

SZAKDOLGOZAT

Klein Adrienn - Szakdolgozat

Klein Adrienn

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék



Az IGHV szomatikus hipermutációs státuszának meghatározása újgenerációs
szekvenálással krónikus limfocitás leukémiában

Klein Adrienn

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Hallgató: Klein Adrienn

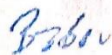
**A szakdolgozat címe: Az IGHV szomatikus hipermutációs státuszának meghatározása
újgenerációs szekvenálással krónikus limfocitás leukémiában**

Konzulens: Dr. Bődör Csaba egyetemi tanár
Dr. László Tamás PhD hallgató
Dr. Kovács Mónika egyetemi docens

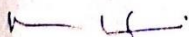
Beadás dátuma:



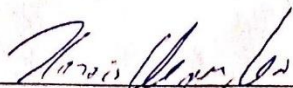
külső konzulens
Dr. László Tamás



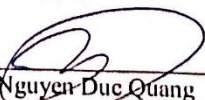
külső konzulens
Dr. Bődör Csaba



Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia
és -biztonság Tanszék vezetője
Mohácsiné Dr. Farkas Csilla



belső konzulens
Dr. Kovács Mónika



Dr. Nguyen Duc Quang
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék vezetője

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Munka célja.....	2
3. Irodalmi áttekintés.....	3
3.1 B-sejtek érése	3
3.2 A krónikus limfocitás leukémia.....	4
3.3 A CLL kezelése	5
3.4 A BCR jelátviteli útvonal szerepe a CLL patogenezisében	6
3.5 A CLL molekuláris profilja	8
3.6 CLL specifikus kromoszóma-rendellenességek.....	9
3.7 Az IGHV státusz CLL-ben.....	10
3.8 Szekvenálás	13
3.8.1 Sanger szekvenálás	13
3.8.2 Újgenerációs szekvenálás (NGS).....	14
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1 Betegek.....	16
4.2 Mintaelőkészítés	16
4.2.1 Lymphoprep	16
4.2.2 DNS izolálás, koncentráció és tisztaság mérése.....	17
4.3 IGHV-státusz meghatározása	18
4.3.1 Sanger szekvenálás	18
4.3.2 NGS-alapú IGHV-szekvenálás	22
4.4 Bioinformatikai analízis	22
4.5 Statisztika	25
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	26
5.1 Normalitási eloszlás vizsgálata.....	26
5.2 NGS vizsgálat során nyert IGHV adatok.....	26
5.2.1 IGHV státusz meghatározás.....	26
5.2.2 Subsetek eloszlásának meghatározása	29
5.2.3 NGS futások sikerességének meghatározása	30
5.2.4 A nem meghatározható SHM státusz okai	31
5.2.5 Primerek összehasonlítása	32
5.2.6 A klónok számának meghatározása	33
5.3 A két módszer összehasonlítása.....	34
6. Összefoglalás.....	36
7. Irodalmi hivatkozások	37
Köszönetnyilvánítás	41

1. Bevezetés

A krónikus limfocitás leukémia (CLL) a felnőttek körében előforduló leggyakoribb hematológiai malignitás a nyugati országokban. Kifejlődését tekintve lassan fejlődik, akár évekig tünetmentes lehet a beteg. Gyakrabban az idősebb korosztályt érinti, ezen belül is inkább a férfiakra jellemző, a diagnosztizált betegek medián életkora 70 év.

A CLL-t heterogén klinikai lefolyás jellemez, mely összefüggésbe hozható az immunglobulin nehézlánc variábilis (IGHV) régiójának szomatikus hipermutációs státuszával. Míg a mutált IGHV státuszt kedvezőbb, addig a mutálatlan IGHV státuszt kedvezőtlenebb, agresszívabb betegségfolyás jellemez. Az IGHV státusz meghatározása során a csírvonalbeli immunoglobulin-nehézláncgénhez hasonlítják az adott szekvenciát, és a hasonlóság %-os értéke alapján sorolható mutált, mutálatlan és borderline csoportba a státusz.

Az IGHV státusz meghatározására jelenleg széles körben a konvencionális multiplex-PCR alapú Sanger szekvenálást alkalmazzák. Bár az eljárás költséghatékony és hozzáférhető, bizonyos esetekben (több, ugyan azon V-gént érintő átrendeződés, több klón szimultán előfordulása) nem kivitelezhető, továbbá igen magas laborigénnyel („hands on time”) rendelkezik. Az újgenerációs-szekvenálás alapú analízis egyben képez klonalitási valamint IGHV vizsgálatot, azaz képes detektálni a különböző klónokat, és meghatározni ezek szomatikus hipermutációs státuszát. Mindezek által az NGS alapú IGHV analízis egy új, potenciálisan jobban működő alternatívát jelenthet a konvencionális technológiákkal szemben.

2. Munka célja

Célunk egy új, innovatív újgenerációs-szekvenáláson alapuló IGHV mutációs analízis beállítása, továbbá a világszerte és hazánkban is elterjedt konvencionális, multiplex-PCR alapú Sanger szekvenálással történő összevetése. Ezen felül munkánk során szeretnénk volna feltérképezni egy magyarországi, ún. „real-world” betegkohorton belül az IGHV mutációs státusz eloszlását. Mindemellett célul tűztük ki a komplex klonális átrendeződésekkel rendelkező esetek előfordulási gyakoriságának feltérképezését. Tanulmányunk eredményeképp hazánkban is elérhetővé válhat az IGHV szomatikus hipermutációs státuszának újgenerációs-szekvenálás alapú vizsgálata a krónikus limfocitás leukémiában szenvedő betegek részére.

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végeztük.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 B-sejtek érése

Az emlősök B-sejtfejlődése olyan szakaszok folytonosságát foglalja magában, amelyek az primer nyirokszövetekben kezdődnek, majd a szekunder nyirokszövetekben, a funkcionális érés bekövetkeztével fejeződnek be (LeBien és Tedder, 2008). A B-sejtek fejlődését és működését elsősorban a B-sejt antigénreceptorukon (BCR) keresztül történő jelátvitel befolyásolja (Packard és Cambier, 2013). A B-sejtek az adaptív immunrendszer központi elemei, melyek érésük során szolúbilis immunglobulint (BCR-t) szekretáló plazmasejteké alakulnak. A sejt mindaddig marad a csontvelőben érése során, amíg naiv B-sejtté nem válik, amely képes kijutni a perifériába, ahonnan a másodlagos nyirokszövetekbe kerül és antigénexpozícióra esik át.

A BCR receptort két immunglobulin nehézlánc (IGH), illetve két immunglobulin könnyűlánc (IGL) alkotja. Az IGH régió génjei az immunglobulin nehézláncú fehérjék antigénkötő változó (V) és izotípus-specifikus állandó (C) régióit kódolják, és ezek kombinációi rendkívüli szekvencia-diverzitást eredményeznek, ami fontos a különböző antigének hatékony azonosításához. Az immunglobulin nehézláncot több gén kódolja, köztük a változó (V), a diverzitás (D) és a csatlakozó (J) gének, amelyek négy viszonylag konzervált keret régióba (FR1, FR2, FR3, FR4) és három változó, úgynevezett komplementaritást meghatározó régióba (CDR1, CDR2, CDR3) szerveződnek. Az IGHV gén kódolja az FR1/CDR1, FR2/CDR2 és FR3 régiókat, ugyanakkor a CDR3 az IGHV gén és az IGHD gén 3' részének, valamint az IGHJ gén 5' részének kombinációjából jön létre. Ezenkívül a V-D és D-J gének találkozásánál változó számú „nem templát” nukleotid (N) és palindromikus (P) nukleotid adódik hozzá, ami lényegesen növeli a szekvencia diverzitását. Mindezek hatására a CDR3 szekvencia az átrendeződött IGH gén egy igen egyedi régióját képviseli bármely adott B-sejt esetében (Gupta és mtsai., 2020).

A B-sejt érése során számos stádiumon megy keresztül, ezek: a korai pro-B sejt, késői pro-B sejt, pre-B sejt, naiv B-sejt, majd érett B-sejt stádium. Ezen folyamatok során a B-sejt receptort kódoló IgH gén szintén folyamatos változáson megy keresztül.

A pro-B sejt stádiumban sorozatos véletlenszerű génekombinációs események zajlanak, amelyekben elsősorban az immunglobulin nehézlánc-diverzitás (IGHD), valamint az immunoglobulin nehézlánc-csatlakozó (IGHJ) gének vesznek részt. Az átrendeződések következtében a D- és J génszegmentumok egymás mellé rendeződnek, ezt a folyamatot

nevezzük D-J rekombinációnak. Ezt követően a pre-B sejt stádiumban zajlik le a V-D-J rekombináció, amikor is a korábbi D-J szegmentumhoz véletlenszerűen hozzá kapcsolódik egy IGHV gén is (Packard és Cambier, 2013).

A B-sejtek érésük során úgynevezett csíracentrum-reakción esnek át, melynek jellemzője a klonális expanszió, az IgH-lokuszon történő class-switch rekombináció (CSR), a VH-gének szomatikus hipermutációja (SHM) és a BCR-nek az egyedi antigén epitóphoz való fokozott affinitásának szelekciója az affinitásérés által (LeBien és Tedder, 2008).

3.2 A krónikus limfocitás leukémia

A krónikus limfocitás leukémia a nyugati világban leggyakrabban előforduló, felnőttkori B-sejtes rosszindulatú daganat. A közös immunfenotípus ellenére, a malignitást kiterjedt klinikai és molekuláris heterogenitás jellemzi. A CLL rendkívül változatos betegségfolyást mutat, amelyet többek között az újgenerációs-szekvenálási vizsgálatok során feltárt szomatikus mutációk változatos kombinációi magyaráznak (Landau és mtsai., 2013; Puente és mtsai., Wang és mtsai., 2011). A SEER adatbázis egy korábbi frissítésében a krónikus limfocitás leukémia életkorral korrigált előfordulási gyakorisága 4,9-nek felel meg 100 000 lakosra vetítve évente. A diagnózis felállításakor a medián életkor 70 év. A CLL elsősorban az idős betegpopulációban fordul elő, a betegek mindössze 9,1%-a fiatalabb 45 évnél. A betegség előfordulása gyakrabban jelentkezik férfi nem esetén (férfi: nő arány: 1,9:1) etnikumtól függetlenül. Biológiai nemtől függetlenül a populáció körülbelül 0,6%-ánál diagnosztizálnak CLL-t életük során (Hallek és Al-Sawaf, 2021). Míg a betegség lefolyása egyes betegeknél kifejezetten indolens, a betegek körülbelül egyharmadánál progresszív betegségfolyás figyelhető meg (Dighiero, 2003; Dighiero és Hamblin, 2008). A különböző prognosztikus biomarkerek, mint például az immunglobulin nehézlánc gén variábilis régiójának (IGHV) szomatikus hipermutációjának vizsgálatával, a *TP53* defektus meghatározásával, valamint a *ZAP70* expressziójának vizsgálatával és a citogenetikai eltérések kimutatásával ma már lehetőségünk van a betegség agresszív lefolyásának előrejelzésére (Nadeu és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2011).

Az iwCLL (International Workshop on CLL) -irányelvek alapján a CLL diagnózisához legalább 3 hónapig minimum 5000 B-limfocita/μl jelenléte szükséges a perifériás vérben. A keringő B-limfociták klonalitását áramlási citometriával kell megerősíteni. A vérkenetben megtalálható leukémiasejtek jellemzően kisméretű, érett limfociták, keskeny

citoplazmahatárral, sűrű maggal, melyből hiányzik az nukleolusz, illetve részben aggregált kromatinnal rendelkezik (Hallek, 2015; Hallek és mtsai., 2018; Hallek és Al-Sawaf, 2021).

3.3 A CLL kezelése

A CLL kezelésére számos modalitás létezik, ezek közé sorolható a konvencionális kemo-immunoterápia, illetve az elmúlt években paradigmaváltást jelentő célzott terápiák, mint például a Bruton-féle tirozin kináz (BTK) gátló ibrutinib és acalabrutinib, a foszfatidilinozitol-3-kináz gátló idelalisib vagy a BCL-2-inhibitorok közé tartozó venetoclax (Hallek, 2019).

A CLL kezelésének első komolyabb mérföldköve a kemo-immunoterápia bevezetése volt, amely fludarabin, ciklofoszfamid és rituimab kombinációját (FCR) jelentette. Napjainkban az FCR egyértelműen visszaszorulóban van, alkalmazását elsősorban fiatal, jó fizikális állapotban levő, mutált IGHV, valamint wild-type TP53 státusszal rendelkező betegek esetén veszik fontolóra.

Az elmúlt évtizedben jelentős előre lépések történtek a CLL kutatásában, beleértve a visszatérő mutációk és a sejtek klonális összetételének feltérképezését, különböző jelátviteli molekulák és a többlépcsős leukemogén folyamat tisztázását, amely összességében a CLL patogenezisének mélyreható megértéséhez vezetett. Mindezek következtében jelentősen bővült a CLL kezelési lehetőségeinek repertoárja, hisz a betegség mélyebb megértésével lehetőség vált új, célzott kezelések kifejlesztésére.

Mivel a BCR jelátvitel döntő szerepet játszik a CLL patogenezisében, igyekeztek olyan terápiás modalitásokat kifejleszteni, amelyek a BCR jelátvitelt központi elemeit célozzák. A BCR jelátviteli útvonal gátlószerei közül mindenképpen kiemelendők a Bruton féle tirozin kináz gátlók (BTKi), melyek első generációs képviselője az ibrutinib forradalmasította, elsősorban a rossz prognózissal rendelkező (mutálatlan IGHV státusszal és/vagy TP53 defektussal rendelkező) CLL-es betegek kezelését. A gyógyszer 2014-es törzskönyvezése óta számos újabb generációs BTKi került piacra, melyek kedvezőbb mellékhatás-profillal rendelkeznek. A legújabb generációs, az előző generációkkal ellentétben nem-kovalens BTKi pirtobrutinib, a BTKi monoterápiák során megjelenő rezisztencia mutációkat hordozó betegek kezelésére is hatékony alternatívát jelenthet.

