

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Alkalmazott biotechnológia modul

Élelmiszer-mikrobiológia, -higiéna és -biztonság Tanszék



Szakedolgozat összefoglaló

Klein Adrienn

Az IGHV szomatikus hipermutációs státuszának meghatározása újgenerációs szekvenálással
krónikus limfocitás leukémiában

Bevezetés: A nyugati országokban a krónikus limfocitás leukémia (CLL) a felnőttkori hematológiai malignitások leggyakrabban előforduló típusa. A betegség lassan fejlődik, akár évekig tünetmentes lefolyással társulhat. Elsősorban az idősebb korosztályt érinti, ezen belül is leginkább a férfiakra jellemző. A diagnosztizált betegek átlag életkora 70 év.

A CLL-t heterogén klinikai lefolyás jellemez, mely összefüggésbe hozható az immunglobulin nehézlánc variábilis (IGHV) régiójának szomatikus hipermutációs (SHM) státuszával. A mutált IGHV státuszt kedvezőbb betegséglefolyás jellemzi, míg ezzel szemben a mutálatlan státuszt kedvezőtlenebb, agresszívabb betegséglefolyás jellemez. Az IGHV SHM státuszának meghatározása során a csírvonalbeli immunglobulin-nehézláncgénhez hasonlítják az adott minta szekvenciáját, és az eredményül kapott hasonlóság %-os értéke alapján sorolható az adott beteget mutált, mutálatlan vagy borderline csoportba.

Célkitűzés: Szakdolgozatom készítésének célja egy újgenerációs-szekvenáláson alapuló IGHV mutációs analízis felállítása és összehasonlítása a jelenleg széles körben elterjedt konvencionális multiplex PCR-alapú Sanger szekvenálással. Mindemellett célul tűztük ki egy úgynevezett „real-world” magyarországi betegkohort feltérképezését, és az IGHV SHM státusz eloszlásának meghatározását a vizsgált betegkohorton belül. Ezenfelül célunk volt a komplex klonális átrendeződésekkel rendelkező esetek előfordulási gyakoriságának feltérképezése is.

Módszer: Vizsgálatunk során a „European Research Initiative on CLL” konzorcium által megszabott guidelineoknak megfelelően Sanger szekvenálással határoztuk meg az IGHV SHM státuszt. Ezt követően minden esetben megismételtük a vizsgálatot a LymphoTrack SHM Assay (Invivoscribe, San Diego, USA) újgenerációs-szekvenálási assay alkalmazásával. Az eredményeinket a GraphPad Prism statisztikai szoftver segítségével hasonlítottuk össze.

Eredmények: Eredményeink alapján az NGS alapú szomatikus-hipermutációs státusz meghatározása hatékonyabb, mint a konvencionális Sanger szekvenálási módszer, elsősorban a komplex IGH-átrendeződésekkel rendelkező esetekben. A kísérleti eredményeink alátámasztották, hogy amennyiben mindkét módszerrel sikerül az IGHV státusz meghatározása, a Sanger szekvenálás során kapott százalékos eredmények jelentősen korrelálnak az újgenerációs szekvenálással (NGS) végzett IGHV SHM státusz meghatározása során kapott eredményekkel.

Összefoglalás: Az IGHV SHM státusz, mely egy elengedhetetlen prognosztikai és egyben prediktív biomarker is, vizsgálatát standard kezelési módszerként végzik. Ezt elsősorban a hagyományos, multiplex PCR-alapú Sanger szekvenálással végzik, ami azonban nem csak munka-, hanem időigényes módszernek is bizonyul. Ezzel szemben az újgenerációs szekvenálás nemrégiben történő megjelenése következtében a konvencionális eljárásokkal kihívást jelentő esetekben is potenciálisan meghatározható az IGHV SHM státusz.

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, megbízható és hatékony alternatívát jelenthet a konvencionális technológiákkal szemben.

Eredményeink során azt tapasztaltuk, hogy az NGS-alapú módszer/vizsgálat egy megbízhatóbb alternatívája lehet a konvencionális Sanger szekvenálásnak, mivel szignifikánsan gyakrabban hoz eredményt.

Mindemellett felgyorsítja és gördülékenyebbé teszi a munkafolyamatot nagy mennyiségű mintaszám esetén is, mivel az esetek túlnyomó többségében elegendő a „Leader” primer használata, és nem szükséges megismételni a szekvenálást „FR1” primerrel.

Ezáltal nem csak a munkafolyamat gyorsul fel, hanem megnő a vizsgálható régiók hossza is, melynek köszönhetően pontosabb SHM státusz meghatározás válik lehetségessé.

Összefoglalva, az NGS-alapú analízis egy gyorsabb, hatásosabb és pontosabb alternatívát jelent a hagyományos Sanger szekvenálással szemben.