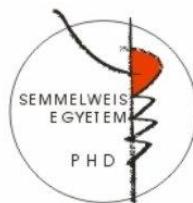


Ibrutinib-indukált klonális evolúció és Richter-transzformáció vizsgálata krónikus limfocitás leukémiában

Doktori tézisek

Dr. Gángó Ambrus Péter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Bödör Csaba, MTA Doktora, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Bodó Imre, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Jóna Ádám, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kiss András, MTA Doktora, egyetemi tanár

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

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

Budapest

2021

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedben a hematológiai malignitások genetikai hátterének pontosabb megismerése, a precízebb diagnosztikai és prognosztikai eszköztár, valamint az innovatív, molekulárisan célzott terápiák egyre bővülő tárháza, a terület robbanásszerű fejlődését jelzik. Noha egyes genetikai eltérések és prognosztikai jelentőségük már évtizedek óta ismert krónikus limfocitás leukémiában (CLL), például bizonyos citogenetikai aberrációk és a Döhner-féle rizikóbesorolás, azonban a jelenleg rendelkezésünkre álló genetikai információ túlnyomó többségét az elmúlt évek új-generációs szekvenálási (NGS) tanulmányainak köszönhetjük. Ezért dolgozatom témaválasztása különösen aktuális, kutatásunk során a CLL terápiáját forradalmasító BTK-inhibitor ibrutinib hatását vizsgáltuk a kórkép szubklonális evolúciójára, továbbá, vizsgáltuk az ibrutinib-, valamint a BCL2-inhibitor venetoclaxkezelés talaján kialakuló, kedvezőtlen prognózisú Richter-transzformáció morfológiai és genetikai sajátosságait is.

A malignusan transzformált B-limfocitákból kialakuló CLL a leggyakoribb felnőttkori leukémiatípus a fejlett országokban. A betegség lefolyását jelentős klinikai heterogenitás jellemzi, a betegek egy számottevő hányada relabáló/refrakter kórlefolyással és kedvezőtlen túléléssel rendelkezik. A heterogén klinikai lefolyás hátterében döntő jelentőséggel bírnak a genetikai tényezők. A CLL-ben gyakori citogenetikai eltérések – 13q14 deléció, 11q22-23 deléció, 12q triszómia, 17p13 deléció és 6q21 deléció – prognosztikai szerepe régóta ismert, a 17p deléciót hordozó betegek bírnak a legkedvezőtlenebb medián túléléssel (32 hónap). A 17p deletált esetek nagy részében megtalálhatók az ép allélt érintő *TP53* mutációk, a *TP53* teljes funkciókieséséhez vezetve. A *TP53* gént érintő deléciót, valamint mutációkat együttesen *TP53* defektusnak nevezzük, és a CLL egyik legerősebb prognosztikus és prediktív faktorát jelenti. Míg intakt *TP53* funkció mellett a hagyományos kemoimmunoterápia által károsított DNS-ű CLL-sejtek apoptózist szenvednek, ledált *TP53* mellett ez nem következik be, és a kemorefrakter klón növekedési előnyre tesz szert a kemoszenzitív klónokkal szemben. A *TP53*

defektusnál is jelentősebb prognosztikai szereppel bír CLL-ben az *IGHV* nehézlánc gének mutációs státusza. Amennyiben az *IGHV* nukleotidsorrendje legalább 98%-os csíravonali homológiát mutat, mutációt nem hordozó (*IGHV-U*) esetről beszélünk, amely a SHM elmaradása miatt polireaktív BCR-rel, túlaktivált jelátviteli útvonallal és CLL sejtproliferációval, valamint kedvezőtlen túléléssel jár.

Az elmúlt évtized teljes genom- és exomszekvenálási tanulmányainak köszönhetően feltárult előttünk a CLL genom, amelynek jellemzője, hogy alacsony mutációs rátájú, a leggyakrabban mutált génekben (*NOTCH1*, *ATM*, *SF3B1*, *TP53*) sem azonosítottak mutációt gyakrabban, mint az esetek 15%-ában. Az említettekén túl, számos egyéb gén (driver) mutációja vezethet CLL kialakulásához, több celluláris jelúthálózatot (gyulladásos útvonal, MAPK-ERK útvonal, BCR-útvonal, WNT-jelút, kromatinmodifikáció, spliceozóma, B-sejt-differenciáció, sejtciklus-szabályozás) érintve. A CLL genom megismerése révén forradalmi változások indulhattak el a célzott terápiák fejlesztésében, a hatékonyságukat előrejelző prediktív biomarkerek azonosításában, valamint a terápiás kudarcot jelentő rezisztenciamutációk előrejelzésében és elkerülésének lehetőségeiben. A B-sejt-receptor jelátviteli útvonalban kulcsszerepet betöltő BTK fehérje gátlószere, az ibrutinib alkalmazása javasolt a TP53 defektussal bíró betegek elsővonalbeli terápiájaként, valamint a relabáló-refrakter CLL-es betegekben TP53 státusztól függetlenül. A kedvező eredmények ellenére a klonális szelekció ibrutinib mellett is folytatódik, a terápia során relabáló betegek gyógyszerrezisztenciájáért a *BTK*, valamint a BCR-jelátviteli útvonalban tőle közvetlenül downstream elhelyezkedő *PLCG2* génben bekövetkezett rezisztenciamutációk felelősek.