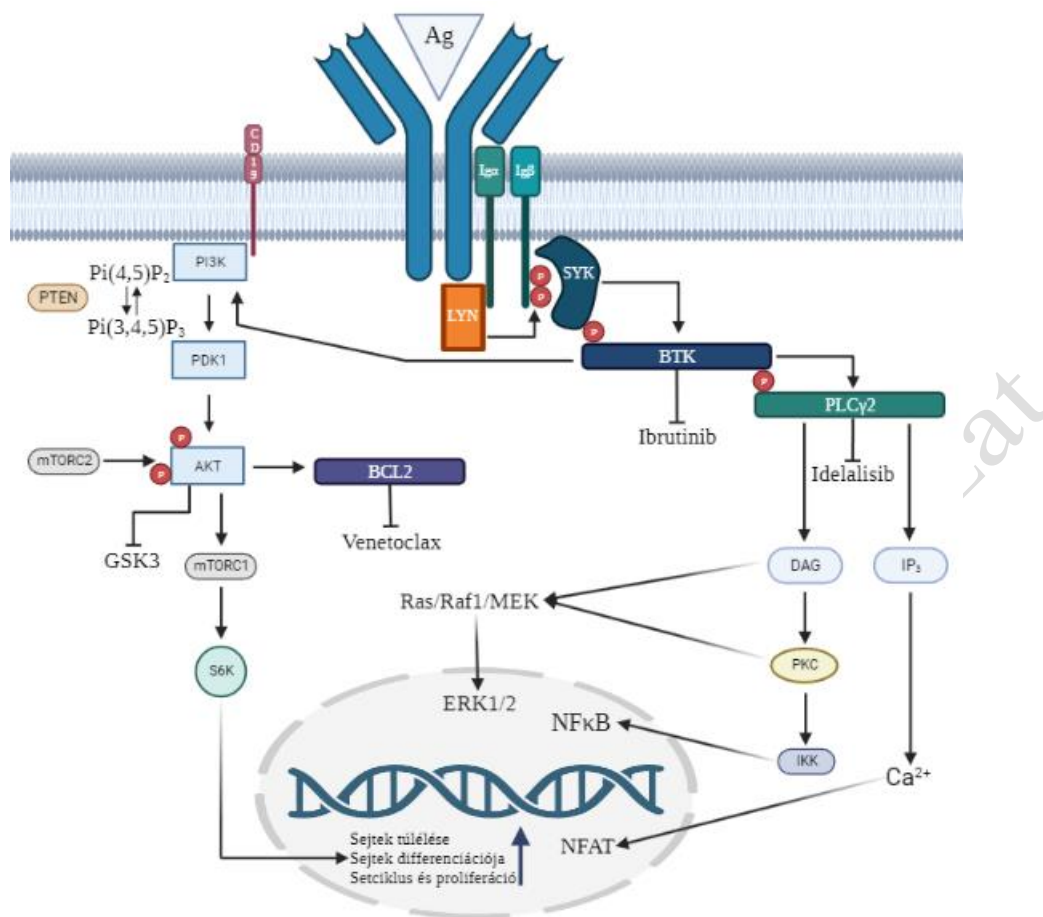
A BTK gátlószerei mellett, a BCL2-gátló venetoclax jelentősen megváltoztatta a CLL terápiás megközelítését (Kikushige, 2020; László és mtsai., 2021).

A BCL2 fehérjecsaldhoz tartozó BCL2 fehérje apoptozist szabalyozó funkcióval bír (Zhang és mtsai., 2022), a fehérje expressziója, mint döntő túlélési mechanizmus elősegíti a tumorgenezist és a terápiás rezisztenciát, mivel lehetővé teszi a CLL-sejtek számára, hogy elkerüljék az apoptozist. A limfoid malignitások gyakran mutatják a BCL2 túlzott expresszióját, ami a BCL2-gátlókat kiváló terápiás lehetőséggé teszi (Lasica és Anderson, 2021). A venetoclax nagy affinitással kötődik a BCL2 fehérjéhez, megzavarja annak jelátvitelét és indukálja az intrinsic apoptotikus útvonalat, ezáltal a túlzott BCL2 fehérje-expressziót mutató leukémiás sejtek apoptozisát idézi elő (Lasica és Anderson, 2021). A venetoclax 2019-es megjelenése tovább szélesítette a CLL-ben alkalmazható célzott terápiák palettáját. Alkalmazása ma már nem csupán refrakter/relabáló, hanem obinutuzumabbal történő kombinációban akár első vonalban is elérhető.

3.4 A BCR jelátviteli útvonal szerepe a CLL patogenezisében

A B-sejt receptor (BCR) a B-sejt fejlődés elengedhetetlen részét képezi, amely számos B-sejtes malignitáshoz hasonlóan, a CLL patogenezisében is kiemelt szerepet tölt be.

A normális B-sejtekben a BCR antigénligáció során aktiválódik (1. ábra), amely a BCR-szignáloszóma (B-sejt linker protein és a hozzá kapcsolódott adapterfehérjék alkotta komplex) kialakulását idézi elő, amely tartalmazza a LYN fehérje tirozinkinázt, a lép tirozinkinázt (SYK), a Bruton agammaglobulinémiás tirozinkinázt (BTK), a foszfolipáz C γ 2-t (PLC γ 2) és a foszfoinozid-3-kinázt. A BCR-szignáloszómában a LYN és a SYK foszforilálja és aktiválja a BTK-t, amely pedig ezt követően foszforilálja a PLC γ 2-t, ami kalcium-mobilizációhoz és számos downstream útvonal, például a MAP-kináz, az AKT és az NF κ B aktiválását váltja ki. Ezek az események a transzkripciós faktorok aktiválásához és a génextpresszióban bekövetkező változásokhoz vezetnek, amelyek a sejtek túlélését, sejtproliferációját és differenciálódását eredményezik (Cheng és mtsai., 2014).



1. ábra A BCR jelátviteli útvonal jelentősebb komponensei és szerepük a CLL kialakulásában. A BCR jelátviteli útvonal antigén inger hatására indul el, melynek következtében a BTK-PLCγ2, PI3K/PKB-Akt-mTOR kaszkádok is aktiválódnak. A másodlagos hírvivő molekulák és transzkripciós faktorok ezt követően a jelet a sejtmagba szállítják, ahol a sejtciklust, a proliferációt, a sejtek differenciálódását és túlélésüket befolyásoló változások mennek végbe. A CLL-ben konstitutívan magasabb BCR-útvonal-aktiváció figyelhető meg, ami túlzott proliferációhoz, az apoptózis elnyomásához, illetve a leukémiás sejtek túléléséhez vezet (Aczél és mtsai., 2019). (Készítve a BioRender.com segítségével)

A CLL-es betegek két alcsoportját különböztethetjük meg a BCR egy részét kódoló immunglobulin nehézlánc-változó régió (IGHV) génjei alapján. Az elkülönítés alapja, hogy az úgynevezett mutált (IGHV-M) CLL-ek olyan antigén-tapasztalt B-sejtekből származnak, amelyek a másodlagos nyirokszervek csíráközpontján, az immunglobulinok szomatikus hipermutációjának helyszínén keresztülhaladtak. Ezzel szemben a mutálatlan (IGHV-U) CLL-ek a GC előtti (naiv) B-sejtekből származnak (Bosch és Dalla-Favera, 2019).

Széleskörben elfogadott, hogy a BCR által keltett szignálok fontos szerepet játszanak a CLL patogenezisében.

Az IGHV-U CLL-ek esetében általában alacsony affinitású, polireaktív és önreaktív BCR-ek kerülnek kifejezésre, míg az IGHV-M CLL-ek általában oligo-reaktív és mono-reaktív BCR-eket fejeznek ki a sejtfelszínükön (Bosch és Dalla-Favera, 2019). Az IGHV-M CLL-ben és az IGHV-U CLL-ben szenvedő betegek az Ig-gének erősen korlátozott repertoárjával

rendelkeznek, ami az antigénszelekció szerepére utal a betegség patogenezisében. A CLL-es betegek körülbelül egy harmadánál, különösen az IGHV-U CLL-es betegnél sztereotip BCR-ek („subsetek”) figyelhetők meg, amelyek a komplementer meghatározó régiókon (CDR) alapszanak.

Több száz különböző CLL sztereotípusos alcsoportot azonosítottak már, melyek tovább oszthatók több, eltérő biológiai és klinikai jellemzőkkel rendelkező alcsoportokra. Mind az IGHV-M, mind az IGHV-U altípusok az antigén-független, sejt-autonóm BCR-szignálásra is támaszkodhatnak, ami lehetséges magyarázatot ad a BCR-szignálút vonal terápiai célzására (Bosch és Dalla-Favera, 2019).

3.5 A CLL molekuláris profilja

A CLL heterogenitása feltehetően a különböző tényezők összetett kölcsönhatásának köszönhető, a tumor kialakulása és progressziója a sejten belüli és kívüli mechanizmusok együttes hatásával áll összefüggésben. Ilyen mechanizmus lehet például az onkogének (például a *NOTCH1*) aktiválása és/vagy a tumorszupresszor gének (például a *TP53* és az *ATM*) eliminálása, illetve bizonyos aberrációk, különösen a *TP53* gént zavaró aberráció, amely jelentősen befolyásolja a betegség kimenetelét. Ez utóbbiak a CLL-sejteknek a környező mikrokörnyezettel való kapcsolatával függenek össze a külső milióból a sejt belsejébe irányuló jelátvitelt közvetítő különböző receptorokon keresztül (Stamatopoulos és mtsai., 2017).

A CLL-t nagymértékű kromoszóma-rendellenességek, epigenetikai változások, mikro-RNS-expressziós változások, immunglobulin nehézlánc génmutációk és egyéb genetikai változások jelenléte jellemzi. A mutálatlan IGHV státusz, a *ZAP-70* és *CD38* fehérjék expressziója, az olyan kromoszóma-rendellenességek, mint a 17p és 11q deléciók, valamint a *NOTCH1*, *SF3B1* és *BIRC3* gének mutációi kedvezőtlen prognózissal járnak együtt. Ezenfelül a tumorszupresszor gének, mint például a *TP53* és az *ATM* mutációit a hagyományos kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciával hozták összefüggésbe.

A krónikus limfocitás leukémiában (CLL) a *TP53* gén rendellenességei, amelyeket a 17p13 lókuszt deléciója és/vagy a *TP53* génen belüli mutáció(k) idéznek elő, kemoimmunterápiás rezisztenciával és különösen rossz klinikai kimenetellel járnak együtt. A betegek jobb osztályozása és a terápiai döntések elősegítése érdekében a *TP53*-abberációk vizsgálata bekerült a standard rutindiagnosztikai alkalmazásba. Az új célzott kezelések, köztük a BCR jelátvitel gátlóinak és az anti-apoptotikus BCL2 fehérje-családtagnak a *TP53*-defektusos

betegben való hatékonysága miatt a *TP53*-rendellenességek prediktív jelentőségének vizsgálata egyre fontosabbá válik. A fluoreszcens in-situ hibridizációs (FISH), valamint a kromoszóma-rendellenességek azonosítására alkalmazott korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a del(17p)-vel rendelkező CLL-es betegek általános túlélése lényegesen alacsonyabb, mint az egyéb visszatérő citogenetikai rendellenességekkel, például del(11q), triszómia 12 vagy del(13q) rendelkező személyek esetében. A második *TP53* allél mutációi általában a del(17p) okozta *TP53*-lókuszt inaktiválásához kapcsolódnak. *TP53*-mutációk ugyanakkor del(17p) nélkül is előfordulhatnak a kezeletlen betegek kb. 5%-ánál, és a del(17p) CLL-es betegek esetében megfigyelt kórleforduláshoz hasonlóan kedvezőtlen kimenetelű betegséggel járnak. Pontosabban, a *TP53*-mutációval rendelkező betegeknek csak 60-70%-a rendelkezik del(17p)-vel, amint azt a FISH vizsgálatok kimutatták, míg a del(17p)-vel rendelkező betegek mintegy 90%-a hordoz *TP53*-mutációt. Számos tanulmány alátámasztotta a *TP53*-mutáció elemzésének terápiás értékét CLL-ben, és a prospektív klinikai vizsgálatok eredményei bizonyították, hogy a *TP53*-rendellenességgel rendelkező egyének rezisztensek a kemoimmunoterápiával szemben. Ennek fényében szükségessé vált a *TP53* génstátusz pontos értékelése a rutin klinikai gyakorlatban azzal a céllal, hogy azonosítani lehessen azokat a betegeket, akik nem részesülnek a kemoimmunoterápiás kezelésben, és akiknél inkább célzott terápiás módszerek alkalmazását kell fontolóra venni, mint például a BCR jelátvitelt vagy az anti-apoptotikus BCL2-t gátló új kezelési lehetőségek, melyek hatásosnak bizonyultak a *TP53*-abberációt hordozó betegek esetében (Malcikova és mtsai., 2018).

3.6 CLL specifikus kromoszóma-rendellenességek

A specifikus kromoszóma-rendellenességek és génmutációk a betegség progressziójának és túlélésének diagnosztikus és prognosztikai indikátoraiként szolgálnak. Ezen anomáliák azonosítása a legmodernebb molekuláris citogenetikai technikákkal zajlik, mint például fluoreszcens in-situ hibridizáció (FISH), komparatív genomiális hibridizáció (CGH), egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) alapú genomikai profilalkotás, valamint az újgenerációs szekvenálás (NGS) amely kiemelkedő segítséget jelenthet ezen betegek klinikai kezelésében, beleértve az optimális kezelés megtervezését is. Az új terápiás szerek hatékonyságát a CLL-betegeknél ezen molekuláris elváltozások jelenlétének függvényében szükséges vizsgálni (Shahjehani és mtsai., 2015).

