsgálatában

Doktori tézisek

**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

## 1. BEVEZETÉS

A malignus onkohematológiai kórképek kutatása és diagnosztikája számos alkalommal járt élen a daganatos betegségek háttérben meghúzódó genetikai folyamatok felderítésében. 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. 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, klinikailag is 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 kiegyensúlyozatlan aberrációk, vagyis DNS-kópiaszám eltérések (CNA) jellemzően kópiaszám hiányhoz (deléció), vagy kópiaszám többlet (gain) vezetnek. 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.

A hazai gyakorlatban jelenleg használt metodikák felbontása, reprezentativitása, skálázhatósága és/vagy áteresztőképessége 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. Mindezek alapján onkohematológiai betegek genetikai hátterének diagnosztikai vizsgálatához hatékonyan hozzájárulhatna egy olyan módszer, mellyel nagyszámú lókuszt vizsgálható egyidejűleg nagy felbontásban, rövid átfordulási idővel.

A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA) egy olyan polimeráz láncreakció (PCR) alapú molekuláris genetikai módszer, mely genomális 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 elmúlt években kifejlesztésre került az úgynevezett digitális MLPA (dMLPA) eljárás is, mely az Illumina NGS platform lehetőségeit és az MLPA technikai hátterét 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.

A nemzetközi irodalomban számos közlemény számol be a konvencionális MLPA onkohematológiai kórképekben való alkalmazásáról, bizonyítva a technika alkalmasságát malignus vérképzőrendszeri betegségek genetikai vizsgálatára. Az egyik legkorábbi, 2006-ban megjelent onkohematológiai MLPA közlemény Buijs és mtsai. nevéhez fűződik, akik 54 krónikus limfocitás leukémiában (CLL) szenvedő beteget vizsgálva azonosítottak ismert visszatérő kópiaszám eltéréseket, valamint további, iFISH által nem detektált deléciókat, illetve számbeli kromoszóma eltéréseket. Ezt követően számos egyéb munkacsoport is alkalmazta a módszert CLL vizsgálatához, leginkább a prognosztikai jelentőséggel bíró aberrációk kimutatásának céljából. Az MLPA költséghatékonyágát, magas áteresztőképességét és mérsékelt munkaerő ráfordítási igényét több esetben is megerősítették.

Az myeloma multiplex (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. 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.

Az MLPA-hoz köthető legintenzívebb publikációs aktivitás ALL-ben tapasztalható. Először 2010-ben, Schwab és mtsai. alkalmazták a módszert prekursor B-sejtes ALL-ben szenvedő betegek mintáin. MLPA-val többek között azonosítottak iFISH-sel nem detektálható, kis kiterjedésű deléciókat is, melyeket kvantitatív PCR-rel sikeresen validáltak. Az MLPA hozzáadott értékét az is egyértelműen jelzi, hogy ezt követően több száz, esetenként ezer feletti beteg is felölelő klinikai vizsgálatok keretében alkalmazták sikerrel a technikát. Mivel az MLPA nem szolgáltat egyedi sejt szintű információt az egyes eltérések eloszlásáról, az ALL néhány szubtípusára 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.

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 analíziséhez, valamint a módszer megbízhatóságának elemzése iFISH vizsgálattal összevetve. Továbbá a módszer alkalmazása ibrutinib terápiában 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. MÓDSZEREK**

#### **Vizsgálati minták**

##### *CLL betegminták*

A vizsgálatunkba 18, célzott kezelésben nem részesülő, CLL rutin genetikai vizsgálata során iFISH módszerrel legalább egy genetikai eltérést hordozó beteget vontunk be. 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.

##### *MM betegminták*

Munkánk során 56 MM beteg diagnóziskori csontvelő mintáját vizsgáltuk. Az áramlási citometriával történő immunfenotipizálást követően azon esetekben, ahol 20-30% alatti plazmasejtarányt mértünk, a mintákon plazmasejt dúsítást végeztünk mágneses gyöngyökkel, és a második körben történő immunfenotipizálással ellenőriztük a dúsítás sikerességét.