Az ibrutinibrezisztens esetekben a BCR jelátviteli útvonalhoz nem kapcsolódó, eltérő mechanizmusú target gyógyszeres blokkolása nyújt kedvező terápiás lehetőséget – az antiapoptotikus BCL2 fehérjét gátló venetoclax ma az ibrutinibrezisztens CLL leggyakoribb terápiája. A kedvező eredmények és toxicitási profil ellenére a venetoclax alkalmazása további kérdéseket vet fel, ugyanis az ibrutinibhez hasonlóan a gyógyszer szelekciós nyomására szintén rezisztenciamechanizmusok lépnek fel, amelyek újabb kihívások elé

állítják mind a gyógyszerfejlesztést, mind pedig a klinikusokat. A rezisztencia és a progresszió hátterében főképp a BCL2 rezisztenciamutációi állnak, a rezisztenciamutációk precíz és korai előrejelzése kulcsfontosságú a terápiamódosítás szempontjából.

A dolgozatunk másik témáját jelentő Richter-szindróma (RS) tágabb értelemben minden low-grade limfóma high-grade, nagysejtes transzformációját jelenti, dolgozatunkban az elnevezést specifikusan a CLL/SLL-t követő, vagy azzal szinkron fellépő RS-ra használjuk. Noha a CLL progressziója során csupán az esetek kis hányadában következik be transzformáció, a kórkép diagnosztikája és kezelése is nagy kihívásokkal jár. Az innovatív, célzott terápiák mellett kialakuló RT eltérő morfológiai, genetikai és terápiás jellemzőkkel bírhat, ezért is különösen indokolt dolgozatunk témaválasztása. Morfológiailag a RS két fő típusa különíthető el, a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) teszi ki az esetek 80-90%-át, míg a fennmaradó esetek hátterében klasszikus Hodgkin-limfóma figyelhető meg, egyéb, ritka entitások mellett. A transzformáció hátterében álló genetikai mechanizmusok között az egyik legjelentősebb a TP53 defektus, amely az RS esetek 60%-ában fordul elő, és agresszív klinikai lefolyáshoz, valamint kemorefrakteritáshoz vezet. A *MYC* és *CDKN2A* géneket érintő abnormalitások deregulációhoz vezetnek és szintén a transzformáció idején jelennek meg a tumorsejtben. Noha a kemoimmunoterápia mellett kialakuló RS genetikai hátteréről számos ismerettel rendelkezünk, az ibrutinib- és venetoclaxterápia talaján kialakuló transzformáció kevésbé karakterizált ilyen szempontból. Munkánk során ezen beteganyag genetikai vizsgálatát végeztük el számos metodika alkalmazásával.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Az ibrutinib hatására végbemenő szubklonális evolúció vizsgálata saját tervezésű génpanellel CLL-es betegekben.
- Az ibrutinibrezisztencia hátterében álló molekuláris mechanizmusok feltárása.
- Az ibrutinibrezisztencia kialakulását előre jelző, érzékeny vizsgálati módszer beállítása.
- Az ibrutinib- vagy venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának morfológiai és genetikai vizsgálata, a két entitás közötti klonális kapcsoltság feltárása.
- Az ibrutinib- vagy venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának morfológiai és genetikai vizsgálata, a két entitás közötti klonális kapcsoltság feltárása.
- Térbeli heterogenitás szerepének vizsgálata ibrutinibkezelt CLL rezisztenciájában és progressziójában.