Mivel a betegség genetikai heterogenitását és a betegségspecifikus genetikai mutáció hiányát az 1990-es évek elején fedezték fel, a CLL citogenetika változatosságait eredetileg a

hagyományos kromoszómasáv-analízis (CBA) elvégzésével vizsgálták. A fluoreszcens in situ hibridizáció idővel felváltotta a CBA-t, mivel a reprezentatív metafázisok felvételét akadályozó technológiai nehézségek miatt nem volt lehetséges a reprezentatív metafázisok megszerzése. A 13q, 11q és 17p kromoszómák részleges deléciói [del(13q), del(11q), del(17p)] és a 12-es kromoszóma triszómiája négy olyan visszatérő rendellenesség, amelyet a 2000-es évek elején végzett mérföldkőnek számító kutatás szerint a CLL-es betegek mintegy 80%-ánál találnak FISH-vel. A legfrissebb iwCLL ajánlásai szintén kimondják, hogy ezen elváltozások mindegyike más-más klinikai kimenetelhez társul, ennek köszönhetően mindannyian szerepelnek a jól ismert Döhner-féle hierarchikus modellben, amelyet a klinikai környezetben elsősorban a del(17p) kimutatására javasolnak. Egy újabb prognosztikus citogenetikai eltérés az úgynevezett komplex kariotípus (CK) jelenléte, amelyet három vagy több strukturális és/vagy numerikus rendellenesség határoz meg. A CK jelenléte kedvezőtlen prognózissal és szuboptimális terápiás válasszal jár, míg a célzott terápiák korában a prediktív értéke aktív vita tárgyát képezi. Emellett egyre több bizonyíték van arra, hogy nem minden CK egyforma. Azonban míg bizonyos CK-alcsoportok, például a többször triszómiát hordozó esetek indolens klinikai kórelőzményt mutatnak, addig az öt, vagy annál több aberráció által meghatározott magas komplexitás független kedvezőtlen prognosztikai markernek bizonyul (Ljungström és Baliakas, 2021).

3.7 Az IGHV státusz CLL-ben

1999-ben a Hamblin/Stevenson, és a Chiorazzi csoport egymástól függetlenül számolt be arról, hogy eltérő klinikai lefolyással rendelkeznek az IGHV génekben végbemenő SHM-k által meghatározott betegcsoportok CLL-ben. Azóta világszerte több csoport is alátámasztotta, hogy az IGHV génmutációs státusz a legmegbízhatóbb markerek egyikét képezi a CLL-ben, klinikai stádiumtól függetlenül (Langerak és mtsai., 2011). A mutálatlan IGHV státuszhoz társított kedvezőtlen prognózis miatt az SHM-vizsgálatot a CLL-ben standard kezelési módszerként végzik. Az SHM következményeképpen az érintett B-sejtekben az IGH-gén átrendeződések nukleotidszekvenciái eltérnek a csírvonalbeli megfelelőiktől. A "mutáció nélküli" klonális IGH génátrendeződés nagyon magas nukleotidszekvencia-azonossággal rendelkezik a csírvonalbeli IGHV génnel. A "mutált" CLL-t ezzel ellentétben az jellemzi, hogy az IGHV szekvencia bizonyos százalékkal eltér a csírvonalbeli referenciához viszonyítottan (Gupta és mtsai., 2020; Nagy és mtsai., 2021).

Megállapodás alapján a CLL SHM-státuszát a diagnózis felállításakor felismert domináns klónpopulációról jelentik. Az ERIC (European Research Initiative on CLL) irányelvei alapján, amennyiben a kimutatott klón IGHV szekvenciája több mint 2%-ban eltér a csírvonalbeli szekvenciától mutált IGHV-ról beszélünk, míg ez alatt mutálatlan IGHV státuszról van szó (Gupta és mtsai., 2020; Raponi és mtsai., 2020). A 98%-os határértékhez közeli IGHV-azonossággal rendelkező CLL-eseteket "borderline" (BL) esetként definiálják. Davis és munkatársai (2016) a borderline CLL-t a mutált, illetve nem mutált CLL-hez képest viszonyítva köztes kimenetelű esetként határozták meg, melynek a csírvonalbeli megfelelőjével 97-98%-os az egyezés (Raponi és mtsai., 2020).

Amint azt több tanulmány is megerősítette (Damle és mtsai., 1999; Hamblin és mtsai., 1999; Kröber és mtsai., 2002), a mutálatlan CLL kedvezőtlenebb kimenetelű, míg a mutált CLL kevésbé agresszív kórlefolyást mutat (Gupta és mtsai., 2020). Jelenleg az U-CLL-ek a BCR gátlók első vonalbeli kezelésének jelöltjei, tekintettel a kemoimmunterápiát követő rövid progressziómentes túlélésre (PFS), míg a kedvezőtlen citogenetikával nem rendelkező IGHV-M CLL-ek még mindig profitálhatnak az első vonalbeli kemoimmunterápiából, amelyet általában hosszabb PFS követ (Raponi és mtsai., 2020).

A SHM következtében végbemenő génátrendeződés által négy féle végkimenetelről beszélhetünk. Az első lehetséges végkimenetel, hogy egyetlen produktív IGHV-IGHD-IGHJ génátrendeződés megy végbe, azonban ebben az esetben kihívásként megjelenhet a B-CLL interpretálásának az esete, valamint két klinikai szempontból is külön interpretációt igénylő, a 2-es és 8-as subsetek problematikája.

Az IGHV-IGHD-IGHJ génátrendeződések lehetnek nem produktívok, abban az esetben, ha például stop kodonokat vagy a szekvencia kódoló részén belül frameshift mutációk kialakulásához vezető indeleket hordoznak. Mivel a CLL-sejtek valójában érett B-sejtek, amelyeknek funkcionális (sejtfelszíni) Ig molekulákat fejeznek ki, ezért egyetlen nem produktív génátrendeződés rendkívül ritka (az összes CLL < 0,1%-a). Ebben az esetben további vizsgálatot kell végezni, annak érdekében, hogy az IGH-kókuszmásik allélján produktív génátrendeződés legyen azonosítható.

Harmadik lehetőségként előfordulhatnak kettős átrendeződések is, ahol az egyik allélon egy produktív, a másikon pedig egy nem produktív átrendeződés megy végbe. Mindez az összes CLL 10,54%-át teszi ki. Egyelőre még nem bizonyított, hogy a nem produktív BCR Ig génátrendeződések bármely biológiai és/vagy klinikai jelentőséggel bírnának CLL-ben,

ezért az ilyen esetek SHM-státuszát kizárólag a produktív génátrendeződés alapján kell meghatározni.

Kettős átrendeződés másik esete, amely egyben a negyedik lehetséges végkimenetel is, amikor két, egymástól független produktív IGH átrendeződés történik. CLL esetén a két független B-sejt klón együttes létezésének oka lehet: vagy egy CLL-klón és egy különálló, nem CLL-es B-sejt klón, vagy pedig két különböző CLL-sejt klón. Ezen típusú génátrendeződés úgyszintén rendkívül ritka, az összes CLL <0,1%-a. Klinikai szempontból kedvezőtlen prognosztikai markereket és agresszív betegséget mutattak, illetve korai kezelést igényeltek, az U-CLL-es betegekhez hasonlóan (Agathangelidis és mtsai., 2022).

A BCR-sztereotípiának elnevezett jelenséget a legerősebb bizonyítéknak tekintették arra, hogy az antigénszelekció jelentős szerepet játszik a betegség patobiológiájában, és potenciálisan alakítja az egyes betegcsoportok sajátos jellemzőit. Az egymással nem rokon CLL betegek közel azonos, ha nem is azonos BCR IG-t hordoznak. Ez a megállapítás alátámasztotta azon későbbi felfedezéseket, melyek szerint a hasonló BCR IG-t kifejező és így egy külön "sztereotip" frakcióba tartozó CLL-betegek összességében feltűnően hasonló klinikai-biológiai jellemzőkkel rendelkeztek, beleértve a betegség prognózisát is (Stamatopoulos és mtsai., 2017).

Klinikai szempontból a leginkább figyelemre méltó már korábban említett sztereotip alcsoportok a 2. és a 8. alcsoport, amelyek egyaránt kedvezőtlen prognózissal társulnak. A 2-es alcsoportba tartoznak a BCR IG-t expresszáló, az IGHV3-21/IGLV3-21 gének által kódolt, jellegzetes, korlátozott VH és VL CDR3 szekvenciákkal rendelkező CLL-es betegek, akik többsége (~60-65%) szomatikus hipermutáción átesett IGHV gént hordoz.

A 2-es alcsoport jelentősen gyakrabban hordozza az SF3B és az ATM gén aberrációit, beleértve a deléciókat és mutációkat egyaránt. Az egyre nagyobb kiterjedésű kohortok retrospektív elemzései kimutatták, hogy a 2-es alcsoportba tartozó betegek esetében különösképpen agresszív betegségfolyás tapasztalható, az IGHV gén SHM státuszától függetlenül.

A 8-as alcsoportba tartoznak azok a CLL-ben szenvedő betegek, akik az IGHV4-39/IGKV1(D)-39 gének által kódolt BCR Ig-t expresszálják, megkülönböztető, korlátozott VH és VK CDR3 szekvenciákkal. A 8-as alcsoport a triszómia 12 és a NOTCH1 mutációk jelentős feldúsulását mutatja, ami egy újabb példája a genomális aberrációk alcsoportok szerinti összetételére (Agathangelidis és mtsai., 2022). Ghiotto és munkatársai (2004) eredeti jelentésében megjegyezték, hogy a 8-as alcsoportba tartozó öt betegből kettőnél Richter-transzformáció lépett fel. Ezt a kezdeti megfigyelést később egy olaszországi kollaboratív

vizsgálat is megerősítette, ahol arról számoltak be, hogy a 8-as alcsoportba tartozó betegeknél 10-szer nagyobb a kockázata ennek a kialakulásának, mint az összes többi CLL-es betegnél (Agathangelidis és mtsai., 2022; Rossi és mtsai., 2009). Ezt követően a német CLL munkacsoport által végzett három prospektív klinikai vizsgálat metaanalízise azt mutatta, hogy a Richter-transzformáció legnagyobb kockázata a 8-as alcsoportba tartozó betegeknél állt fenn. A 8-as alcsoportba történő besorolás immunogenetikai szempontból is releváns, tekintettel arra, hogy a Richter-szindrómás (RS) esetek legfontosabb prognosztikai markerét a CLL és az agresszív limfóma-klónok közötti immunogenetikai kapcsolat jelenti. Pontosabban, a kemoimmunterápia korszakában az immunogenetikailag nem kapcsolódó RS-klónokkal rendelkező esetek jobb prognózist mutatnak (medián túlélés ~5 év), mint az immunogenetikailag kapcsolódó RS-klónokkal rendelkező esetek (medián túlélés 8-16 hónap) (Agathangelidis és mtsai., 2022).

3.8 Szekvenálás

A génszekvenálás olyan összességében biokémiai módszer, mely a nukleinsav bázisrendjének meghatározását teszi lehetővé. A nukleinsavak által alkotott polinukleotidláncok végső soron információkat hordoznak a földi élet örökletes és biokémiai tulajdonságairól. Ezért a biológiai kutatások szempontjából létfontosságú, hogy képesek legyünk az ilyen szekvenciák számszerűsítésére vagy kikövetkeztetésére.

3.8.1 Sanger szekvenálás

A DNS szekvenálás technológiájának fejlődését végleg megváltoztató áttörés 1977-ben következett be, amikor is Frederick Sanger kifejlesztette a lánctermináció, másnéven dideoxi technikát. A technika a DNS szálak monomereinek, a dezoxiribonukleotidok (dNTP-k) kémiai analógjait alkalmazza a láncterminációs módszerben. A dideoxinukleotidok (ddNTP-k) nem tudnak kapcsolatot létesíteni a következő dNTP 5' végén található foszfátcsoporttal, mivel hiányzik belőlük a DNS-lánc meghosszabbításához szükséges 3' végen elhelyezkedő hidroxilcsoport. A reakció során minden lehetséges hosszúságú DNS-szál keletkezik, ha a DNS-hosszabbítási folyamathoz a közönséges dNTP-k koncentrációjának töredékében adunk fluoreszcensen jelölt ddNTP-eket. Ez azért lényeges, mert a dideoxi nukleotidok véletlenszerűen épülnek be a szál hosszabbításakor, megakadályozva a további nukleotidok beépülést. A láncevződéses módszernek, más néven Sanger-szekvenálásnak az alapelve,

hogyan az összes lehetséges hosszúságú szekvenciát előállítsa, és a végső nukleotidot jelölje meg. Pontosságának, robusztusságának és könnyű használhatóságának köszönhetően már több évtizede a DNS-szekvenálás egyik legnépszerűbb módszere (Heather és Chain, 2016).

3.8.2 Újgenerációs szekvenálás (NGS)

A technológiai fejlődés előretörése megnyitotta az utat a klinikai diagnosztika számos aspektusában, mivel egyre több diagnosztikai laboratórium alkalmazza meglévő munkafolyamataiban az új generációs szekvenálást (NGS). Az NGS bevezetésével az immunogenetikai elemzéshez elérhetővé vált az IGH génátrendeződések mélyebb vizsgálata, ami jelentős befolyással lehet az immunogenetikai elemzés valamennyi alkalmazására, beleértve az IGHV gén SHM vizsgálatát a CLL-ben (Davi és mtsai., 2020).

A célzott szekvenálás (TS), a teljes genom szekvenálás (WGS) és a teljes exom szekvenálás (WES) a három elsődleges NGS DNS-szekvenálási technika, amelyek a genetikai aberrációk kimutatására alkalmazhatók. A TS a rutindiagnosztikában legszélesebb körben elterjedt alkalmazási módja az NGS technológiának, amely a WGS vagy WES eljárásokhoz viszonyítva költséghatékony, mégis számos daganat, vagy akár egyéb betegség esetén optimalizálható, kisebb bioinformatikai analízist szükségessé tevő eljárás. Számos, jelenleg használt, a WGS/WES számára létrehozott technika és folyamat felhasználható a TS esetében az adatok elemzésére. A TS egyéb NGS alapú módszerekhez viszonyított nagyobb „mélysége” miatt azonban az elemzés során fokozott óvatossággal kell eljárni annak érdekében, hogy csak megfelelő minőségű variánsok maradjanak meg, különösen a rossz minőségű vagy töredezett DNS-ből és/vagy megfelelő normális kontroll nélkül származó adatok esetében. Mivel a különböző protokollokat használó különböző laboratóriumok nem biztos, hogy következetesen tudják megadni ezeket a variánsokat, ez jelentősen befolyásolhatja a TS pontosságát és hatékonyságát a prognosztikai és terápiás mintázatokhoz szükséges variánsok megadásában (Bewicke-Copley és mtsai., 2019).

