

Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai

KIRÁLY PÉTER ATTILA, ALPÁR DONÁT, FÉSÜS VIKTÓRIA, MAROSVÁRI DÓRA, MATOLCSY ANDRÁS, BÖDÖR CSABA

MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Bődör Csaba, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26.
Tel.: 0036-1-215-7300/54462,
e-mail: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2015. december 20.

Elfogadva:

2016. február 15.

A különböző onkohematológiai megbetegedések genetikai hátteréről való ismereteink bővülésének és az új célzott terápiák megjelenésének köszönhetően a molekuláris genetikai eljárások mára egyre fontosabb szerepet töltenek be az onkohematológiai betegségek diagnosztikájában és követésében. A DNS- és RNS-vizsgálatokon alapuló, *in situ* hibridizációs, polimeráz láncreakciós és szekvenálási eljárások a különböző entitások diagnosztikájában, klaszifikációjában és prognosztikai besorolásában, valamint a minimális reziduális betegség követésében és a megfelelő célzott terápia kiválasztásában is kiemelt szereppel bírnak. A jelen összefoglaló az onkohematológiai diagnosztikában alkalmazott molekuláris módszerek alapjait és alkalmazási területeit tekinti át. Magyar Onkológia 60:88-98, 2016

Kulcsszavak: onkohematológia, molekuláris diagnosztika, MRD-monitorozás, célzott terápia

Owing to our rapidly expanding knowledge on the genetic background of various oncohematologic diseases and the introduction of novel targeted therapies, molecular genetic techniques have been playing an increasingly important role in the diagnostics and follow-up of hematological malignancies. The various DNA- and RNA-based in situ hybridization, polymerase chain reaction and sequencing technologies are of key significance in diagnostics, classification and prognostic assessment of these diseases, as well as in the monitoring of minimal residual disease and selection of the most appropriate targeted therapy. This review provides an overview on the background and applications of the molecular methods most commonly used in oncohematological diagnostics.

Király PA, Alpár D, Fésüs V, Marosvári D, Matolcsy A, Bődör C. Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology. Hungarian Oncology 60:88-98, 2016

Keywords: oncohematology, molecular diagnostics, MRD monitoring, targeted therapy

BEVEZETÉS

A technológiai fejlődés elmúlt évtizedekben való felgyorsulásának köszönhetően számos onkohematológiai megbetegedés genetikai hátterét ismertük meg, ami a különböző célzott terápiás megközelítések megjelenésével párhuzamosan a molekuláris diagnosztikai eljárások előtérbe kerülését eredményezte. A limfómák és leukémiák mai napig tartó, egyre alaposabb nukleinsavszerű karakterizálása molekuláris alapokon nyugvó klasszifikációk, mutációalapú prognosztikus rendszerek és a célzott terápiák hatékonyságát molekuláris szinten monitorozó és előrejelző eljárások kidolgozásához vezetett. Napjainkra a DNS- és RNS-szerű molekuláris genetikai módszerek az onkohematológiai kórképek diagnosztikus algoritmusának szerves részét képezik, és egyre fontosabb szereppel bírnak bizonyos célzott terápiák indikálásában is (1).

A molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzéséhez natív, fagyasztott vagy formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetminták állnak rendelkezésre, melyeken a sejtalapú *in situ* molekuláris vizsgálatok mellett, nukleinsav-kivonás után nagy érzékenységű molekuláris genetikai tesztek is végezhetők. Az onkohematológiában leggyakrabban perifériás vér, csontvelő-aspirátum vagy nyirokcsomó-biopsziás minták kerülnek feldolgozásra, de a megfelelő eljárás alkalmazásával DNS vagy RNS kivonható gyakorlatilag bármilyen natív szövetmintából. Az FFPE minták esetében a fixálás kapcsán a DNS- és RNS-molekulák fragmentálódnak, ami miatt a molekuláris vizsgálat elvégzése egyes esetekben nehézségekbe ütközhet. A nukleinsav-kivonási eljárások fejlődésének köszönhetően azonban a PCR-vizsgálatok ma már az FFPE minták nagy részében is sikeresen elvégezhetőek. Fontos szempont továbbá a nukleinsavak stabilitásának kérdése is. Míg a DNS akár szobahőmérsékleten is stabil, az RNS instabil makromolekula, így az RNS-alapú vizsgálatok sikeres elvégzéséhez kulcsfontosságú a vizsgálati anyagoknak a mintavételt követő 24 órán belüli feldolgozása.