3. MÓDSZEREK

Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata

Betegminták

Az ibrutinib hatására végbemenő klonális evolúció vizsgálatához 20 beteg (8 nő és 12 férfi) ibrutinibkezelés előtti és alatti mintáit használtuk fel, a betegek medián életkora 63 év volt (intervallum: 50-85 év). Az ibrutinibkezelést megelőzően a betegek medián 2 (intervallum: 1-5) kezelési vonalban részesültek. A kezelést megelőző, valamint ibrutinibkezelés tartama alatt gyűjtött perifériás vérmintákból mononukleáris sejtfrakciót szeparáltunk, majd a szeparált frakcióból DNS-t izoláltunk. Az *IGHV* gén mutációs státuszát a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) ajánlásai alapján határoztuk meg Sanger-szekvenálással, míg a CLL-ben gyakran előforduló citogenetikai aberrációk (13q, 11q és 17p deléció, valamint 12-es triszómia) vizsgálatát interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációval (iFISH) végeztük. Negatív kontrollként öt egészséges önkéntes perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből izolált DNS-t használtunk.

Új generációs szekvenálás

A CLL esetek legalább 2%-ában mutációt hordozó harminc gén releváns régióinak ultramély, célzott újraszekvenálását egyedi tervezésű génpanel segítségével végeztük, TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit (Illumina, San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok) könyvtárkészítő reagenssel. A 150 bp paired-end szekvenálást ekvimoláris poolozást követően HiSeq 4000, valamint MiSeq (Illumina) készülékekkel végeztük. A nyert variáns allélfrekvencia (VAF) adatokat az áramlási citometria során nyert CLL sejtarányra normalizáltuk. Az NGS analízis idején a betegek 22,5 hónap medián követési idővel (intervallum: 3-34 hónap) rendelkeztek.

Bioinformatikai analízis

A szekvenálás során nyert readeket a BaseSpace Sequence Hub (Illumina) BWA v0.7.13 szoftverével illesztettük a referenciagenomhoz (*Homo sapiens* GRCh37).

A BAM kimeneti fájlok válogatását és indexálását a SAMtools v1.7 és a GATK v4.0 programokkal végeztünk, a szisztematikus szekvenálási hibák felismerése és javítása céljából pedig a GATK Base Quality Score Recalibration-t alkalmaztuk. Az egyponos nukleotid variánsok („single nucleotide variant”, SNV), valamint inzerciók és deléciók (együttvéve: indelek) detektálása (ún. variánsshivás) a LoFreq v2.1 programmal történt. A variánsok funkcionális jelentőségének meghatározása az SnpEff v4.3i, valamint az ANNOVAR v2017Jul17 programokkal történt, az utóbbi szoftver naprakész információkat szolgáltatott az azonosított mutációk klinikai jelentőségéről a COSMIC, avSNP és CLINVAR adatbázisokban történő keresés révén. A *TP53* gén kódoló és splice site mutációinak annotálását a TP53-specifikus Seshat és IARC adatbázisokkal végeztük. A nyers szekvenálási adatok megtalálhatók a European Nucleotide Archive adatbázisában (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB32120, Secondary Accession: ERP114759).

Az azonosított szomatikus mutációk validálása

A 20%-ot elérő, vagy meghaladó variáns allélfrekvenciával (VAF) azonosított mutációk mindegyikét sikeresen validáltuk egyedileg tervezett, jelölt oligonukleotidokkal végzett kétirányú Sanger szekvenálással. A szekvenanciaanalízist ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a kapott szekvenciák kiértékelését Sequencing Analysis SeqA6 (Thermo Fisher Scientific) programmal végeztük. A *BTK* C481S és *PLCG2* D993H mutációkat droplet digitális PCR-rel (ddPCR) validáltuk, lókuszszerkezetű mutáns és vad típusú targetekre tervezett fluoreszcens próbákkal (*BTK* C481S – dHsaMDS802598840, *PLCG2* D993H - dHsaMDS815970714), QX200 ddPCR System (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) segítségével. Az értékelés Bio-Rad QuantaSoft szoftverrel történt, a *BTK* és *PLCG2* mutációk VAF-ja a mutáns DNS-molekulát hordozó droplet (a), illetve a mutáns (a) plusz vad típusú (b) DNS-molekulát hordozó droplet hányadosaként számítható ki $[VAF=a/(a+b)]$, a módszer átlagos szenzitivitása 0,01%.

Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata

Betegminták

Ibrutinib- vagy venetoclaxkezelés alatt Richter-transzformáción átesett hat CLL/SLL-es beteg szekvenciális mintáit vizsgáltuk, egy kivétellel (B4) az összes betegből rendelkezünk CLL és RS mintákkal is. A betegpopuláció egy nőből és öt férfiből állt, a medián életkor a CLL diagnózisa idején 58 évnek bizonyult (intervallum: 38-75 év), a medián követési idő 109,5 hónap volt (intervallum: 53-355 hónap). A RT minden esetben célzott terápia során alakult ki, négy betegnél ibrutinib alatt, egy-egy betegnél pedig venetoclax monoterápia, illetve ibrutinib + venetoclax kombinációs terápia alatt. Az ibrutinibterápia bevezetésétől a RT-ig medián 20 hónap telt el (intervallum: 2-24 hónap), venetoclax esetén ez az időtartam 8,5 hónapnak (intervallum: 5-12 hónap) adódott. A transzformációt követő medián túlélés 1,5 hónapnak bizonyult (intervallum: 0-29 hónap).

Módszerek

A célzott terápiák alkalmazása során bekövetkező Richter-transzformáció morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatát formalin-fixált, paraffinba ágyazott („formalin-fixed, paraffin-embedded”, FFPE) szövetmintákon végeztük. A CLL-minták vizsgálatához a perifériás vérből vagy csontvelő-aspirátumból CD19+ limfocitákat szeparáltunk EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) segítségével. A DNS-izolálás a szeparált CD19+ sejtekből AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen), míg az Richter-transzformált FFPE mintákból QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) segítségével történt. A DNS-koncentráció fluorimetriás meghatározását követően *IGHV-IGHD-IGHJ* szekvenálást és a *TP53* gén új generációs szekvenálását végeztük el. Továbbá, a CLL-ben releváns visszatérő citogenetikai aberrációk és egyes pontmutációk vizsgálatát multiplex ligáció-dependens szondaamplifikációval

(“multiplex ligation-dependent probe amplification”, MLPA) végeztük, míg az ibrutinib- és venetoclax-rezisztenciát okozó mutációkat ddPCR eljárással azonosítottuk. Az *IGHV-IGHD-IGHJ* átrendeződést a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) ajánlásai alapján határoztuk meg, az immunoinformatikai analízist az IMGT V-QUEST és az ARResT/AssignSubsets szoftverekkel végeztük. A *TP53* gén teljes kódoló és splice site régiójának szekvenálásához a SureMASTR TP53 kittel (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) preparáltunk könyvtárakat, majd MiSeq (Illumina) készüléken szekvenáltunk 10000x átlagos lefedettséggel. A *TP53* variánsok patogenitását a TP53-specifikus Seshat adatbázis alapján (<https://p53.fr/tp53-database/seshat>) határoztuk meg.

Az MLPA eljárás során a SALSA P037 és P038 CLL-specifikus szondakeverékek (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) segítségével vizsgáltuk a CLL-ben leggyakrabban előforduló citogenetikai eltéréseket és klinikailag releváns pontmutációkat. A ligációt és amplifikációt követően fragmensanalízist végeztünk ABI3500 Genetic Analyzer szekvenátorral (Thermo Fisher Scientific). Az eredmények kiértékelése a Coffalyser.Net (MRC-Holland) szoftverrel történt. A rezisztenciamutációk azonosítását ddPCR módszerrel végeztük, a *BTK* C481S, valamint a *BCL2* G101V és D103Y mutációkra specifikus, illetve vad típusú próbák alkalmazásával. A próbák azonosítói: *BTK* C481S mutáns + vad típus – dHsaMDS802598840, *BCL2* G101V vad típus – dHsaADS52164188, *BCL2* G101V mutáns típus – dHsaADS26433961, *BCL2* D103Y vad típus – dHsaADS13624642, *BCL2* D103Y mutáns típus – dHsaADS77894415.

Etikai vonatkozások

Kutatásainkat a résztvevő betegek írásos, tájékozott beleegyezését követően, a Helsinki Nyilatkozattal összhangban, a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság etikai engedélyei (45371-2/2016/EKU és 14383-2/2017/EKU) birtokában végeztük.