Az NGS figyelemre méltó előnyei közé tartozik az ún. „batch processing”, amely a Sanger szekvenáláshoz képest jóval nagyobb hatékonyságot tesz lehetővé, a közvetlen klónazonosítás, a költség-versenyképesség, valamint az a lehetőség, hogy akár egynél több domináns klonális IGH átrendeződés is azonosítható. Bár a Sanger szekvenálás és az NGS is magas szintű felhasználói jártasságot és ismereteket igényel bizonyos szoftverprogramokkal és adatelemzéssel kapcsolatban, az NGS-adatokban található

leolvasáshalmok könnyebben eredményeztek konszenzusos klonális szekvenciákat, mint a tisztaszekvencia-kontigok létrehozására szolgáló, időigényesebb Sanger-módszer.

Klein Adrienn - Szakdolgozat

4. Anyagok és módszerek

4.1 Betegek

A magyarországi CLL-es betegek IGHV szomatikus hipermutációs státuszának meghatározása a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében zajlott. A 2022.06.08 és 2023.01.26. időintervallumban beérkezett minták közül 94 beteg genomiális DNS-mintáját vizsgáltuk. Ezek közül 13 csontvelő és 81 perifériás vér minta érkezett. A vizsgált betegek nemenkénti eloszlása a következőképpen alakult: 39%-uk (37/94) nő, míg 61%-uk (57/94) férfi, az átlag életkoruk 70 év.

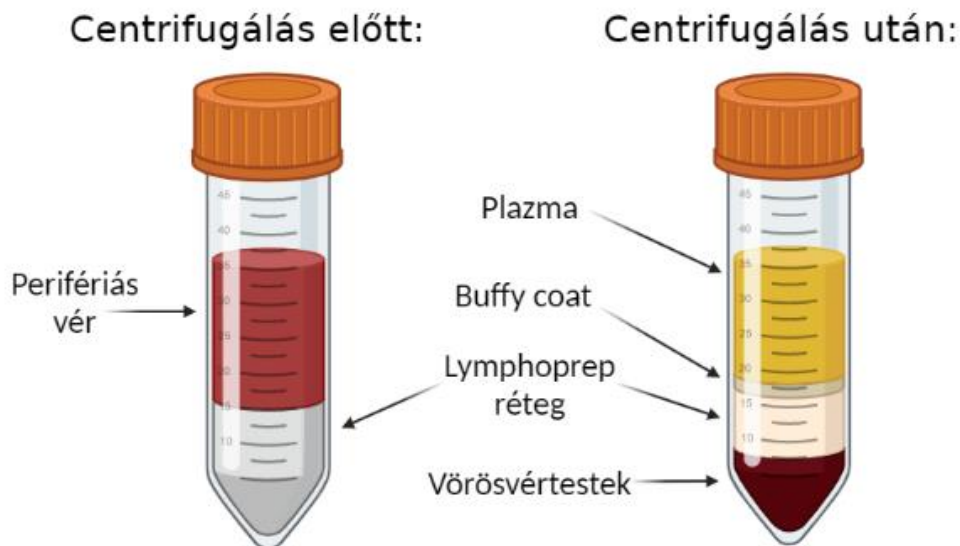
A felhasznált minták az ország egész területéről 19 különböző egészségügyi centrumból érkeztek.

4.2 Mintaelőkészítés

4.2.1 Lymphoprep

A DNS izolálást megelőzően a mononukleáris sejtfraekciót sűrűséggradiens-centrifugáció segítségével különítettük el, Lymphoprep alkalmazásával, amely egy felhasználásra-kész, steril és endotoxin-tesztelt sűrűséggradiens-t képző médium.

A folyamat első lépésében 2 ml Lymphoprep oldatra óvatosan 6-8 ml EDTA-csőbe levett vért rétegzünk Falcon csőben. Ezt követi a minták a centrifugálása, amely 800 g-n, 3 percig történik, a gyártó előírásainak megfelelően (2. ábra). Második lépésként a buffy coat réteget, amely tartalmazza a mononukleáris sejteket pipetta segítségével átmérjük új Falcon csőbe, melyhez ezt követően 5 ml PBS mosóoldatot adunk hozzá. A minták átfogatását és 300 g-n, 10 percig történő centrifugálását követően a felülúszót leöntjük és 400 µl PBS mosóoldatban szuszpendáljuk a sejt pelletet.



2. ábra Sűrűség-grádiens alapú sejtszeparáció: A módszer alapja a sűrűség-képző médium (LymphoPrep) valamint a vérben megtalálható alakos elemek közti denzitáskülönbség. Centrifugációt követően a vörösvértestek, trombociták, granulociták a kémcső aljára, míg a mononukleáris sejtek (limfociták, monociták) a sűrűség-képző anyag felszínén jelennek meg úgynevezett buffy-coatot képezve.
(Készítve a BioRender.com segítségével)

4.2.2 DNS izolálás, koncentráció és tisztaság mérése

A mononukleáris sejtek szeparációját követően, az izolálás a Magcore® Plus II nukleinsav izolátorral történik, a Magcore 101-es preparációs kit alkalmazásával (Genomic DNA Whole Blood Kit-RBC Bioscience, New Taipei City, Tajvan) amely gyors és nagy hozamú nukleinsav-tisztítást tesz lehetővé.

Az izolálást követően a minták koncentrációját, valamint tisztaságát a NanoDrop™ Lite Spektrofotométer (Thermo Scientific, CA, USA) segítségével határozzuk meg. A Nanodrop Lite mikrotérfogatú mintavételi technológiát alkalmaz, ezzel lehetővé téve, hogy 2 µl-nyi mintát közvetlenül az optikai mérőfelületre pipetázzunk. A nukleinsav koncentráció mérése 260 nm-en történik, míg a DNS-minták tisztaság mértékét a A_{260}/A_{280} hányados adja meg. Ezen paraméterek alapján az izolált DNS minősége legalább 1,8-es érték esetén tekinthető megfelelő tisztaságúnak.

4.3 IGHV-státusz meghatározása

4.3.1 Sanger szekvenálás

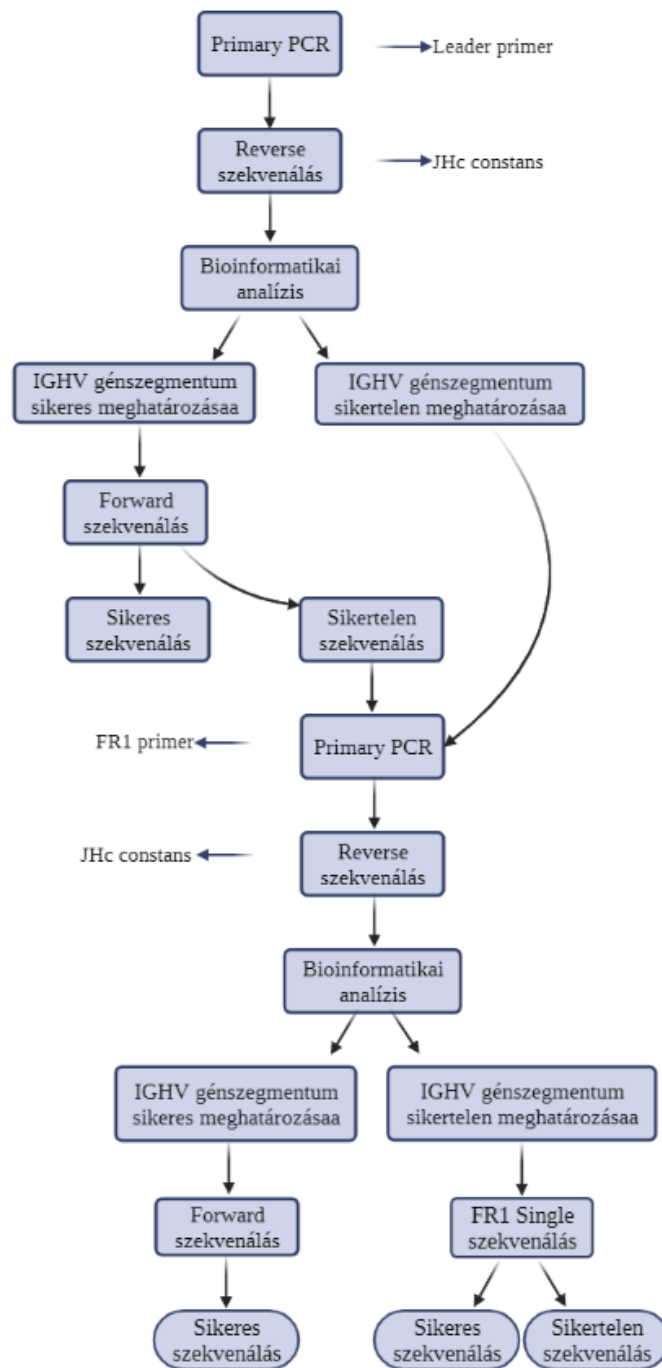
Az IGHV-státusz meghatározása konvencionális Sanger szekvenálással, multiplex-PCR-t követően történik. A Sanger szekvenálási munkafolyamat lépéseit részletesen az 3. ábrán vázoljuk. A multiplex-PCR, valamint a szekvenálások során alkalmazott primerszekvenciákat az 1. táblázatban tüntettük fel.

A primary PCR során használt Leader mix a következő arányok szerint készíthető el: 5-5 μ l VH1 α L, VH1 β L, VH2 α L, VH2 β L, VH3 α L, VH3 β L, VH4 L, VH5 L, VH6 L és 40 μ l steril víz. Szintén a primary PCR lépésnél használt JH mix komponensei és arányai: 20 μ l IGHV JH1-2, 10 μ l IGHV JH3, 20 μ l IGHV JH4-5, 10 μ l IGHV JH6 és 40 μ l steril víz.

Az FR1 mix komponensei és azok aránya primary PCR reakció során a következő: 10-10 μ l VH1 FR1, VH2 FR1, VH3 FR1, VH4 FR1, VH5 FR1, VH6 FR1 és 40 μ l steril víz.

Név	Szekvencia	PCR	Mix
VH1 α L	AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG	1	Leader mix
VH1 β L	AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGM	1	Leader mix
VH2 α L	AAATCGATACCACCATGGACACACTTTGCTMAC	1	Leader mix
VH2 β L	AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTTCCAC	1	Leader mix
VH3 α L	AAATCGATACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC	1	Leader mix
VH3 β L	AAATCGATACCACCATGGARYTKKGRCTBHGC	1	Leader mix
VH4 L	AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT	1	Leader mix
VH5 L	AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC	1	Leader mix
VH6 L	AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTTCCTC	1	Leader mix
IGHV JH1-2	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC	1	JH mix
IGHV JH3	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC	1	JH mix
IGHV JH4-5	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC	1	JH mix
IGHV JH6	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC	1	JH mix
IGHV JH	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	2	JHc
IGHV1	CCATGGACTGGACCTGGA	2	Forward szekvenálás (leader)
IGHV2	ATGGACATACTTTGTTCCAC	2	Forward szekvenálás (leader)
IGHV3	CCATGGAGTTTGGGCTGAGC	2	Forward szekvenálás (leader)
IGHV4	ATGAAACACCTGTGGTTCTT	2	Forward szekvenálás (leader)
IGHV5	ATGGGGTCAACCGCCATCCT	2	Forward szekvenálás (leader)
IGHV6	ATGTCTGTCTCCTCCCTCAT	2	Forward szekvenálás (leader)
VH1 FR1	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás
VH2 FR1	GTCTGGTCTACGCTGGTCAAACCC	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás
VH3 FR1	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás
VH4 FR1	CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás
VH5 FR1	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás
VH6 FR1	TGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG	1-2	FR1 mix, FR1 forward szekvenálás

1. táblázat Alkalmazott primerek



3. ábra Sanger-szekvenálás munkafolyamatának lépései
(Készítve a BioRender.com segítségével)

A szekvenálást minden esetben a „LEADER” primerekkel kezdjük, mivel ez biztosítja a teljes FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2, CDR3 régiók lefedését. Amennyiben a szekvenálás eredménytelennek bizonyul a LEADER primerek segítségével, az „FR1” primer-settel az eljárást megismételjük.

A Sanger-szekvenálás alapú IGHV meghatározás első lépéseként az ún. leader (vagy FR1) mixet alkalmazzuk az ún. primary-PCR reakció részeként. A mixek összetételét, valamint a pontos arányokat az 2. táblázaton, a PCR kondíciókat pedig a 3. táblázatban tüntettük fel.

Komponens	Mennyiség (µl) / cső
<i>Forward mix (leader/FR1 mix – 25 nM)</i>	1,00 µl
<i>JH mix (reverz mix – 25 nM)</i>	1,00 µl
<i>DNS templát</i>	1,00 µl
<i>Steril víz</i>	9,50 µl
<i>AmpliTaq Gold MM</i>	12,50 µl
<i>Végtérfogat:</i>	25 µl

2. táblázat Leader/FR1 mix összetétele

Lépések:	Hőmérséklet:	Idő:	
<i>Elődenaturáció</i>	94°C	7 perc	
<i>Denaturáció</i>	94°C	30 másodperc	} 35 ciklus
<i>Primer kötődés</i>	60°C	45 másodperc	
<i>Extenzió</i>	72°C	1 perc	
<i>Term.extenzió</i>	72°C	10 perc	

3. táblázat Primary-PCR kondíciók

A primary-PCR-t követően a JHc (JHconstans) primer alkalmazásával reverz irányból megszekvenáljuk a primary-PCR reakció termékét. A reverz szekvenálás eredményeképpen egy viszonylag magas szekvenálási háttérrel rendelkező szekvenciát kapunk, amelyet bioinformatikai analízissel elemzünk. Az analízis eredményeképpen meghatározzuk az IGH génátrendezés variabilis génszegmentumát. Ezt követően, a primary-PCR termékből forward irányú szekvenálást végzünk a reverz-szekvenálás során azonosított V génszegmentumnak megfelelően.

A PCR reakciók során az AmpliTaqGold polimeráz enzimet (ThermoFiser Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmaztuk. A PCR-reakció termékeit enzimatikusan „exosap” alkalmazásával tisztítottuk (ThermoFiser Scientific Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). A Sanger szekvenálási reakcióhoz a BigDye 3.1 terminátort és az 5x szekvenáló puffert (ThermoFiser, Waltham, MA, USA) használtuk. A mixek összetételét, valamint a pontos arányokat az 4. táblázaton, míg a szekvenálási reakció során alkalmazott PCR kondíciókat az 5. táblázatban tüntettük fel.