AZ ONKOHEMATOLÓGIAI DIAGNOSZTIKÁBAN ALKALMAZOTT MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

A FISH a molekuláris citogenetika onkohematológiai diagnosztikában leggyakrabban használt sejtalapú módszere. Az eljárás során a minta (interfázisos sejtmag vagy kromoszómapreparátum) általunk vizsgálni kívánt nukleinsavszakaszához denaturációt követően azzal komplementer, ugyanakkor fluoreszcens festékkel jelölt, így láthatóvá tehető szekvenciát (szonda) kapcsolnak, mely FISH-szignálként azonosítható (2). A módszert a diagnosztikában leggyakrabban DNS-eltérések kimutatására használják, melyhez teljes kromoszómákat, kromoszómakarokat, pericentromérikus régiókat vagy rövid specifikus genomikus szakaszokat (lókusz) jelölnek meg és vizsgálnak, általában fluoreszcens mikroszkóp alatt. A FISH előnye a konvencionális citogenetikával (kariotipizálás) szemben, hogy alapvetően nem igényel sejttenyésztést, bár mely citológiai vagy hisztológiai preparátumon elvégezhető,

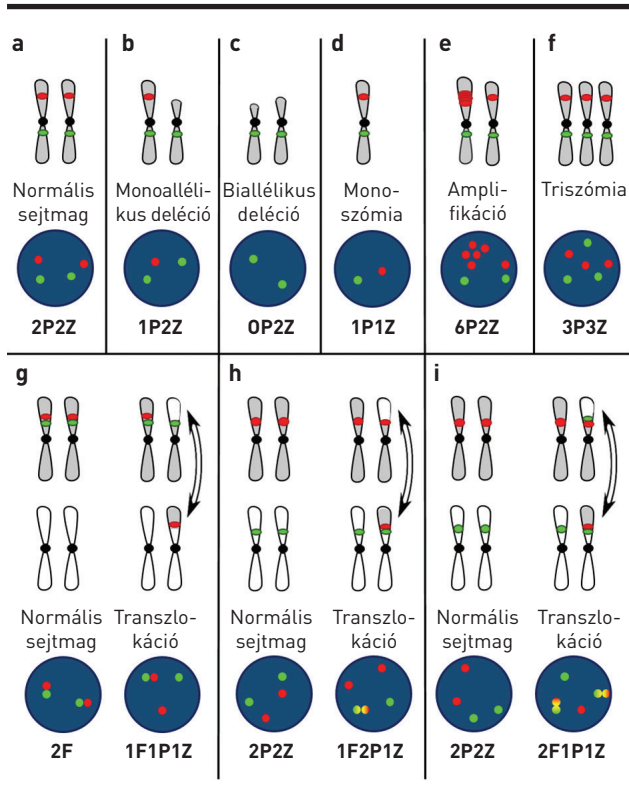
a kariotipizálás számára rejtett aberrációk kimutatására is alkalmas, valamint megfelelő preparálási technika és műszeres felkészültség mellett a nyert genetikai adatok morfológiai, fenotípusos, illetve topográfiai paraméterekkel is társíthatók, egyedi sejtek szintjén (3). Ebből következően a módszer a genetikai eltérések sejtszintű kimutatásán túl alkalmas genetikai heterogenitás feltérképezésére, sőt sejtvonal-specifikus információkkal való társításra is.

Az interfázisban lévő sejtek magjaiban végzett FISH (iFISH) adekvát módszer mind mennyiségi (deléciók, amplifikációk, teljeskromoszóma-nyerések), mind szerkezeti (transzlokációk, inverziók) kromoszómaeltérések kimutatására. Az iFISH-preparátumok értékelése mikromorfológiai vizsgálatnak tekinthető, a hibridizált sejtmagokban megjelenő fluoreszcens jelek száma és/vagy elrendeződése alapján következtet az értékelő egy adott genetikai aberráció meglétére vagy hiányára. Mennyiségi abnormalitások esetében a normális jelszámtól (diploid sejtek vizsgálatakor ez leggyakrabban kettő) eltérő mennyiségű iFISH-szignál mutatkozik. Szomatikus kromoszómarégiókat, illetve nőknél X kromoszómát vizsgálva, normális sejtmagokban két iFISH-jel található, míg egy, illetve nulla szignál mono-, illetve biallélikus vesztést jelez. Három vagy több FISH-jel a vizsgált DNS-szakasz nyerésére-sokszorozódására utal. Mennyiségi genetikai eltéréseknél egy, a vizsgált géntől távol elhelyezkedő, ugyanazon kromoszómához hibridizáló kontroll szonda segíthet a megfigyelt jelmintázat pontos értelmezésében (1. ábra). Transzlokációk és inverziók vizsgálatakor a szignálok számán túl azok térbeli elrendeződése is fontos információt hordoz. Az úgynevezett „disszociációs” szondák használatakor a normális esetben közvetlenül egymás mellett elhelyezkedő, különböző színű jelek szétválása utal abnormalitásra, míg a „füziós” szonda stratégiák a normálisan egymástól távol elhelyezkedő, eltérő színű jelek egyesülésével (füzió) jeleznek pozitívítást (1. ábra).