4. EREDMÉNYEK

Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata

Az ultramély NGS során a húsz beteg párosított mintáiban összesen 211 szomatikus variánst azonosítottunk, átlagosan 7500x lefedettséggel, amelyek betegenként eltérő, egyedi mutációs mintázatot mutattak. A leggyakrabban mutációt hordozó gének a *TP53* (65%), az *ATM* (70%), valamint a *NOTCH1* (70%) voltak. Az azonosított variánsok többsége szubklonálisnak bizonyult, 10% alatti variáns allélfrekvenciával. Jelentős szubklonális heterogenitás volt megfigyelhető a vizsgált betegcsoportban, betegenként átlagosan öt mutációt (intervallum: 0-19) azonosítottunk, amelyek átlagosan négy gént (intervallum: 0-18) érintettek. Konvergens mutációevolúció („convergent mutation evolution”, CME), azaz egy génben többszörös mutáció jelenléte volt megfigyelhető a betegek felében és a vizsgált gének 40%-ában, génenként 2-4 mutációval. Ibrutinibrezisztenciáért bizonyítottan felelős *BTK* vagy *PLCG2* mutációkat az esetek 40%-ában (8/20), illetve 5%-ában (1/20) azonosítottunk, továbbá, kizárólag a kezelés során vett mintákban mutattunk ki rezisztenciamutációt. *BTK* és *PLCG2* mutáció együttes előfordulását két betegben figyeltük meg. A kanonikus *BTK* C481S és *PLCG2* D993H mutációs forrópontokon kívül négy, korábban le nem írt *BTK* mutációt (az érintett aminosavak: R28, G164, R490, Q516) és három *PLCG2* mutációt (az érintett aminosavak: F82, R694, S1192) azonosítottunk összesen négy betegben.

A nagy számban jelenlévő *TP53* mutációk eltérő klonális dinamikával fordultak elő a vizsgált betegcsoportban. Továbbá, a *TP53* és *BTK* mutációk alternáló dinamikája a mindkét eltérést hordozó esetek túlnyomó többségében előfordult, azaz miközben az ibrutinib evolúciós nyomására kialakult a rezisztenciáért felelős *BTK* mutáció, a kezelés előtt jelenlévő *TP53* mutáció eliminálódott, illetve VAF-ja lecsökkent. A kanonikus *BTK* mutációt nem hordozó esetekben vizsgálva a *TP53* mutációk klonális dinamikáját, az idetartozó összes beteg (8/20) *TP53* mutációja perzisztált, vagy expandált az ibrutinibkezelés során.

A *BTK*, valamint *PLCG2* rezisztenciamutációkat hordozó betegek sorozatmintáit retrospektíven vizsgálva a 0,01% érzékenységgű ddPCR-rel, a rezisztenciamutációk átlagosan 10,5 hónappal (intervallum: 7-15 hónap) a klinikai relapszust megelőzően jelentek meg, alacsony, de kimutatható VAF-fal. A *BTK* mutációk korai megjelenése tehát progresszív kórlefoiyást vetít előre, és a korai detektálás alkalmat biztosít az időben történő terápiamódosításra.

Az NGS-tanulmány során vizsgált B10-es beteg részletes kórlefoiyását és a célzott terápiák hatására kialakuló térbeli heterogenitást és klonális evolúciót munkacsoportunk külön közleményben ismertette. A relabáló/refrakter kórlefoiyású, majd Richter-transzformált CLL-es betegnek az ibrutinibkezelés 21. hónapjában, a relapszus idején vett perifériás vérmintájából Sanger-szekvenálással *BTK* C481S mutáció igazolódott, miközben a nyirokcsomó-mintában a *PLCG2* D993H rezisztenciamutációt azonosítottuk, *BTK* negativitás mellett. Az azonosított térbeli heterogenitás pontosabb vizsgálatát elvégeztük NGS-sel, amely a Sanger szekvenálással kapott eredményeket megerősítette, illetve minor klónként, 5,8%-os VAF-fal a nyirokcsomó-mintában is igazolt *BTK* C481S mutációt, és 0,2%-os VAF-fal a perifériás vérben *PLCG2* D993H mutációt. A betegtől a relapszus idején vett cfDNA mintában ddPCR módszerrel vizsgáltuk a perifériás vérben, valamint a nyirokcsomóban azonosított ibrutinibrezisztencia-mutációk jelenlétét, és 1%-os VAF-fal azonosítottuk mindkét anatómiai lokalizációban.

A *BTK* és *PLCG2* mutációk időbeli dinamikájának vizsgálata céljából a B10-es beteg összesen tíz, a kezelés különböző időpontjaiban vett perifériás vérmintáit vizsgáltuk ddPCR-rel. Míg az ibrutinibkezelést megelőzően nem detektáltunk rezisztenciamutációt, a klinikai progresszió előtt 15 hónappal, a kezelés 6. hónapjában már kimutattuk a *BTK* mutációt 0,03%-os, a *PLCG2* mutációt 0,003%-os VAF-fal. Az ibrutinibkezelés folyamán a mutáns klónok mérete folyamatosan növekedett. A relapszust követő venetoclaxterápiára a *BTK* és *PLCG2* mutáns klón eltérően reagált – míg az előbbi mérete jelentősen csökkent, az utóbbi expandált, és a nyirokcsomóban látott

jelenséghez hasonlóan, a vérben is a *PLCG2* mutáns klón vált a rezisztencia meghatározójává, és vezetett további progresszióhoz.

Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata

Az RS diagnózisának felállításához kötelező az érintett lokalizációból származó minta szövettani vizsgálata, ennek megfelelően tanulmányunkban az összes diagnózist két független, tapasztalt hematopatológus állította fel. Az esetek fele (3/6, B2, B3 és B4) DLBCL fenotípusúnak bizonyult, neoplasztikus, nagy B-limfociták diffúz proliferációjával és jelentősen emelkedett Ki67 proliferációs aktivitással (az eseteket a DLBCL fenotípus gyakorisága miatt nem részletezzük). A DLBCL esetek mellett, három ritka morfológiájú limfómát is azonosítottunk, a B1-es betegben „null fenotípusú” high-grade limfómaként, a B5-ös betegben klasszikus Hodgkin-limfóma/non-GC DLBCL átmeneti entitásként, a B6-os betegben plazmablasztos limfómaként prezentálódott a Richter-szindróma.

A CLL és RS mintapárok közötti klonális kapcsoltság (azonos átrendeződést mutató *IGHV-D-J* gének), az *IGHV* mutációs státusz, valamint a sztereotip BCR jelenléte kiemelkedő prognosztikus jelentőséggel bír RS-ben, ezért betegcsoportunkban elvégeztük ezek vizsgálatát, valamint összevetettük a klinikai adatokkal. Az *IGHV-D-J* génátrendeződés vizsgálata 4/6 mintapár mindkét tagjában sikeres eredménnyel zárult, két betegnél csak az egyik fázisú minta adott értékelhető eredményt (B4 betegből csak RS mintával rendelkezünk, míg a B6 betegből csupán a CLL minta analízise bizonyult sikeresnek). A sikeres eredményt adó mintapárok mindegyike klonálisan kapcsoltnak bizonyult, azonos átrendeződést mutató génekkel, valamint azonos *IGHV* mutációs státusszal, kivéve a B1 beteg klonálisan nem kapcsolt RS mintáját. Két beteg hordozott sztereotip BCR-t (B5 beteg – subset #6, B6 beteg – subset #1). A sikeresen vizsgált minták egy kivétellel *IGHV-U* státuszúnak bizonyultak.

A *TP53* gént érintő aberrációk az összes betegben előfordultak, noha az egyes esetek különböztek egymástól az eltérés típusában (17p deléció és/vagy *TP53* mutáció), valamint abban, hogy a defektus CLL, vagy RS fázisban volt-e jelen. A második és harmadik leggyakoribb kromoszóma-aberrációknak a 13q deléció (3/6 beteg), valamint a 12-es triszómia (2/6 beteg) bizonyult. A citogenetikai eltérések a B2 beteg biallélikus 2p és 13q nyérése kivételével monoallélikusak voltak. A legtöbb aberrációt a B2 beteg hordozta (hat eltérést a CLL, míg tízet az RS fázisban), a kimutatott komplex kariótípus és genomikai instabilitás hozzájárult a beteg rendkívül agresszív nagysejtes transzformációjához, amely akut leukémiához hasonló klinikai képpel és kórlefolyással járt. A transzformációra hajlamosító 9p21.3 deléciót (*CDKN2A/B* vesztés) is egyedül a B2 beteg hordozta, az eltérést mindkét mintájában azonosítottuk.

A rezisztenciamutációk elsősorban a CLL progressziójában, és nem a transzformáció során bírnak patogenetikai szereppel. A *BTK* C481S mutáció jelenlétét az ibrutinibkezelt betegek mintapárjaiban, míg a *BCL2* G101V és D103Y rezisztenciamutációk jelenlétét a venetoclaxkezelt betegek körében vizsgáltuk. Rezisztenciamutációkat egy betegnél sem azonosítottunk a célzott terápia bevezetése előtt. A B4 beteg *BTK* C481S mutációját 22 hónappal az ibrutinibkezelés bevezetését követően mutattuk ki, 0,21%-os VAF-fal. A B2 beteg negyven hónappal az ibrutinibterápia bevezetését követően progrediált, ekkor 11,9%-os VAF-fal detektáltuk *BTK* C481S mutációját. A progressziót követően 12 hónappal transzformált, ezt megelőzően rituximab-ibrutinib-venetoclax hármas kombinációs kezelésben részesült. A transzformáció idején a *BTK* C481S VAF-ja 0,95%-ra csökkent, míg a venetoclaxterápia által indukált *BCL2* G101V rezisztenciamutációt 4,6%-os VAF-fal azonosítottuk.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