Komponens	Mennyiség (µl) / cső
<i>JHc primer – 25 nM</i>	0,250 µl
<i>BigDye 3.1 terminátor</i>	0,500 µl
<i>Templát</i>	1,875 µl
<i>BigDye 5x szekvenáló puffer</i>	6,375 µl
<i>Steril víz</i>	1,000 µl
<i>Végtérfogat:</i>	10 µl

4. táblázat Szekvenálási reakció komponensei és arányai

Lépések:	Hőmérséklet:	Idő:	
<i>Elődenaturáció</i>	95°C	5 perc	} 28 ciklus
<i>Denaturáció</i>	95°C	30 másodperc	
<i>Primer kötődés</i>	51°C	25 másodperc	
<i>Extenzió</i>	60°C	4 perc	

5. táblázat Szekvenálási reakció PCR kondíciói

4.3.2 NGS-alapú IGHV-szekvenálás

Az NGS-alapú mutációanalízist a LymphoTrack® Dx IGHV Leader Somatic Hypermutation Panel Assay (Invivoscribe, San Diego, USA), valamint a LymphoTrack® IGH FR1 Assay (Invivoscribe, San Diego, USA) alkalmazásával, illumina Miseq készüléken végeztük (Illumina, San Diego, California, USA) a gyártó előírásainak megfelelően. A szekvenálási reakciót MiSeqReagent Kit v3 alkalmazásával, 300-ciklusos flow-cellen, paired-end szekvenálással végeztük. A szekvenálási reakciók során egységesen 100ng bevitt DNS-mennyiséggel dolgoztunk. Az NGS-könyvtárkészítés során az amplifikált termékeket Agencourt AMPure XP mágneses gyöngyökkel (Beckman Coulter, Brea, California, USA) tisztítottuk. A könyvtárak minőségét qPCR alkalmazásával ellenőriztük a KAPA Library Quantification Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). A szekvenálás során generált FastQ fileokat a LymphoTrack Dx MiSeq Data Analysis (Invivoscribe, San Diego, USA) szoftver 2.4.3-as verziójával elemeztük.

4.4 Bioinformatikai analízis

A bioinformatikai analízist az International ImMunoGeneTics information system (IMGT/V_QUEST) és az ARResT/AssignSubsets (Bystry és mtsai., 2015) online bioinformatikai platformok segítségével végeztük.

A folyamat első lépéseként, a megfelelő faj és receptortípus kiválasztását követően, az analizálni kívánt szekvenciát úgynevezett FASTA formátumban kell megadni a 4. ábrán feltüntetett módon.

Analyse your IG (or antibody) or TR nucleotide sequences

The list of the IMGT/V-QUEST reference directory sets to which your sequences can be compared is available [here](#).

Human sequence sets to test IMGT/V-QUEST are available [here](#).

Your selection

Species: Receptor type or locus:

Sequence submission

Type (or copy/paste) your nucleotide sequence(s) in **FASTA** or in **FASTQ** format

```
>48724
AGGGCTTCCTAGTCTTAAGGCTGAGGAAGGGATCTGGTTAGTTAAGAGGATTTATTACCCCTGTGCTCTCCACAGGTGCCAGTCCAGGTG
CAGCTGGTGCAGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGTCTCCTGGTGAAGGCTCCTGCAAGGCTTCGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAAGGGCTTGGTGGATGGGAGGGATCATCCCATTCTTTGGTACAGCAAACACGACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC
GATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGCTATGGTTCGG
GGAGTTATTAATTACTACTACTACTACTACATGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCCACCGTCTCTCCAAAAA
```

Or give the path access to a local file containing your sequence(s) in **FASTA** or in **FASTQ** format

Fájl kiválasztása Nincs fájl kiválasztva

Start Clear the form

4. ábra Az IMGT/V QUEST-tel analizálni kívánt szekvencia

Az interpretáció első lépéseként az analizált IGHV szekvencia produktivitását szükséges ellenőrizni. Amennyiben nem történt kereteltolódással járó, vagy STOP kodont eredményező mutáció, úgy a szekvencia produktívnak tekinthető (5. ábra). Ezt követően a „summary” fülről leolvashatóak az átrendeződött V, D, valamint J génszegmentumok, továbbá a szomatikus hipermutáció százalékos értéke (5. ábra).

Sequence: 1 48724

Analysed sequence length: 479.

Sequence analysis category: 2 (indel search & correction).

Sequence compared with the [Homo sapiens \(human\) IG set](#) from the [IMGT reference directory](#) (set: F+ORF+ in-frame P)

>48724

```
agggcttcctagtcctaaggctgaggaaggatcctggttagttaaaggattttat
tcaccctgtgtcctctccacaggtgtccagtcagggtcagctgggtcagctggggc
tgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtcctcgaaggctctggaggcacctt
cagcagctatgctatcagctgggtgacagggccctggacaaggcttgatggatggg
agggatcatcctatctttggtacagcaactacgcacagaagtccaaggcagagtcac
gattaccgggacgaatccacgacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctga
ggacacggcctgtattactgtgagggctatggttcggggagttattaattactacta
ctactactactacatggagctctggggcaaggaccacggtcaccgtctctcaaaaa
```

Result summary: 48724	Productive IGH rearranged sequence	(no stop codon and in-frame junction)	
V-GENE and allele	Homsap IGHV1-69*01 F. or Homsap IGHV1-69D*01 F	score = 1440	identity = 100.00% (288/288 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ6*03 F	score = 310	identity = 100.00% (62/62 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD3-10*01 F	D-REGION is in reading frame 3	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.11]	[8.8.20]	CARAMVRGVINYYYYYYMDVW
JUNCTION length (in nt) and decryption	66 nt = (8)-3(2)-6(21)-4(2)+1(32)	(3V)3(N1)5(D)3(N2)5(5J)	

5. ábra A vizsgált szekvencia adatai

4. Results of IMGT/JunctionAnalysis

Maximum number of accepted mutations in: 3'-REGION = 0, D-REGION = 2, 5'-REGION = 0
Maximum number of accepted D-GENE: 1

Analysis of the JUNCTION

D-REGION is in reading frame 3

Click on mutated (underlined) nucleotide to see the original one:

Input	V name	3'-REGION	N1	D-REGION	N2	P	5'-REGION	J name	D name	Vmut	Dmut	Jmut	Ngc	JUNCTION decryption
48724	Homsao_IGHV1-59*01_F	tggtcggg...	ggctatggttcggggagttatta....	at	t	attactactactactactactacgttggtcggg	Homsao_IGHJ6*03_F	Homsao_IGHD3-10*01_F	0	0	0	2/4	(8)-3(2)-6(21)-4(2)+1(32)

Translation of the JUNCTION

Click on mutated (underlined) amino acid to see the original one:

	104	105	106	107	108	109	110	111	111.1	111.2	111.3	112.4	112.3	112.2	112.1	112	113	114	115	116	117	118	Frame	CDR3- IMGT length	Molecular mass	pI	PhysicoChemical Descriptor
48724	C	A	R	A	H	V	R	G	V	T	H	Y	Y	Y	Y	Y	Y	H	D	V	W	W	+	20	2,853.34	8.16	CARAHNRGVIIYYYYNYDWH
	tgt	gcg	agg	gct	atg	gtt	cgg	gga	gtt	att	aat	tat	tac	tac	tac	tac	tac	atg	gac	gtc	tcg						

Be aware that some allele reference sequences may be incomplete or from cDNAs. In those cases, IMGT/JunctionAnalysis uses automatically the allele *01 for the analysis of the JUNCTION.

6. ábra A junkciót felépítő aminosavak meghatározása

A 104-es cisztein, valamint a 118-as pozícióban levő triptofán jelenlétét minden esetben ellenőrizni szükséges, tekintve, hogy hiányuk unproductive génátrendeződést vetít előre (6. ábra). A 118-as triptofán hiányában, amennyiben az aminosavat egy ún. G-X-G motívum követi eltekinthetünk a triptofán hiányától.

A sztereotíp B-sejt receptorokat az ARResT/AssignSubsets online bioinformatikai platform segítségével határoztuk meg. Az előzőekben taglaltakhoz hasonlóan, a teljes szekvenciát FASTA formátumban szükséges megadni (7. ábra).

7. ábra Az ARResT/AssignSubsets-el analizálni kívánt szekvencia

ARResT/AssignSubsets

assigning new members to existing subsets of stereotyped antigen receptor sequences

we're running ARResT/AssignSubsets - please follow our progress below...

(?) monitoring the resources used (your quota: 300 sec and 1000 megabytes RAM)
 (?) checking IMGT accessibility
 (?) running ARResT/SeqCure with your sequences...
 (=) [ARResT/SeqCure report](#)
 (?) model is running...

(=) 1 / 1 / 1 were assigned / 'healthy' / submitted

DISCLAIMER - there is no guarantee that ARResT/AssignSubsets will be able to properly assign all your sequences to subsets, please bear this in mind when making decisions, especially important ones on e.g. clinical care, and especially with 'borderline'- or 'low'-confidence assignments. To help us improve ARResT/AssignSubsets, please [contact us](#).

[plain-text-formatted results table](#) (best viewable in a spreadsheet), or see below [click to open/close quick help »](#)

assignment frequencies table

CLL#2	CLL#1	CLL#4	CLL#6	CLL#5	CLL#3	CLL#8	CLL#31	CLL#16	CLL#77
2.8%	2.4%	1.0%	0.9%	0.7%	0.6%	0.5%	0.4%	0.3%	0.3%
1									
CLL#7H	CLL#28A	CLL#201	CLL#12	CLL#59	CLL#14	CLL#64B	CLL#99	CLL#202	
0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	

assignment report table

label [+ heat map, if appl.]	SeqCure	subset	confidence	score
48724	OK	CLL#5	extreme	62.14

8. ábra ArResT/AssignSubsets elemzés végeredménye

Az elemzés eredménye a pirossal bekeretezett négyzetben látható, ami jelen esetben az 5-ös típusú subset (8. ábra). Amennyiben nem sikerült a vizsgált szekvenciát subsetbe sorolni, úgy a subset neve helyett az „unassigned” felirat olvasható.

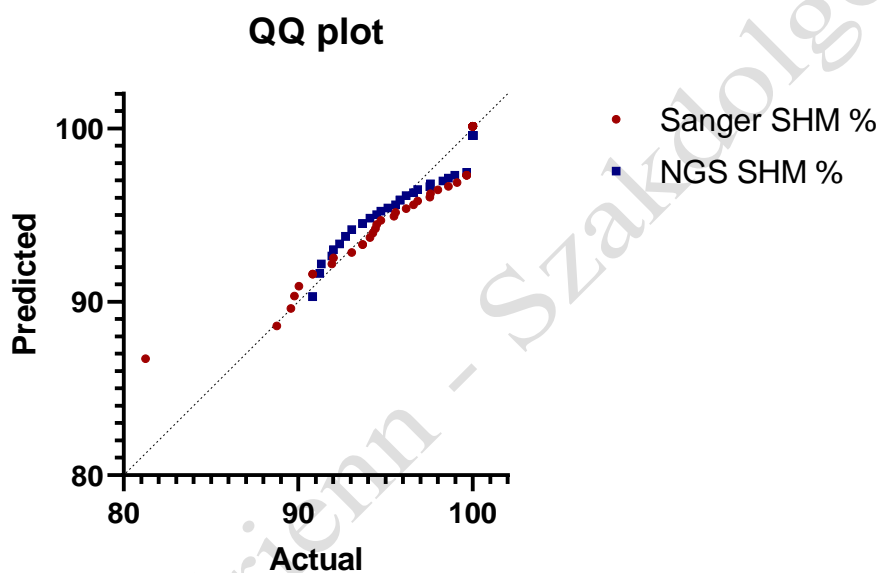
4.5 Statisztika

A minták Gauss-i eloszlását/normalitását a D'Agostino és Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesztekkel vizsgáltuk. A kategorikus változók esetében Fischer-féle egzakt tesztet alkalmaztunk. A szomatikus hipermutáció százalékos értékeit Spearman féle korrelációval, valamint lineáris regresszióval vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatok során kapott p-értékeket 0,05 alatti érték esetén fogadtuk el szignifikánsnak.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 Normalitási eloszlás vizsgálata

Eredményeink alapján a konvencionális Sanger szekvenálás, valamint az NGS alapú IGHV szomatikus hipermutációs ráták nem követték a Gauss-i féle eloszlást (Anderson-Darling teszt Sanger, NGS $P < 0,0001$; D'Agostino & Pearson, Sanger $P = 0,0002$, NGS $P = 0,0006$; Shapiro-Wilk teszt, Sanger, NGS $< 0,0001$; Kolmogorow-Smirnov Sanger, NGS $P < 0,0001$) (9. ábra).

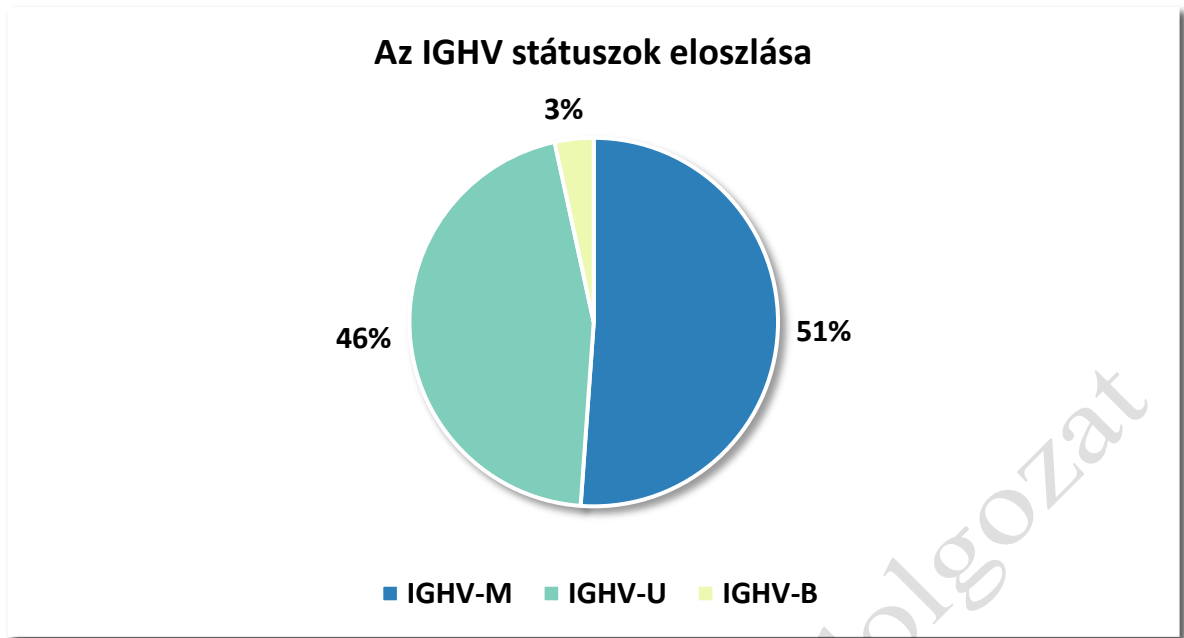


9. ábra A két módszer normalitás vizsgálata QQ plottal

5.2 NGS vizsgálat során nyert IGHV adatok

5.2.1 IGHV státusz meghatározás

Az NGS adatokat figyelembe véve 94 beteget vizsgálva az esetek 51%-ában (45/94) a kedvezőbb prognózissal rendelkező mutált, 46%-ában (40/94) az agresszívabb kimenetelű mutálatlan, 3%-ában (3/94) pedig a borderline csoport volt megfigyelhető (10. ábra).