Az onkohematológiai diagnosztika során a beteganyagok vizsgálata legtöbbször 200 sejtmag értékelését foglalja magában. Betegek nyomon követése szempontjából fontos a diagnosztikus mintaanalíziskor meghatározni az adott betegségre jellemző iFISH-mintázatot, melyet addicionális eltérések tovább módosíthatnak (pl. transzlokációk töréspontja melletti intersticiális deléció elvesztéshez vezethet). Ezen atípusos pozitív jelmintázatok álpozitivitása eltérhet a típusos mintázatokétól, melyre reziduális betegség vizsgálatakor különös figyelmet kell fordítani. Az atípusos iFISH-mintázatok ugyanakkor értékes többletinformációt is szolgáltathatnak a betegségek klonális evolúciós folyamatairól (4), mely példa jól szemlélteti, hogy bár célzott vizsgálatról van szó, a módszer nem csak eldöntendő (igen-nem) kérdésekre ad választ.

Polimeráz láncreakció (PCR) és annak típusai

Az egyre modernebb technológiák megjelenésének ellenére, a vizsgálat gyorsasága és alacsony mintaigénye miatt a DNS- és RNS-szerű molekuláris eljárások döntő többsége napja-



1. ÁBRA. Kiegyensúlyozatlan kromoszómaaberrációk (b-f) és kiegyensúlyozott transzlokációk (g-i) által előidézett leggyakoribb iFISH-mintázatok. (a) Mennyiségi eltéréseket vizsgálva, normális diploid sejtmagokban legtöbbször 2-2 szignál jelzi a vizsgált és a kontroll DNS-szakasz érintettségét. (b) Monoallélikus deléció. (c) Biallélikus deléció. (d) Monoszómia. (e) Amplifikáció. (f) Triszómia. Transzlokációk iFISH technikával történő detektálásának gyakorlati lehetőségei: (g) Diszociációs szonda kombináció használatakor a piros és a zöld szondák a transzlokációban részt vevő két kromoszóma egyikén, a törésponti régió két oldalán elhelyezkedő szakaszokkal hibridizálnak. A szignálok térbeli eltávolodása a jelölt kromoszóma törésére, átrendeződésben való érintettségére utal. Ez a szondatípus főleg azon gének vizsgálatára hasznos, melyek sok különböző transzlokációs partner génnel fuzionálhatnak (pl. MLL gén). (h) A fúziós extraszignális szondakombináció alkalmazásakor a piros és zöld színű szondák a transzlokáció eredményeképpen egymás mellé kerülő régiókkal hibridizálnak. A transzlokációban részt vevő egyik kromoszóma töréspontját átfedi a szonda, így a fúziós (gyakran sárga) szignál mellett egy kisebb méretű extraszignál is keletkezik, melynek figyelembevételével a random jelkollokalizáció okozta álpozitivitás 1-2%-ra csökkenthető. (i) Dupla fúziós szondakombináció esetén az átrendeződésben részt vevő mindkét kromoszóma törésponti régiót átfedő szondával van jelölve. A transzlokáció eredményeképpen két fúziós szignál jelenik meg a sejtmagban a folyamatban részt nem vett allélokat jelző piros és zöld jelek mellett, mely az álpozitivitást 1% alá szorítja. A kék körök a sejtmagokat, a bennük lévő kisebb piros és zöld körök pedig az iFISH-szignálokat szimbolizálják. Legalul az adott szondákra jellemző, tipikus jelmintázatok láthatóak, többszörös átrendeződés esetén azonban ettől eltérő mintázatok is előfordulhatnak. F, P, Z: fúziós, piros és zöld jelek száma