##### *Gyermekkori ALL betegminták*

Összesen 91 gyermek csontvelő mintáját vizsgáltuk, közülük 76-an B-ALL-ben, 15-en T-ALL-ben szenvedtek. 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%).

#### **Konvencionális MLPA reakciók**

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

A CLL-es betegminták vizsgálata során SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverékeket használtunk, melyeket a gyártó bocsátott rendelkezésünkre.

MM vizsgálatához SALSA P425 v. A1 MLPA szondakeveréket alkalmaztunk, mely 42, MM-ben gyakran érintett genomikus lókuszt célzó szondát tartalmaz.

Gyermekkori ALL vizsgálata során egy vagy több MLPA szondakeveréket alkalmaztunk a következők közül: P202-A1, P202-B2, P335-A4, P335-B2 és P383-A2.

### **dMLPA reakciók**

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

MM 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.

Gyermekkori ALL vizsgálata során D007-es (D007-X2-0516-0a verzió) dMLPA szondakeveréket alkalmaztunk.

### **Kiegészítő vizsgálatok**

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

A *BRAF* gén V600E mutációjának kimutatását és mennyiségi meghatározását *PyroMark Q24* rendszeren a gyártó utasításainak megfelelően végeztük 100 ng DNS felhasználásával. 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 és mutáns *target*-ek kimutatására a gyártó előírásainak megfelelően.

Gyermekkori B-ALL-ben szenvedő betegekben a diagnózis és relapszuskori mintapárokban az *IGH* gén VDJ szegmenseinek célzott amplikon szekvenálását végeztük el. A reakció során az *IGH* gén VDJ régióinak konzervált szakaszaihoz kötődő primerekkel

multiplex polimeráz láncreakciót végeztünk 50-100 ng genomikus DNS-en.

### **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.

### **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 Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően.



## 4. EREDMÉNYEK

### MLPA alkalmazása CLL-ben

A 18 CLL-ben szenvedő, célzott terápiában nem részesülő betegben konvencionális MLPA vizsgálattal összesen 59 aberrációt mutattunk ki. A minták iFISH analízise során sikeresen validáltunk 38, konvencionális MLPA-val azonosított eltérést. A két módszerrel együttesen 63 aberrációt detektáltunk a 18 betegben, átlagosan 3,5 aberrációt megfigyelve betegenként.

Az ibrutinib terápia hatására megjelenő klonális evolúciós változásokat 5 kezelt beteg mintapárjain vizsgáltuk. 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. 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.

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. 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.

## **MM kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val**

dMLPA módszerrel minden betegmintában 371 genomikus lókuszt relatív kópiaszámát vizsgáltuk. 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. Szubkromoszomális CNA-ból 246-ot mutattunk ki, melyek közül az 1q többlet volt a leggyakrabban megfigyelt eltérés. 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 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.

*BRAF* gén 15-ös exonját érintő c.1799T>A (p.V600E) pontmutációt két betegben azonosítottuk dMLPA-val, azonban jelenlétét pirosekvenálással csupán az egyik beteg mintájában sikerült validálnunk. Mivel a mutációt mindkét betegben két egymástól független dMLPA reakció is jelezte, a mutáció analízist ddPCR-rel is elvégeztük a másik betegben, amely magasabb szenzitivitásából adódóan megerősítette a dMLPA vizsgálattal nyert eredményt.

## **Gyermekkori ALL kópiaszám eltéréseinek vizsgálata dMLPA-val**

dMLPA-val mind a 105, gyermekkori ALL-ben szenvedő betegektől gyűjtött mintát (91 diagnosztikus és 14 relapszuskori minta) sikeresen analizáltuk. Egy, a szomatikus kromoszómáin 7 mono- és 2 biállélikus hiányt hordozó beteg mintájából hígítási sorozatot készítettünk, a hígított mintákban a dMLPA 30%-os leukémiás sejtarányig megbízhatóan észlelte a klonális kópiaszám eltéréseket.