10. ábra Az IGHV státuszok eloszlása

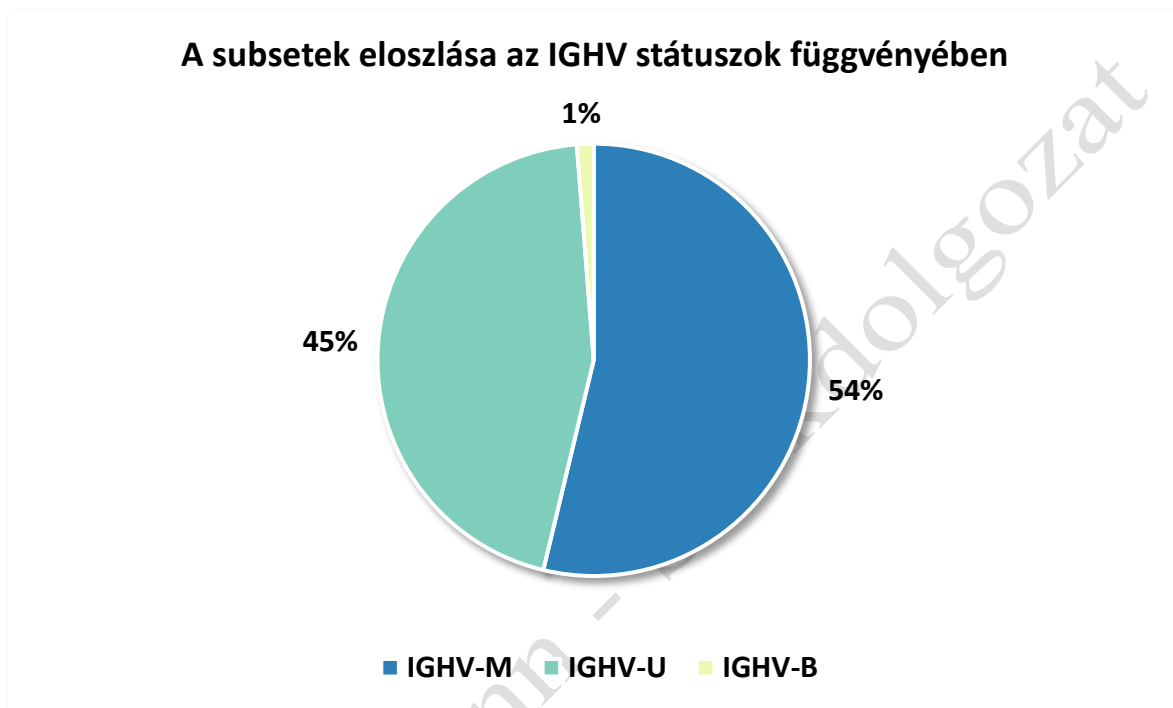
Az IGHV-géneken detektált átrendeződéseket az 6. táblázatban tüntettük fel.

Átrendeződött IGHV-gén	db	M	U	B	Subsetek száma	Subset típus
IGHV4-59	5 (6%)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	1 (12,5%)	CLL77
IGHV4-30	3 (3%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV4-34	6 (7%)	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	0 (0%)	
IGHV5-10	2 (2%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-48	1 (1%)	1(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV1-18	5 (6%)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	0 (0%)	
IGHV3-7	5 (6%)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-33	3 (3%)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-23	6 (7%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-15	5 (6%)	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-20	1 (1%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV4-31	1 (1%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV1-69	10 (11%)	1 (10%)	9 (90%)	0 (0%)	3 (37,5%)	CLL3, CLL5, CLL59
IGHV1-3	2 (2%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (12,5%)	CLL1
IGHV3-66	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-30	6 (7%)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)	1 (12,5%)	CLL202
IGHV2-5	3 (3%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV4-39	4 (4%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-53	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-11	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV5-51	2 (2%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-13	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-49	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV1-8	2 (2%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-21	3 (3%)	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	1 (12,5%)	CLL2
IGHV1-2	2 (2%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	1 (12,5%)	CLL5
IGHV4-61	2 (2%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV1-46	2 (2%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV3-72	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
IGHV2-26	1 (1%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

6. táblázat IGHV-géneken detektált átrendeződések, illetve az SHM státusszal és subset alcsoportokkal lévő kapcsolata

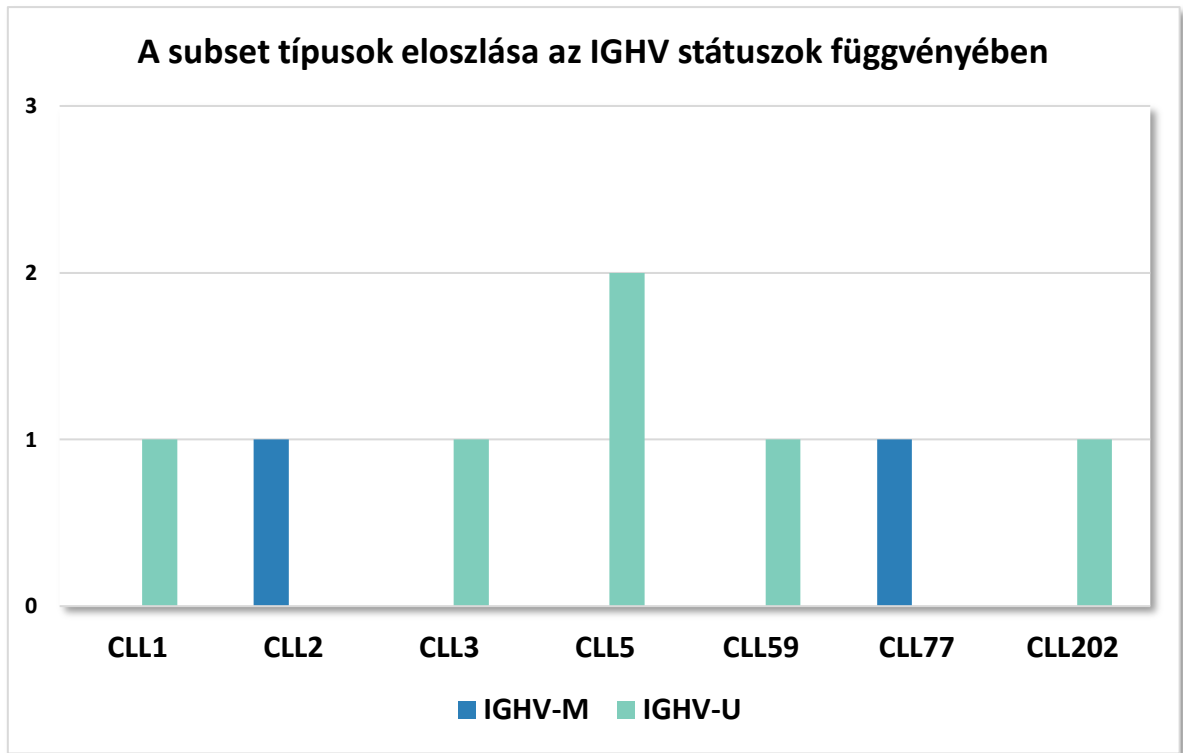
5.2.2 Subsetek eloszlásának meghatározása

Az IGHV-B/borderline csoportból 1 esetben sikerült a subset meghatározás. Ezzel szemben a mutálatlan csoport esetén 36 esetben, a mutált csoport esetén pedig 43 esetben sikerült meghatározni a subsetet. A 11. ábrán is látható, hogy a mutált csoportba társultak leggyakrabban a subsetek.



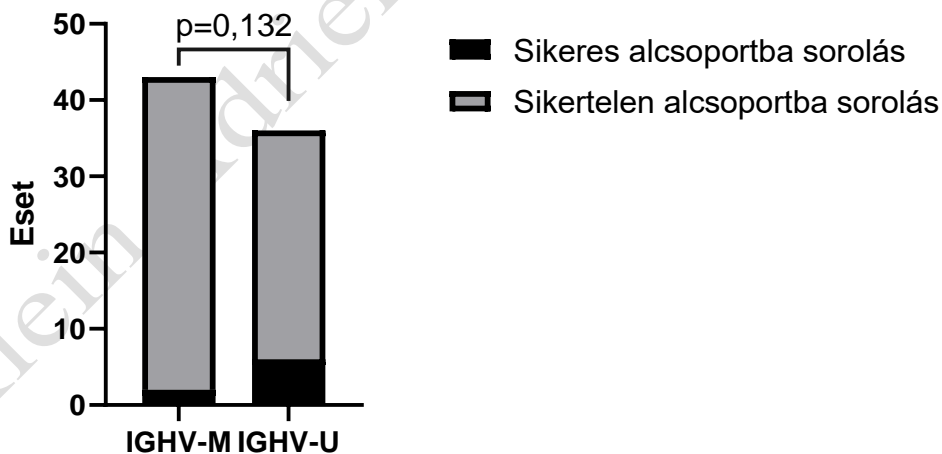
11. ábra A subsetek eloszlása az IGHV státuszok függvényében

Az IGHV-M csoport esetén kétféle subsetet sikerült meghatározni, ez a két subset a CLL2-nek, illetve CLL77-nek minősült, melyek az irodalmi adatok alapján kedvezőtlen, illetve indolens prognózissal társíthatóak. Az IGHV-U csoport esetén öt különböző subset típust sikerült meghatározni, melyek a következők: CLL1, CLL3, CLL5, CLL59 és CLL202. Az irodalmi adatok alapján ezek közül a CLL1, CLL3 és CLL5 az melyekre az agresszívabb lefolyású betegség jellemző, míg a CLL59-et az indolens betegség lefolyás jellemzi inkább. A subset típusok eloszlását az IGHV státuszok függvényében a 12. ábrán tüntettük fel.



12. ábra A subset típusok eloszlása az IGHV státuszok függvényében

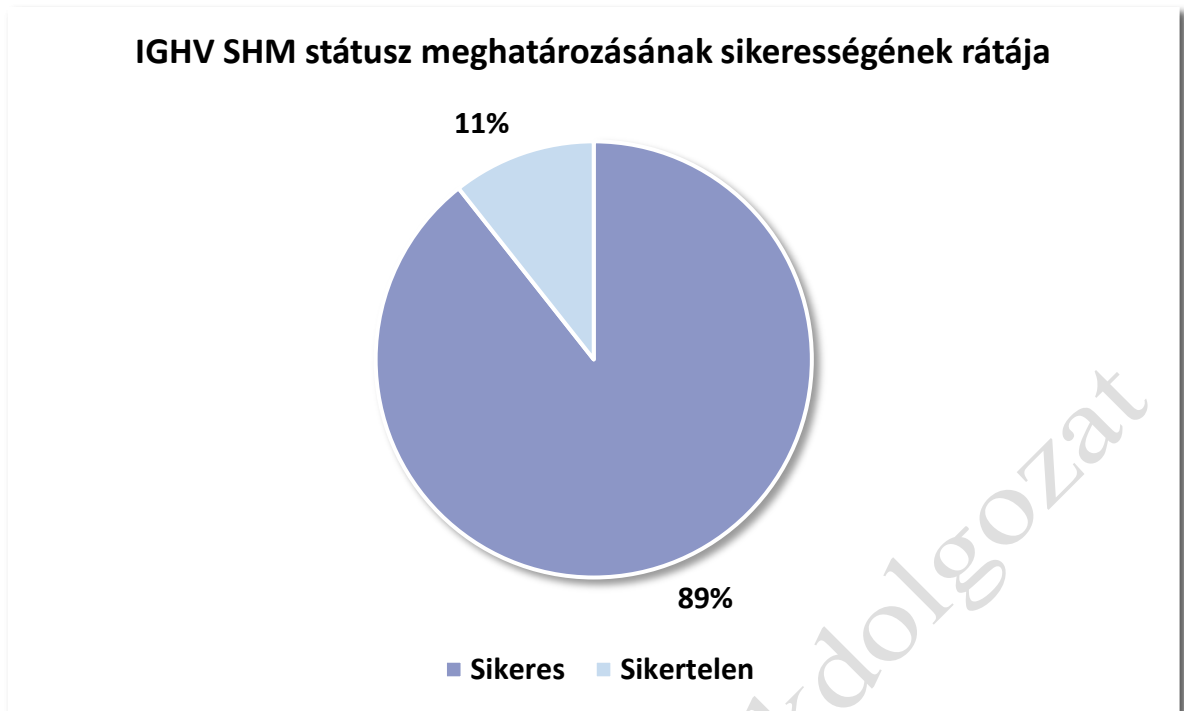
A produktív szekvenciák figyelembevételével az esetek 9%-ában (8/94) sikerült subsetet kimutatnunk. A subsetek meghatározásának sikeressége az egyes IGHV státuszokon belül nem volt szignifikáns ($p=0,312$) (13. ábra).