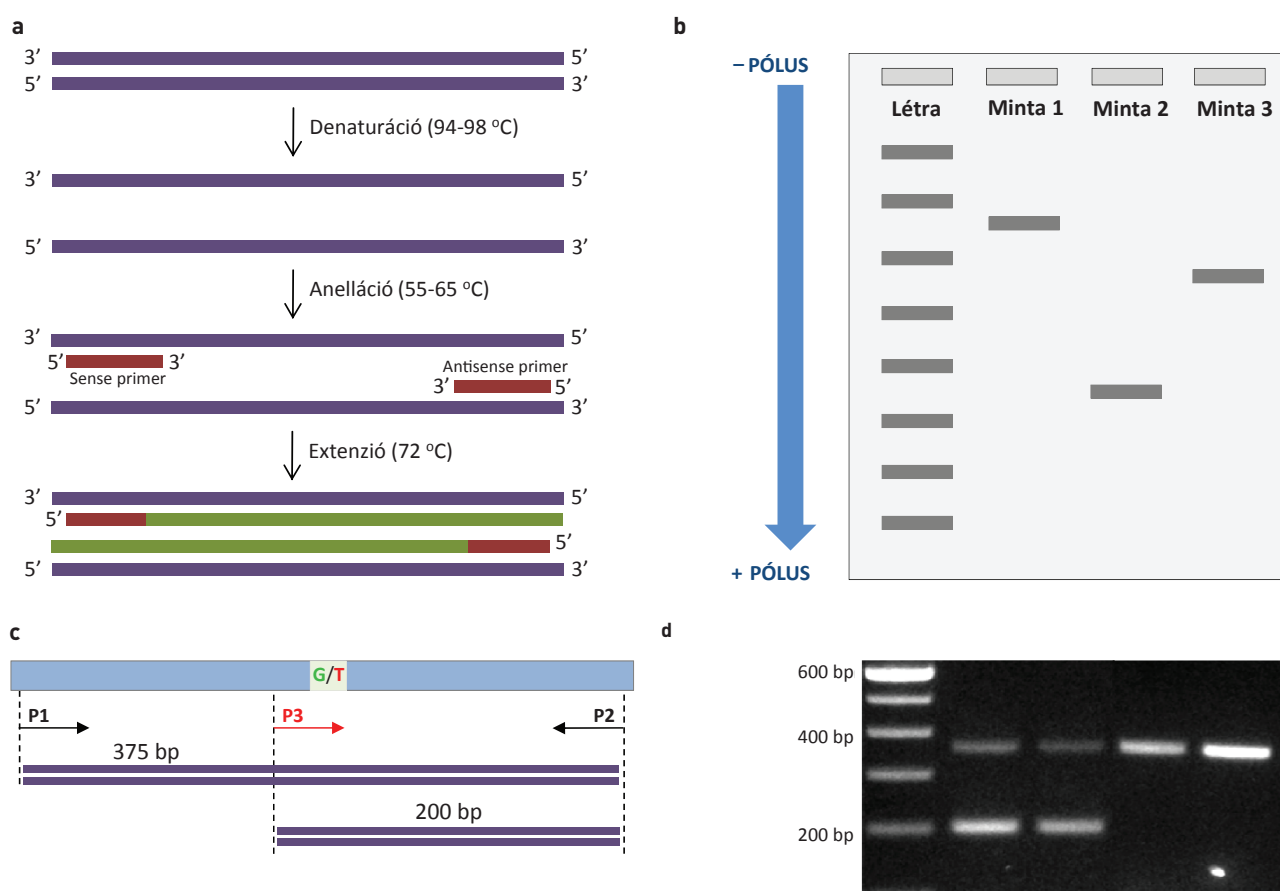
inkban is a polimeráz láncreakció (PCR) módszerén alapul, amellyel megfelelő mennyiségű kiindulási minta esetén akár 10^{-4} – 10^{-6} érzékenység is elérhető. A PCR-alapú vizsgálatokkal a genomot érintő szerkezeti eltérések, pontmutációk és

génexpressziós változások egyaránt vizsgálhatóak. Előbbiek vizsgálata DNS-szinten, míg az utóbbi változások vizsgálata RNS-szinten történik.

A PCR tetszőleges génszakaszok *in vitro* felsokszorozására alkalmas módszer, amit a nyolcvanas évek elején dolgoztak ki. A kiválasztott DNS-szakasz specificitását az adott régiót határoló szekvenciákkal komplementer oligonukleotidok, ún. primerek biztosítják, amelyek 15–25 bázispár hosszúságú szintetikus DNS-molekulák. A PCR az alábbi három szakaszra osztható, amelyek 25–40 ciklus formájában ismétlődnek: denaturáció, anelláció és extenzió (2.a ábra). A denaturáció során a DNS $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ közelébe történő hevítésével a két komplementer DNS-szál elválik egymástól, az anelláció során a bázispárosodás szabályainak megfelelően a primerek a megfelelő régiókhoz kötődnek, míg az extenzió során a Taq DNS-polimeráz lánchosszabbítást végez, felépítve a primerek közötti komplementer DNS-szakaszokat. Mivel a folyamat ciklikusan ismétlődik, az elkészült DNS-molekulák mennyisége exponenciálisan növekszik, és végeredményben az eredeti példányszám akár százmilliószorosában van jelen.

A PCR-termékek azonosítása leggyakrabban méret alapján történik, elektroforetikus elválasztást követően. A hagyományos gélelektroforézis során a termék DNS-molekulák negatív töltésüknek megfelelően, elektromos erőter hatására a pozitív pólus felé vándorolnak, és a gél térszerkezetének köszönhetően méretük szerint elválasztódnak (2.b ábra). A PCR-termékek vizualizálására festékmolekulák (fluorokrómok) egész sora áll rendelkezésre. A kapillárislektroforézis esetében az elválasztás egy vékony kapillárisba töltött speciális gél (polimer) felhasználásával történik, ami lényegesen finomabb, akár 1 bázispárnnyi felbontást is lehetővé tesz.