- Az ibrutinibkezelt CLL klonális evolúciójának vizsgálata során a mutációk betegenként eltérő klonális dinamikáját azonosítottuk, a detektált variánsok háromnegyede szubklonálisnak bizonyult.
- A leggyakrabban mutációt hordozó gének a *NOTCH1*, az *ATM* és a *TP53* voltak.
- Ibrutinibkezelés hatására feldúsultak a *BIRC3* és *SF3B1* gének mutációi, míg a *BTK* és *PLCG2* gének rezisztenciamutációi kizárólag a poszt-ibrutinib mintákban jelentek meg, és a CLL progressziójával jártak együtt.
- A *BTK* és *TP53* mutációk alternáló klonális dinamikával jellemezhetők, ibrutinibkezelés hatására a rezisztenciamutációk megjelenésével párhuzamosan eliminálódnak a *TP53* mutációi.
- A rezisztenciamutációk térbeli heterogenitást mutathatnak, és akár egy évvel a klinikai relapszust megelőzően már kimutathatók szenzitív módszerekkel, így többféle lokalizációban történő, rendszeres vizsgálatuk kritikus fontosságú a későbbi terápiaváltásra való felkészülés szempontjából.
- Az ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegekben kialakuló Richter-szindróma többségében klonálisan kapcsolt az *IGHV-D-J* átrendeződés alapján.
- A célzott terápiák talaján kialakuló Richter-szindróma esetek mindegyike hordozott egy vagy több, transzformációra hajlamosító genetikai eltérést.

- A rezisztenciamutációk szerepe kevésbé jelentős a Richter-transzformációban, mint a CLL progressziójában.
- Venetoclaxkezelt CLL talaján kialakuló Richter-szindrómában azonosítottuk tudomásunk szerint elsőként a klasszikus *BCL2* G101V rezisztenciamutációt.
- A célzott terápiák mellett kialakuló Richter-szindróma morfológiailag sokszínű, plazmablasztos limfómát, „null fenotípusú” high-grade limfómát és DLBCL/cHL kevert fenotípusú limfómát is azonosítottunk.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. 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: e38-e41.

IF 9.941

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. (2020) Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Int J Cancer*, 146: 85-93.

IF 7.396

3. Gángó A, Kiss R, Farkas P, Hanna E, Demeter J, Deák B, Lévai D, Kotmayer L, Alpár D, Matolcsy A, Bödör C, Mátrai Z, Timár B. (2021) Morphologic and molecular analysis of Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib or venetoclax. *Pathology*, <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.04.008>.

IF 5.306

Egyéb témában megjelent közlemények

1. Bödör C, Gángó A, Schneider T. (2017) Diffúz nagy B-sejtes lymphoma: úton a személyre szabott terápia felé. *Klinikai Onkológia*, 4: 33-41.

2. Kiss R, Király PA, Gaál-Weisinger J, Marosvári D, Gángó AP, Demeter J, Bödör C. (2017) A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. *Magy Onkol*, 61: 57-66.

3. Mózes R, Gángó A, Boha Z, Csomor J, Bödör C. (2017) A driver és szubklonális mutációk szerepe a primer mielofibrózis patogenezisében. *Magy Onkol*, 61: 36-45.
4. Bártai B, Lévai D, Gaál-Weisinger J, Balogh A, Gángó A, Bödör C, Nagy N. (2018) A személyre szabott terápia új lehetősége follicularis lymphomában – Az EZH2 hiszton metil-transzferáz gátlása. *Hematológia-Transzfuziológia*, 51: 61-70.
5. Gángó A*, Bártai B*, Varga M, Kapczár D, Papp G, Marschalkó M, Kuroli E, Schneider T, Csomor J, Matolcsy A, Bödör C, Szepesi Á. (2018) Concomitant 1p36 deletion and TNFRSF14 mutations in primary cutaneous follicle center lymphoma frequently expressing high levels of EZH2 protein. *Virchows Arch*, 473: 453-462. **IF 4.064**
6. Gángó A, Mózes R, Boha Z, Kajtár B, Timár B, Király PA, Kiss R, Fésüs V, Nagy N, Demeter J, Körösmezey G, Borbényi Z, Marton I, Szőke A, Masszi T, Farkas P, Várkonyi J, Plander M, Pósfai É, Egyed M, Pál K, Radványi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpár D, Bödör C. (2018) Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*, 65: 42-48. **IF 3.156**
7. Király AP, Kállay K, Gángó A, Kellner Á, Egyed M, Szőke A, Kiss R, Vályi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, Bödör C. (2018) Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 24: 83-88. **IF 3.201**
8. Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, Szuhai K, Bödör C, Alpár D. (2018) [Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research]. *Orv Hetil*, 159: 583-592. **IF 0.540**
9. 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.

10. Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, de Groot K, Steenkamer M, Jáksó P, Matolcsy A, Kajtár B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. (2018) High-Throughput Copy Number Profiling by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Multiple Myeloma. *J Mol Diagn*, 20: 777-788. **IF 5.553**

11. Gángó A, Alpár D, Bödör C. (2019) Új módszerek az onkohematológiai betegségek molekuláris diagnosztikájában. *Magyar Tudomány*, 180: 645-655.

12. Krizsán S, Dénes Z, Gángó A, Gerecs B, Demeter J, Nagy Z, Tárkányi I, Masszi T, Farkas P, Masszi A, Szombath G, Benedek S, Várkonyi J, Horváth L, Nagy Z, Radványi G, Takács I, Hamed A, Lázár Z, Süveges E, Kárpáti Á, Plander M, Szendrei T, Pál K, Gurzó M, Jakucs J, Egyed M, Bödör C. (2019) Visszatérő genetikai eltérések vizsgálata akut myeloid leukémiában az új célzott terápiák tükrében. *Hematológia-Transzfuziológia*, 52: 96-105.

13. Mózes R, Gángó A, Sulák A, Vida L, Reiniger L, Timár B, Krenács T, Alizadeh H, Masszi T, Gaál-Weisinger J, Demeter J, Csomor J, Matolcsy A, Kajtár B, Bödör C. (2019) Calreticulin mutation specific CAL2 immunohistochemistry accurately identifies rare calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Pathology*, 51: 301-307. **IF 5.306**

14. Nagy B, Gángó A, Rejtő L, Krizsán S, Ujfalusi A, Antal-Szalmás P. (2019) CEBPA-mutációk vizsgálata és prognosztikai jelentőségük akut myeloid leukémiában. *Hematológia-Transzfuziológia*, 52: 11-17.

15. Bártai B, Krizsán S, Gángó A, Hegyi L, Csóka M, Erdélyi DJ, Csomor J, Kállay K, Bödör C. (2020) Juvenile myelomonocytic leukaemia presentation after preceding juvenile xanthogranuloma

harbouring an identical somatic PTPN11 mutation. *Pediatr Blood Cancer*, 67: e28368. **IF 3.167**

16. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, de Groot K, Király PA, Krizsán S, Kajtár B, Pikó H, Pajor L, Vojcek Á, Matolcsy A, Kovács G, Szuhai K, Savola S, Bődör C, Alpár D. (2020) 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**

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm feleségem és lányaim odaadó támogatását, és köszönöm egész családomnak, hogy tanulmányaim során végig mellettem álltak.

Köszönöm Matolcsy András Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett Intézetben végezhettem kutatómunkámat.

Köszönöm Bödör Csabának, hogy a munkacsoportjába TDK-hallgatóként befogadott, és legyen bármilyen kérdésem, töretlen szakmai és emberi odaadással fordult felém.

Köszönöm Király Péter Attilának, hogy bevezetett a laboratóriumi módszerek világába, és nagy lelkesedéssel végeztük kutatásainkat.

Köszönöm Alpár Donátnak, hogy az új generációs szekvenálási technikák kapcsán bármikor fordultam hozzá, mindig készségesen segített.

Köszönöm a közös kutatómunka szépségét Mózes Rékának, Marosvári Dórának, Kiss Richárdnak, Nagy Noéminek, Nagy Ákosnak, Krizsán Szilviának, Aczél Dórának, Bedics Gábornak, Fésüs Viktóriának, Bártai Bencének, Kotmayer Lilinek, valamint a sok segítséget Bárányné Pallag Adrienne-nek, Hegyi Lajosnak, Zajta Eriknek, Gulácsi Edinának, Gróf Stefániának, Kremper Zsanettnek, Juhász-Nagy Laurának, Kovács Andreának és Lévy Lucának.

Köszönöm Csomor Juditnak, Timár Botondnak, Szepesi Ágotának, Rajnai Hajnalkának és Csernus Balázsnak a segítségüket és a közös munkát.

Köszönöm Krenács Tibor kutatóprofesszornak, hogy alapos bírálatával a dolgozat színvonalát jelentősen emelte, valamint köszönöm Laczik Cecéliának a sok segítséget, amelyet PhD tanulmányaim során, valamint a disszertáció benyújtásakor tőle kaptam.