Vizsgálatunk során összesen 502 kópiaszám eltérést mutattunk ki 87/91 diagnosztikus mintában (96%). Átlagosan betegenként 5,4 CNA-t észleltünk (B-ALL: 6, T-ALL: 2,6), míg a

szubkromoszómális eltérések átlagos betegenkénti előfordulása 2,8 volt (B-ALL: 2,9; T-ALL: 2,5). A teljes kromoszómát érintő eltérések 95%-át HD kariotípusú betegekben azonosítottuk (3-14 érintett kromoszóma betegenként). 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.

Tizenkét beteg (B-ALL: 8, T-ALL: 4) összesen 26 diagnózis és relapszuskori mintapárját vizsgáltunk. Kromoszómális és szubkromoszómális kópiaszám eltéréseket 11 betegben azonosítottunk, 1 betegnél minden vizsgált mintában normál kópiaszámot észleltünk.

A diagnózis- és relapszuskori minták összehasonlító vizsgálata, és a közöttük fennálló klonális összefüggések feltárása során három különböző mintázatot azonosítottunk: *(i)* egy beteg diagnózis- és relapszuskori mintáiban teljesen azonos kópiaszám eltérések voltak azonosíthatók; *(ii)* hat beteg diagnóziskori mintájában jelenlévő CNA-k közül mindegyik jelen volt a relapszuskor is, ezen felül azonban megjelentek új eltérések is; *(iii)* négy beteg 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. Két betegnél 3 időpillanattól is rendelkezésre álltak minták, így ezen esetekben a betegség második relapszusakor is lehetőség nyílt a CNA-k vizsgálatára. Az egyik betegben a második relapszuskor megjelenő leukémiás sejtpopuláció feltehetőleg egy korábbi közös sejtpopulációból alakult ki, míg a másik betegben az első és második relapszus során látott CNA profilok direkt klonális kapcsolatot valószínűsítettek.

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%).

A dMLPA által meghatározott CNA-k alapján az egyes B-ALL-es betegeket genetikai rizikó csoportokba soroltuk. Az általunk vizsgált betegcsoportban *IKZF1* hiány esetén szignifikánsan rövidebb EFS-t találtunk az *IKZF1<sup>plus</sup>* csoport kritériumainak meglététől függetlenül. 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.

A UKALL rizikóbecslési stratégiához hasonlóan integráltuk a dMLPA adatokon alapuló CNA klasszifikációnkat a citogenetikai rizikó csoportokkal, mely utóbbiakat a UKALL rendszerének megfelelően definiáltuk. 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.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

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.

Gyermekekori 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 gyermekekori 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.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 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: 6,365
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: 7,57
3. Kotmayer L, **Kiss R**, Király PA, Csomor J, Kállay K, Alpár D, Bődör C. (2018) Familiáris myelodysplasiás szindrómában szenvedő család genomikus kópiaszám-változásainak vizsgálata multiplex ligatíofüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 214-220. IF: -
4. **Kiss R**, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bártai B, Mátrai Z, Bődör C, Alpár D. (2018) Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligatíofüggő szondaamplifikációval. *Hematológia–Transzfuziológia*, 51: 31-40. IF: -
5. **Kiss R**, Kosztolanyi S, Gango A, Szuhai K, Bodor C, Alpar D. (2018) Multiplex ligatíofüggő 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

## Egyéb témában megjelent közlemények

1. Aczél D, Mátrai Z, **Kiss R**, Balogh A, Illés S, Bödör 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: 4,982
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, Bödör 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: 2,552

8. Gaál-Weisinger J, Mucsi O, Körösmezey G, Szili B, Eid H, **Kiss R**, Bödör 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 hazai standardációs előrelépéseiről. Hematológia–Transzfuziológia, 50(Suppl.2): 3-14. IF: -



## 7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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 Laczik Cecéliának, hogy bármikor segítségért fordulhattam hozzá.

Köszönöm az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának a közös munkát.