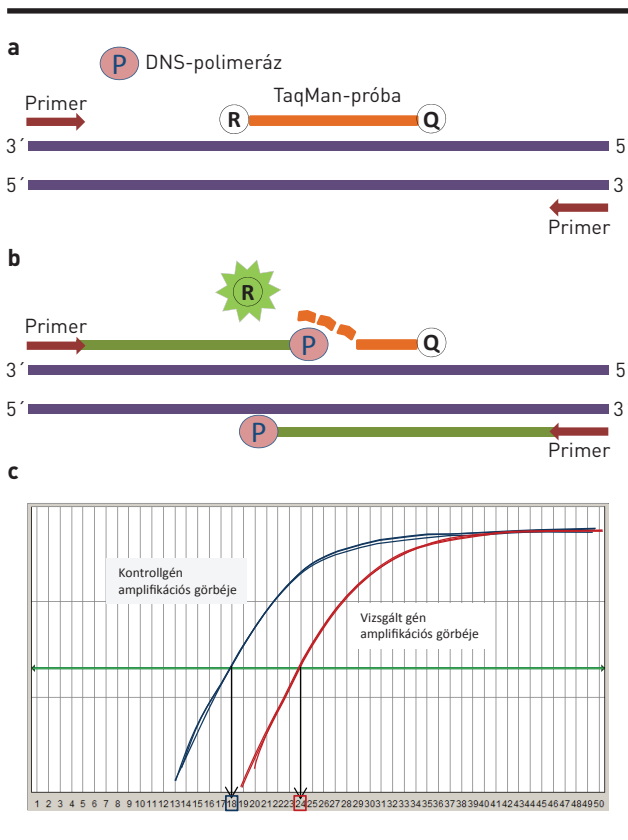
A PCR-technika különböző típusainak köszönhetően az eljárás alkalmas különböző szerkezeti eltérések (inszerciók, deléciók, génátrendeződések, transzlokációk), de akár egyetlen nukleotidot érintő pontmutációk kimutatására is. Sőt, az RNS-alapú PCR-eljárásokkal génexpressziós mérések is kivitelezhetőek. A PCR egyik típusa az ún. multiplex PCR, amely esetében a reakcióelegy kettőnél több (3–20) primert tartalmaz, ami több genetikai variáns vagy genomikus lókuszt szimultán vizsgálatát vagy alternatív töréspontok analizését teszi lehetővé. A multiplex PCR egyik legismertebb alkalmazási területe a később ismertetésre kerülő limfoid klonalitás kimutatása, a T- vagy B-sejt antigénreceptor génátrendeződések vizsgálata. Az allélspecifikus PCR egy bázist érintő szerkezeti változások kimutatására is alkalmas vizsgálati eljárás. A genetikai variáció kimutatására a külső primerpár (2.c ábra, P1, P2) mellett egy, a variáns allélra specifikus primer (P3) alkalmazásával nyílik lehetőség. A külső primerpárral a vizsgált génszakasz a vad típusú és a variánst hordozó mintában egyaránt amplifikálódik, ugyanakkor a 3' végén a variációra specifikus primer esetében csak a variánst hordozó mintában történik amplifikáció. Ennek megfelelően a vad típusú mintában egyféle termék, míg a variánst heterozigóta formában hordozó mintában kétféle termék detektálható (2.d ábra).



2. ÁBRA. A polimeráz láncreakció [PCR] és a hagyományos gélelektroforézis sematikus ábrázolása. (a) A PCR folyamata három lépésre osztható. 1. A denaturáció során (94-98 °C-os hőmérséklet) a DNS két szála elválik egymástól. 2. Az anelláció során (55-65 °C) a „sense” és „antisense” primerek a báziskomplementaritás elve alapján kapcsolódnak az egyszálú DNS-molekula megfelelő szakaszaihoz. 3. Végül az extenzió fázisában (72 °C) a DNS-polimeráz a templát DNS-nek megfelelően, a primer templát kettős szakasztól indulva, 5'-3' irányban elvégzi a lánchosszabbítást, azaz új DNS-szálakat szintetizál. A három lépés 25-40 ciklus formájában ismétlődik, ami a vizsgálni kívánt DNS-szakasz exponenciális (2^n) amplifikációjához vezet. (b) A PCR-termékek elválasztásának és kimutatásának hagyományos módszere a gélelektroforézis, melynek során a DNS-molekulák elektromos erőterben, negatív töltésükből adódóan, a pozitív elektród felé vándorolnak. Eközben a gél térszerkezetének köszönhetően méretük alapján is elválasztódnak [a nagyobb méretű molekulák lassabban, a kisebbek gyorsabban haladnak a pozitív pólus felé]. A termékek méretét egy ismert hosszúságú DNS-fragmentumokat tartalmazó marker („létra”) segítségével határozzuk meg. Az allélspecifikus PCR alapelve. (c) Az egy bázist érintő genetikai variáns [pontmutáció, polimorfizmus] kimutatásához három primert használunk. A hagyományos külső primerpár (P1, P2) mellett egy belső, az adott genetikai variánusra specifikus primer is található a reakcióelegyben (P3). Ez az oligonukleotid a 3' végén a variációnak megfelelő bázist hordozza [jelen esetben egy timin (T)], ezért ez utóbbi primer jelenlétében kizárólag a variációt hordozó mintában történik amplifikáció. A külső primerpár által közrefogott régió a mutáció jelenlététől függetlenül amplifikálódik, ami a reakció kontrolljaként (amplifikációs kontroll) is szolgál. (d) Egy reprezentatív allélspecifikus PCR-vizsgálat [JAK2V617F mutáció] gélelektroforézis felvétele. Az első két minta hordozza a vizsgált mutációt, amire a kontroll termék mellett egy rövidebb, a belső primer által létrehozott termék utal. A másik két minta vad típusú, mivel csak a külső primerpár esetében történt amplifikáció.