13. ábra A subset eloszlás vizsgálata az IGHV státusz függvényében Fisher egzakt teszttel

5.2.3 NGS futások sikerességének meghatározása

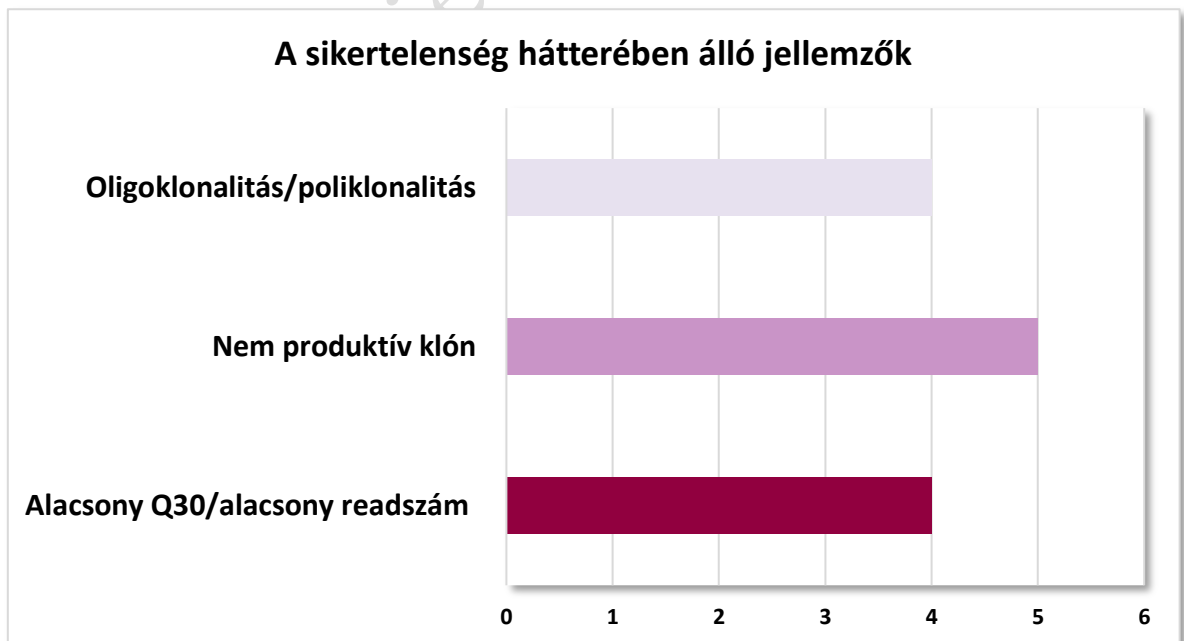
A 94 esetből csak 10 esetben nem sikerült meghatározni NGS-el az IGHV SHM státuszt. Ugyanakkor az esetek felében, habár a klónt sikerült meghatározni, de annak az improduktivitása miatt nem sikerült a státuszt meghatározni (14. ábra).



14. ábra Az NGS-el történő IGHV SHM státusz meghatározásának sikerességi rátája

5.2.4 A nem meghatározható SHM státusz okai

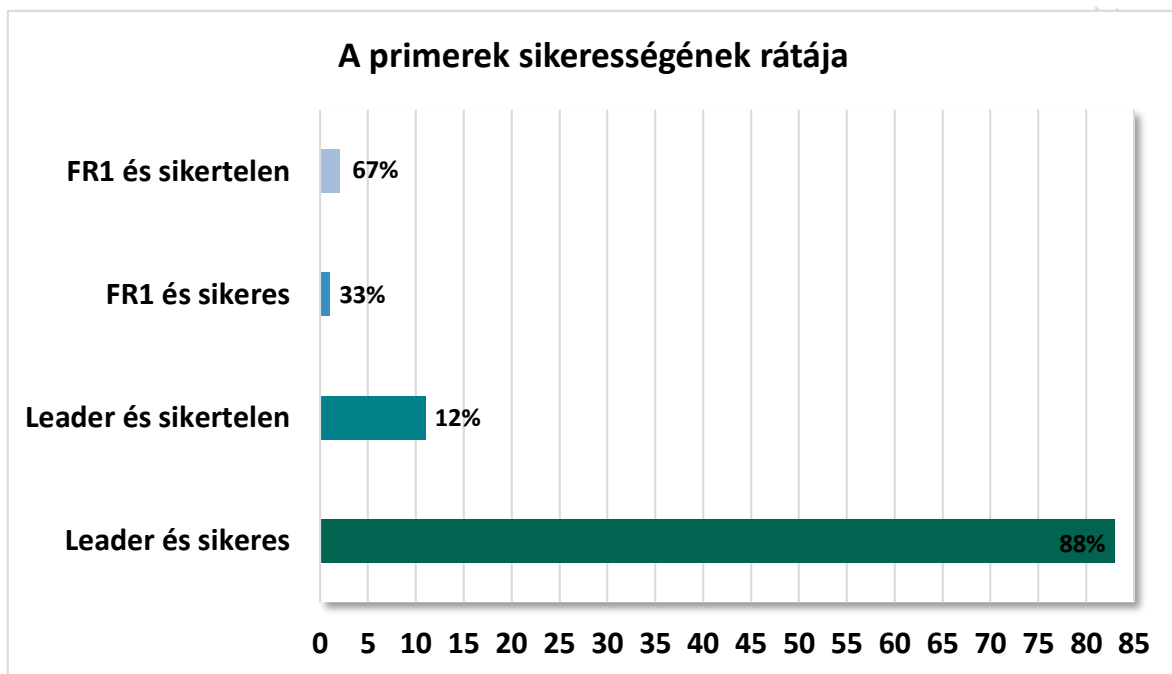
A sikertelenség hátterében 31%-ban (4/13) az alacsony Q30-as érték, illetve alacsony readszám, további 31%-ban (4/13) az oligo-, illetve poliklonalitás és 38%-ban (5/13) pedig produktív klón hiánya állt (15. ábra).



15. ábra A sikertelenség hátterében álló jellemzők

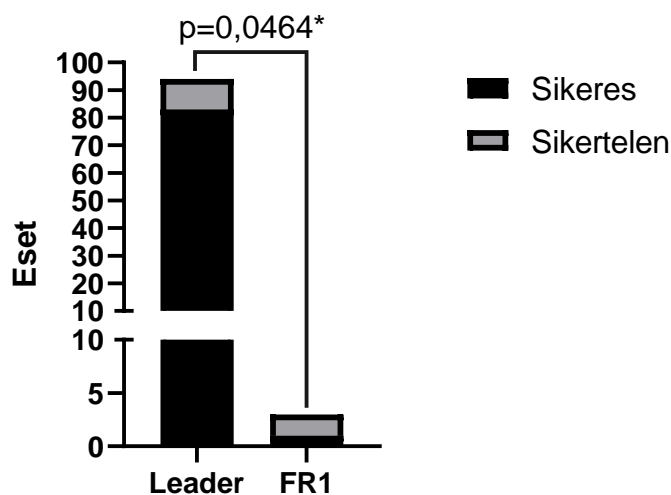
5.2.5 Primerek összehasonlítása

Méréseink során 97%-ban (94/97) használtunk leader primert és mindösszesen 3%-ban (3/97) FR1 primert az NGS alapú vizsgálatok elvégzéséhez. A 97 eset 88%-ában (83/94) volt sikeres az IGHV státusz meghatározása leader primerrel, 12%-ában (11/94) sikertelen, míg FR1 primerrel 33%-ában (1/3) volt szintén sikeres és 67%-ában (2/3) sikertelen (16. ábra).



16. ábra A primerek sikerességének rátája NGS adatokra nézve

Tapasztalataink alapján elmondhatjuk, hogy leader primer alkalmazásával szignifikánsan gyakrabban sikerül a SHM státusz meghatározása, mint FR1 primer használatával ($P=0,0464^*$) (17. ábra). Az alacsony szintű szignifikanciára potenciálisan magyarázatot adhat az FR1 primerrel történt mérések alacsony száma. A jelenséget továbbá az is magyarázza, hogy az FR1 primerrel kizárólag abban az esetben végeztünk vizsgálatot, amennyiben a leader primer alkalmazásával nem sikerült eredményt elérnünk, ezáltal az eredmény önmagában félrevezető lehet.

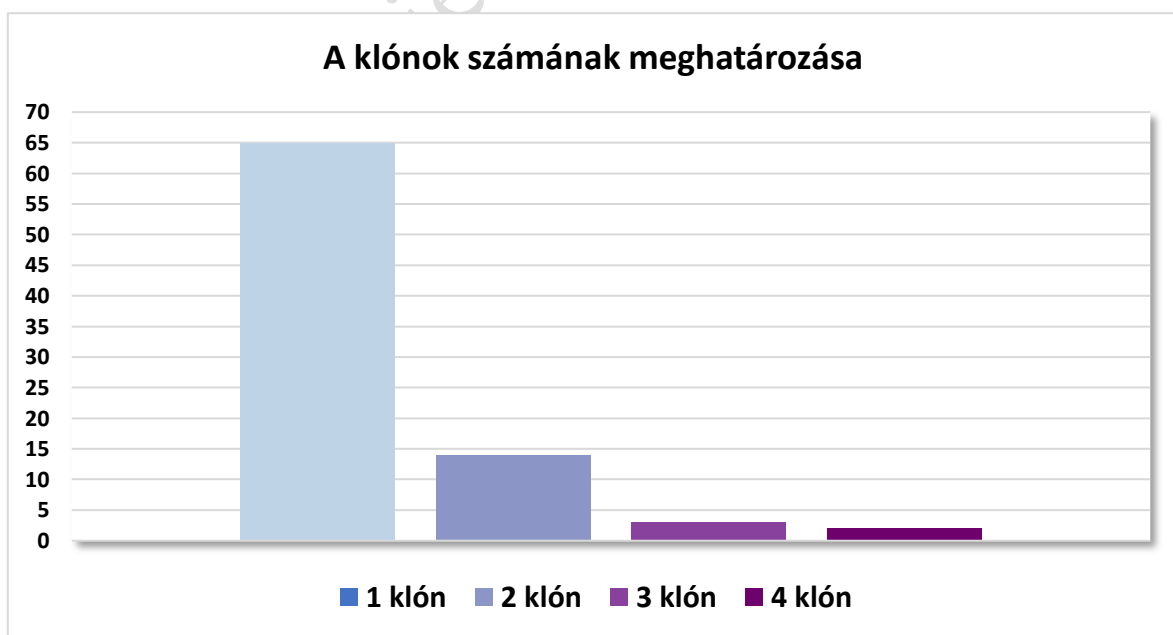


17. ábra Az NGS módszer során alkalmazott primerek sikerességének vizsgálata Fisher egzakt teszttel

5.2.6 A klónok számának meghatározása

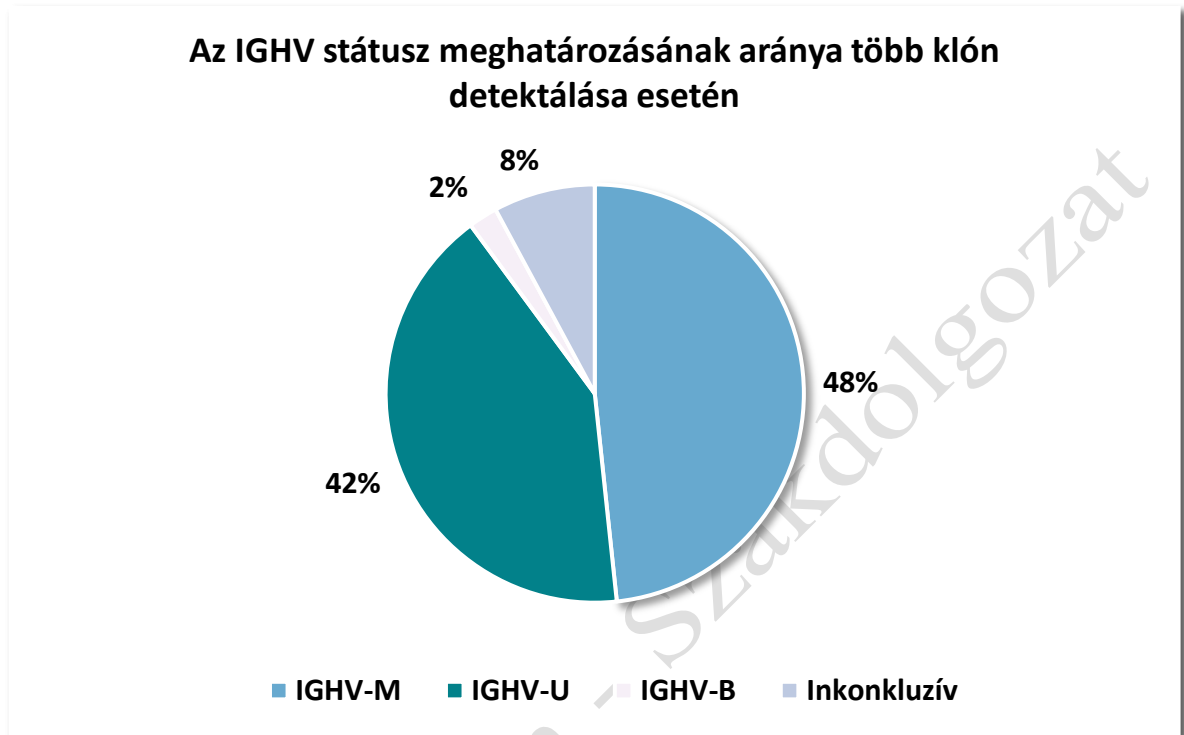
Összesen 84 esetben sikerült produktív klónt/klónokat meghatározni, amely az összes esetszám 89%-át (84/94) jelenti. A maradék 11%-ba azon minták tartoznak melyek esetében az 5.1.4-es fejezetben taglaltak miatt nem sikerült az SHM státusz meghatározása.

Az esetek döntő többségében, azaz 77%-ában (65/84) csak egy klónt, 17%-ában (14/84) 2 klónt, 4%-ában (3/84) 3 klónt és 2%-ában (2/84) 4 klónt sikerült meghatározni (18. ábra).



18. ábra A klónok számának meghatározása NGS alapú adatok szerint

Összesen 84 esetben sikerült produktív klónt meghatározni. Több produktív klón esetében az IGHV státusz meghatározása az aktuális szakirodalmi ajánlásoknak megfelelően történt (n=12). Az összes minta 48%-át IGHV-M, 42%-át IGHV-U, 2%-át IGHV-B, 8%-át pedig inkonkluzív csoportba soroltuk be (19. ábra).