Az ún. valós idejű mennyiségi PCR (Q-PCR) legfőképp gén-expressziós mérések kivitelezésére alkalmas módszer. Ennek során a vizsgálat RNS-ből indul ki, amiből reverz transzkripcióval ún. komplementer DNS (cDNS) készül, ami templátként szolgál a későbbi PCR-reakcióhoz. A PCR-készülékben található speciális optikai rendszernek köszönhetően lehetőség nyílik a PCR-termék ciklusonkénti, valós időben történő detektálására, ami a PCR-t követő elektroforetikus elválasztást is szükségtelenné teszi. A módszer alapját a reakcióelegyben

található fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotidok szolgáltatják (3.a és b ábrák). A reakció előrehaladtával a termék mennyiségi növekedésének megfelelően a fluoreszcens jel intenzitásának emelkedése figyelhető meg. Az a ciklusszám, melynél a jelintenzitás emelkedése kimutathatóvá válik, fordítottan arányos a vizsgált gén expressziójának mértékével (5) (3.c ábra). A Q-PCR a hagyományos génexpressziós analízis mellett a fúziós transzkriptumok mennyiségi meghatározásának is ideális módszere.

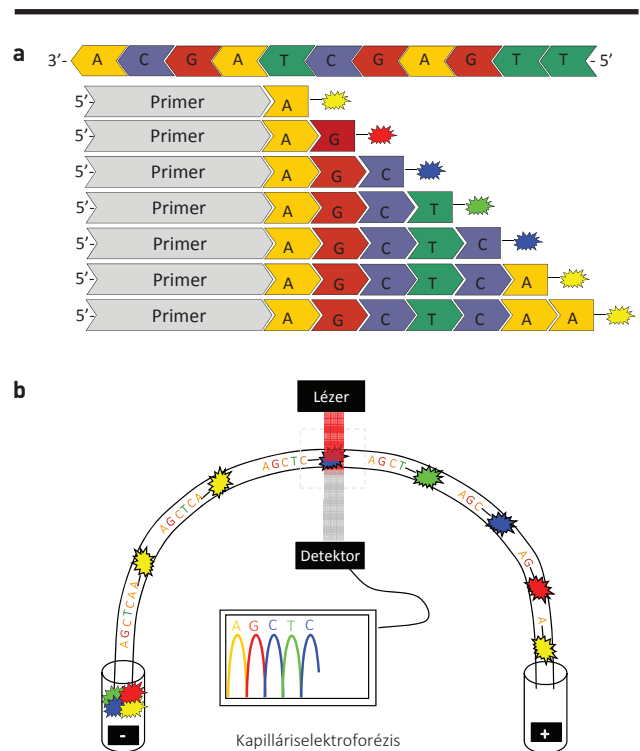


3. ÁBRA. A TaqMan-alapú valós idejű mennyiségi polimeráz láncreakció (Q-PCR) alapelve. (a) A TaqMan-próba egy speciális oligonukleotid, amely a vizsgálandó génszakasz két primerfelismerő helye közötti, 25-30 bázispár hosszúságú szakasszal komplementer. A próba 5' vége egy fluoreszcens festékekkel (reporter: R), 3' vége pedig a fluoreszcens jel elnyelésére alkalmas ún. quencher (Q) molekulával jelzett. A próba intakt állapotban az R molekula által kibocsátott fluoreszcens jelet a Q molekula kioltja. (b) A reakció előrehaladtával a DNS-polimeráz felépíti a komplementer DNS-szálakat, miközben 3'-5' exonukleáz aktivitásának köszönhetően elhasítja a TaqMan-próbát. Ennek következtében a kötött állapotból az oldatban az R molekula eltávolodik a Q molekulától, és az általa kibocsátott fluoreszcens jel felszabadul a Q molekula gátlása alól. A folyamatosan emelkedő fluoreszcens jel intenzitása arányos a vizsgált génszakasz (templát) kiindulási mennyiségével, végeredményben az adott gén expressziójának mértékével. (c) A valós idejű mennyiségi polimeráz láncreakció (Q-PCR) amplifikációs görbéinek ábrázolása. A Q-PCR vizsgálatok esetében a PCR-termék ciklusonkénti, valós időben történő detektálása valósul meg. Az ábrán a vízszintes tengelyen a PCR-ciklusok száma, míg a függőleges tengelyen a relatív fluoreszcenciaszint látható. A vizsgált gén expresszióját (piros görbe) minden esetben egy kontroll gén expressziójához (kék görbe) viszonyítjuk. Az eredmények kifejezése az ún. CT értékek („cycle threshold”) segítségével történik, ami azt a ciklusszámot jelenti, ahol a relatív fluoreszcencia eléri a meghatározott küszöbértéket (zöld horizontális vonal). A génextpresszió logaritmusos fordított arányban áll a CT értékkel. A CT értékeket felhasználva fejezhető ki az adott génnek a kontrollgénhez viszonyított expressziós szintje

Láncterminációs DNS-szekvenálás (Sanger-szekvenálás)

A különböző típusú mutációk kimutatásának közvetlen módszere a szekvenálás, amelynek során a vizsgált régió pontos bázissorrendje (szekvenciája) kerül meghatározásra.

A meghatározás DNS-ből és RNS-ből kiindulva egyaránt elvégezhető. A szekvenálás legelterjedtebb válfaja az ún. Sanger-féle láncterminációs eljárás, ami voltaképpen egy speciális PCR-reakciónak tekinthető. A módszer alapját a fluoreszcensen jelölt didezoxinukleotid-analógok szolgáltatják. E molekulákról a normális megfelelőjükhöz viszonyítva hiányzik a következő nukleotid beépüléséhez esszenciális funkciók csoport. Így egy didezoxinukleotid-analóg beépülésekor befejeződik a lánchosszabbítás, azaz lánctermináció következik be. A nagy számok törvénye alapján a megfelelő (komplementer) didezoxinukleotid-analóg beépülése valamennyi pozícióban megtörténik a lánchosszabbítás során. Így a szekvenáló reakció eredményeként a teljes mintát reprezentáló, különböző hosszúságú termékekkel rendelkezünk, amelyek végén az adott bázisnak megfelelő színű fluoreszcens



4. ÁBRA. A Sanger-féle, lánctermináció alapuló szekvenálás alapjai. (a) A módszer kulcsmolekulái a didezoxinukleotid-analógok (ddNTP), amelyekről a normális dezoxinukleotidokhoz (dNTP) képest hiányzik a következő nukleotid beépüléséhez elengedhetetlen hidroxil (OH) funkciók csoport. A reakcióelegy a normális dNTP-k mellett a bázisoknak megfelelő négyféle színű fluoreszcens indikátorokkal jelölt ddNTP-analógokat is tartalmaz. A szekvenáló reakció során a megfelelő ddNTP-k beépülése eredményeként különböző hosszúságú, a bázisoknak megfelelő, négy színű fluoreszcensen jelölt termékek is nyerünk. (b) E termékek elválasztása az 1 bp felbontóképességű kapillárelektroforézis technikával történik, amelynek során a termékek eltérő méretüknek megfelelően, különböző időben érnek a lézersugár fókuszába. Az adott fluorokrómmal kibocsátott fény hullámhossza alapján a számítógép azonosítja a terminális nukleotidokat, ami az eredmények összevetésével végeredményben az egész szekvencia leolvasását jelenti

festékkel jelzett nukleotidanalóg található. A termékek méret szerinti elválasztása kapilláriselektroforézissel történik, amely során a számítógép a termék színe alapján azonosítja a terminális nukleotidanalógot (A, T, C, G) is. Végeredményben az egyes terminális bázisok „összeolvasásával” valósul meg a szekvencia meghatározása (4. ábra).

AZ ONKOHEMATOLÓGIAI BETEGSÉGEKBE VIZSGÁLT MOLEKULÁRIS GENETIKAI ELTÉRÉSEK

A hematológiai daganatokban megfigyelhető genetikai eltérések kimutatásának jelentősége sokrétű. A klonális proliferációra utaló, amúgy fiziológias körülmények között is létező antigénreceptor-génátrendeződések mellett bizonyos aberrációk diagnosztikus értékkel bírnak, míg mások a betegség alcsoportokba való sorolásában, prognózisának meghatározásában vagy az alkalmazott célzott terápia hatékonyságának előrejelzésében játszanak szerepet (1). Érzékeny kvantitatív módszerek alkalmazásával bizonyos genetikai eltérések alkalmasak az ún. minimális reziduális betegség (MRD) és a célzott terápia hatékonyságának követésére/megítélésére. Az onkohematológiai betegségekben megfigyelhető genetikai eltérések kimutatására alkalmazott módszerek érzékenységét az 1. táblázat foglalja össze.

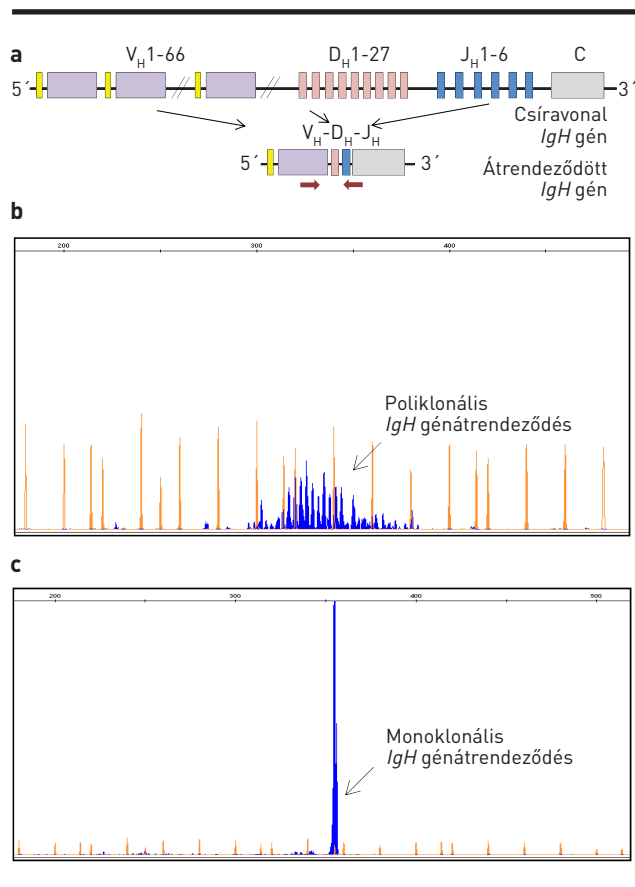
1. TÁBLÁZAT. Különböző molekuláris módszerek érzékenysége