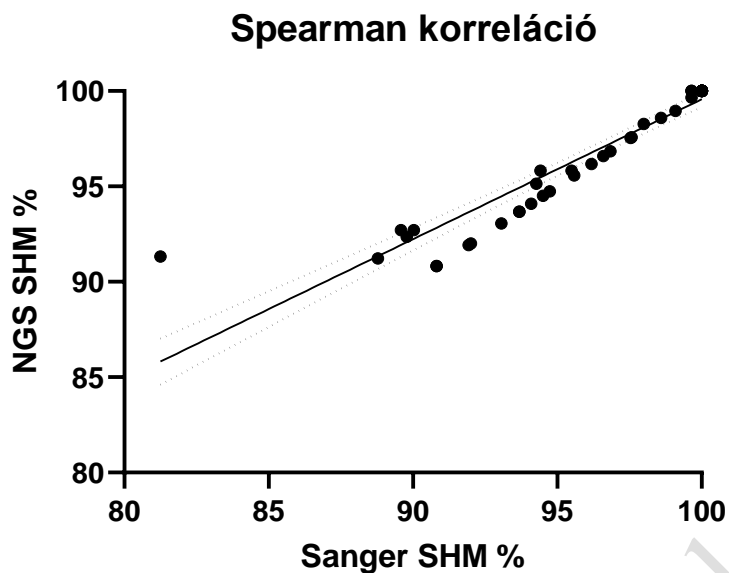


19. ábra Az IGHV státusz meghatározásának aránya több klón detektálása esetén

5.3 A két módszer összehasonlítása

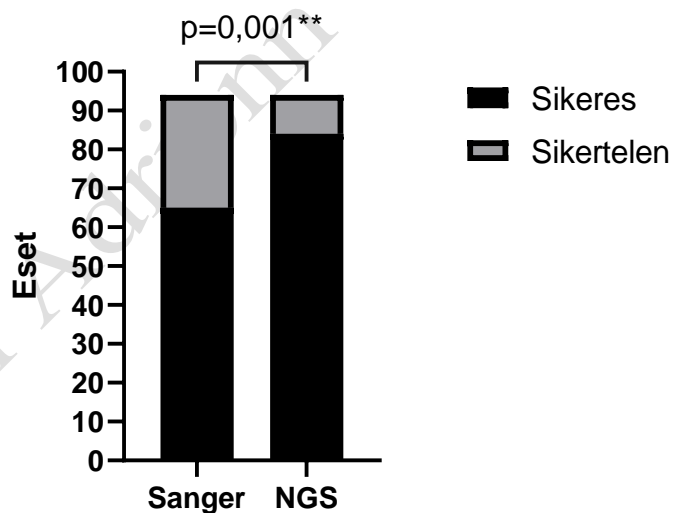
A betegek 66%-ának esetében (62/94) sikerült mindkét módszerrel meghatározni az IGHV szomatikus hipermutációs státuszt. Az esetek 2%-ában (2/94) csak Sanger szekvenálással, 23%-ában (22/94) pedig csak NGS alkalmazásával sikerült az IGHV státusz meghatározása. Az összes mintát tekintve csupán 9%-a (11/94) esetén nem sikerült az IGHV SHM státusz meghatározása.

A szomatikus hipermutációs értékek összehasonlításánál azokat az eseteket vettük alapul, ahol az NGS vizsgálat alapján csupán egy, a Sanger szekvenálás során azonosított klónnal megegyező átrendeződést találtunk (n=50). A két módszer összehasonlításához Spearman-féle korrelációt és lineáris regressziót alkalmaztunk. Az eredményeink alapján a két módszer erőteljes pozitív korrelációt mutat ($r=0,9793$, $P<0,0001$) (20. ábra).



20. ábra A két módszer szomatikus hipermutációs státuszának vizsgálata Spearman korrelációval

A konvencionális Sanger szekvenálás alapú, valamint az NGS-alapú IGHV SHM státusz meghatározásának sikerességét Fischer-féle egzakt teszttel hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján az NGS alapú SHM meghatározás szignifikánsan gyakrabban sikerül, mint ugyanazon minta esetében Sanger szekvenálás alapú eljárással ($p=0,001$) (21. ábra).



21. ábra A két módszer sikerességének vizsgálata Fisher egzakt teszttel

6. Összefoglalás

Vizsgálataink során egyik fő célunk volt összehasonlítani a konvencionális, multiplex PCR-alapú Sanger szekvenálást az NGS-alapú módszerrel. Kísérleti eredményeink alátámasztották, hogy a Sanger szekvenálás során kapott eredmények jelentősen korrelálnak az NGS-el végzett IGHV SHM státusz meghatározása során kapott eredményekkel.

Az IGHV SHM státusz, mint kulcsfontosságú biomarker vizsgálatát standard kezelési módszerként végzik. Ez elsődlegesen a hagyományos, multiplex PCR-alapú Sanger szekvenálással történik, ami azonban munka-, és időigényes módszernek bizonyul. Ezzel szemben az újgenerációs szekvenálás nemréggi megjelenése következtében többek között lehetővé vált a különböző klónok átrendeződéseinek vizsgálata, és ezáltal a konvencionális eljárásokkal kihívást jelentő esetekben is potenciálisan meghatározható a SHM státusz. Eredményeink során azt tapasztaltuk, hogy az NGS-alapú vizsgálat szignifikánsan gyakrabban hoz eredményt a Sanger szekvenálással összehasonlítva, ezáltal megbízhatóbb alternatívát jelent. Mindemellett, elsősorban nagy mennyiségű mintaszám esetén jelentősen felgyorsítja, és gördülékenyebbé teszi a munkafolyamatot, tekintve, hogy az esetek döntő többségében elégséges a „Leader” primer használata, és nem szükséges a folyamatot megismételni „FR1” primer segítségével. Mindennek hatására a gyorsabb munkafolyamat mellett, a vizsgálható régió hossza is megnövekedik, hozzájárulva a pontosabb SHM státusz meghatározásához.

Főbb megállapításunk, hogy az NGS-alapú IGHV analízis egy gyorsabb, hatásosabb és pontosabb alternatívát jelent a konvencionális szekvenálással szemben. Tudomásunk szerint hazánkban először Intézetünkben végeztük az IGHV NGS alapú meghatározását, amely mára a rutindiagnosztikai paletta részeként elérhetővé vált az ország valamennyi hematológiai centruma számára.

7. Irodalmi hivatkozások

- Aczél, D., Mátrai, Z., Kiss, R., Balogh, A., Illés, S., Bödör, C., & Alpár, D. (2019). Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában. *Hematológia–Transzfuziológia*, *52*(2), 136–148. <https://doi.org/10.1556/2068.2019.52.2.8>
- Agathangelidis, A., Chatzidimitriou, A., Chatzikonstantinou, T., Tresoldi, C., Davis, Z., Giudicelli, V., Kossida, S., Belessi, C., Rosenquist, R., Ghia, P., Langerak, A. W., Davi, F., & Stamatopoulos, K. (2022). Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia*, *36*(8), 1961–1968. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01604-2>
- Bewicke-Copley, F., Arjun Kumar, E., Palladino, G., Korfi, K., & Wang, J. (2019). Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *17*, 1348–1359. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.10.004>
- Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *16*(11), 684–701. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0239-8>
- Bystry, V., Agathangelidis, A., Bikos, V., Sutton, L. A., Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Stamatopoulos, K., & Darzentas, N. (2015). ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics*, *31*(23), 3844–3846. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv456>
- Cheng, S., Ma, J., Guo, A., Lu, P., Leonard, J. P., Coleman, M., Liu, M., Buggy, J. J., Furman, R. R., & Wang, Y. L. (2014). BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*, *28*(3), 649–657. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.358>
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–1847.
- Davi, F., Langerak, A. W., de Septenville, A. L., Kolijn, P. M., Hengeveld, P. J., Chatzidimitriou, A., Bonfiglio, S., Sutton, L.-A., Rosenquist, R., Ghia, P., & Stamatopoulos, K. (2020). Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia in the era of next generation sequencing. *Leukemia*, *34*(10), 2545–2551. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0923-9>
- Dighiero, G. (2003). Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, *17*(12), 2385–2391. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403154>
- Dighiero, G., & Hamblin, T. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, *371*(9617), 1017–1029. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60456-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60456-0)
- Ghiotto, F., Fais, F., Valetto, A., Albesiano, E., Hashimoto, S., Dono, M., Ikematsu, H., Allen, S. L., Kolitz, J., Rai, K. R., Nardini, M., Tramontano, A., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (2004). Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, *113*(7), 1008–1016. <https://doi.org/10.1172/JCI19399>

- Gupta, S. K., Viswanatha, D. S., & Patel, K. P. (2020). Evaluation of Somatic Hypermutation Status in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) in the Era of Next Generation Sequencing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00357>
- Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, 90(5), 446–460. <https://doi.org/10.1002/ajh.23979>
- Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology*, 94(11), 1266–1287. <https://doi.org/10.1002/ajh.25595>
- Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679–1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1848–1854.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Kikushige, Y. (2020). Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 60(4), 146–158. <https://doi.org/10.3960/jslrt.20036>
- Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(4), 1410–1416.
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., ... Wu, C. J. (2013). Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*, 152(4), 714–726. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.019>
- Langerak, A. W., Davi, F., Ghia, P., Hadzidimitriou, A., Murray, F., Potter, K. N., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K., & Belessi, C. (2011). Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia*, 25(6), 979–984. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.49>
- Lasica, M., & Anderson, M. A. (2021). Review of Venetoclax in CLL, AML and Multiple Myeloma. *Journal of Personalized Medicine*, 11(6), 463. <https://doi.org/10.3390/jpm11060463>

- László, T., Kotmayer, L., Alpár, D., & Bődör, C. (2021). Venetoclax-rezisztencia krónikus lymphocytás leukémiában. *Hematológia–Transzfuziológia*, 54(3), 143–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1556/2068.2021.54.3.4>
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Ljungström, V., & Baliakas, P. (2021). Prognostic and Predictive Implications of Cytogenetics and Genomics. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(4), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.04.002>
- Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D., Sutton, L. A., Soussi, T., Zenz, T., Kater, A. P., Niemann, C. U., Gonzalez, D., Davi, F., Gonzalez Diaz, M., Moreno, C., Gaidano, G., Stamatopoulos, K., Rosenquist, R., Stilgenbauer, S., Ghia, P., & Pospisilova, S. (2018). ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*, 32(5), 1070–1080. <https://doi.org/10.1038/s41375-017-0007-7>
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Martín-García, D., Beà, S., Salaverria, I., Oldreive, C., Aymerich, M., Suárez-Cisneros, H., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., López-Guillermo, A., González, M., ... Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127(17), 2122–2130. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-659144>
- Nagy, Á., Andrikovics, H., Kajtár, B., Ujfalusi, A., László, Z., Kotmayer, L., Csabán, D., Bors, A., Makkos-Weisz, A., Kapitány, E., Sulák, A., & Bődör, C. (2021). Az IGHV-mutációs státusz vizsgálata a Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság Molekuláris Diagnosztika Munkacsoportjának laboratóriumaiban. *Hematológia–Transzfuziológia*, 54(2), 75–80. <https://doi.org/10.1556/2068.2021.54.2.3>
- Packard, T. A., & Cambier, J. C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Reports*, 5. <https://doi.org/10.12703/P5-40>
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., López-Guerra, M., Colomer, D., Tubío, J. M. C., López, C., Navarro, A., Tornador, C., ... Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature10113>
- Raponi, S., Ilari, C., della Starza, I., Cappelli, L. v., Cafforio, L., Piciocchi, A., Arena, V., Mariglia, P., Mauro, F. R., Gentile, M., Cutrona, G., Moia, R., Favini, C., Morabito, F., Rossi, D., Gaidano, G., Guarini, A., del Giudice, I., & Foà, R. (2020). Redefining the prognostic likelihood of chronic lymphocytic leukaemia patients with borderline percentage of immunoglobulin variable heavy chain region mutations. *British Journal of Haematology*, 189(5), 853–859. <https://doi.org/10.1111/bjh.16434>
- Rossi, D., Spina, V., Cerri, M., Rasi, S., Deambrogi, C., de Paoli, L., Laurenti, L., Maffei, R., Forconi, F., Bertoni, F., Zucca, E., Agostinelli, C., Cabras, A., Lucioni, M., Martini, M., Magni, M., Deaglio, S., Ladetto, M., Nomdedeu, J. F., ... Gaidano, G. (2009). Stereotyped B-Cell Receptor Is an Independent Risk Factor of Chronic Lymphocytic Leukemia Transformation to Richter

Syndrome. *Clinical Cancer Research*, 15(13), 4415–4422. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3266>

Shahjahani, M., Mohammadiasl, J., Noroozi, F., Seghatoleslami, M., Shahrabi, S., Saba, F., & Saki, N. (2015). Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cellular Oncology*, 38(2), 93–109. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0215-3>

Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R., & Ghia, P. (2017). Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 31(2), 282–291. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.322>

Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q. L., Shefler, E., ... Wu, C. J. (2011). SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365(26), 2497–2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109016>

Klein Adrienn - Szakdolgozat

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek: Dr. Kovács Mónikának, Dr. Bödör Csabának és Dr. László Tamásnak!

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Mónikának az egyetemi tanulmányaim során átadott tudásért!

Továbbá, köszönetet szeretnék mondani Dr. Bödör Csabának, amiért biztosította számomra a lehetőséget, hogy szakdolgozatomat a Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet keretein belül készíthessem el, segítette témaválasztásomat és az elkészítés folyamata során bármely felmerülő problémára segített megoldást találni.

Külön köszönettel tartozom még Dr. László Tamásnak, amiért végig kísért a szakdolgozat írás nehézségein és végtelen türelemmel segítette munkámat szakmai tudásával. Ezen felül kiszélesítette látókörömet nemcsak a témával, hanem az Intézetben végzett kutatómunkák fontos szerepével kapcsolatban is.

Klein Adrienn - Szakdolgozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Klein Adrienn
A Hallgató Neptun kódja: VCGFBY
A dolgozat címe: Az IGHV szomatikus hipermutációs státuszának meghatározása újgenerációs szekvenálással krónikus limfocitás leukémiában
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Élelmiszer-mikrobiológia, -higiéncia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozáttal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023 év 05 hó 03 nap


Hallgató aláírása

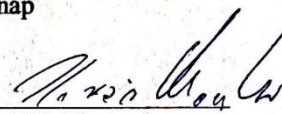
KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A Klein Adrienn (hallgató Neptun azonosítója: VCGFBY) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfólió¹ áttekinttem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2023 év 05 hó 03 nap


Belső konzulens