VIZSGÁLATI MÓDSZER	ÉRZÉKENYSÉG
FISH	1-10%
Multiplex PCR	1-10%
Allélspecifikus PCR	~5%
Valós idejű mennyiségi PCR	10^{-4} - 10^{-5}
Fragmentanalízis*	~3%
Direkt (Sanger-szekvenálás)	~20%

*fluoreszcensen jelölt primerek és kapilláriselektroforézis alkalmazásával

Klonalitás meghatározása (antigénreceptor-génátrendeződések vizsgálata)

A limfoproliferatív folyamatok monoklonális, azaz tumoros, vagy poliklonális, azaz reaktív jellegűek, valamint a tumorsejtek T-, illetve B-sejtes eredetének meghatározására leginkább alkalmazott módszer az antigénreceptor-gének átrendeződéseinek vizsgálata, az ún. klonalitásanalízis. A T-sejtes daganatok esetében a T-sejt-receptor (TCR) génátrendeződés, a B-sejtes tumorok esetében pedig az immunoglobulin- (Ig) génátrendeződés nyújthat információt a folyamat klonalitásáról. A vizsgálathoz az Ig és TCR gének átrendeződésének speciális mechanizmusát használjuk fel, ami valamennyi B-, illetve T-sejt esetében mintegy molekuláris ujjlenyomatként jellemzi az adott sejtet. A normális B- és T-sejt-differenciáció



5. ÁBRA. Az immunoglobulin nehézlánc gének (IgH) átrendeződésének sematikus ábrázolása és annak PCR-vizsgálata. (a) A B-sejt-fejlődés során a V, D és J géncsaládok egy-egy tagjának kapcsolódásával alakul ki az adott B-sejtre jellemző, átrendeződött Ig gén. Figyelembe véve a gének nagy számát és egyéb, a diverzitást fokozó mechanizmusokat, valamennyi B-sejt egyedi V-D-J gének konfigurációval rendelkezhetnek. Ez adja a klonalitás meghatározásának alapját is: az adott limfoproliferatív folyamat poliklonális, amennyiben a PCR-termékek hossza (a V-D-J génszakasz) különböző; illetve monoklonális, ha a PCR-termékek hossza egyforma, mivel valamennyi tumorsejt azonos V-D-J génszekvenciát hordoz. (b) A kapilláriselektroforézis felvételen látható, hogy monoklonalitás esetében egyetlen diszkrét PCR-terméket detektálunk, míg (c) poliklonális sejtprolifерáció esetében különböző hosszúságú PCR-termékek jelennek meg

korai szakaszában a variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsoló („joining”: J) géncsaládok kiválasztott tagjainak rekombinációjával alakul ki a B-sejtekben az érett Ig, illetve a T-sejtekben a megfelelő génszakaszok rekombinációjával az átrendeződött TCR gén (5.a ábra), aminek eredményeképpen valamennyi B-, illetve T-sejtben arra jellemző egyedi génkonfiguráció alakul ki. Ez jellemző a reaktív limfoproliferatív folyamatokra is, ahol a sejtek eltérő génátrendeződést hordoznak, azaz poliklonális mintázat figyelhető meg (5.b ábra). Ezzel szemben a daganatos sejtprolifерáció esetében valamennyi tumorsejt ugyanazt a V-D-J génkonfigurációt hordozza, azaz a folyamat monoklonális, és egy adott génátrendeződés mutatható ki

a klonalitásvizsgálattal (5.c ábra). A vizsgálat DNS-ből indul ki és multiplex PCR formájában történik, amely a nagyszámú vizsgálandó génszakasz miatt reakcióelegyenként akár 10 oligonukleotidot is tartalmaz. A különböző *Ig* és *TCR* gének vizsgálatához nemzetközi ajánlások állnak rendelkezésre, melyek kidolgozásakor a különböző gének B-, illetve T-sejt-fejlődés során való átrendeződésének időrendisége, a génlókuszok genomikai komplexitása, valamint az átrendeződés stabilitása is figyelembe lett véve (6). A klonalitás meghatározásához leggyakrabban az *Ig* nehézlánc (*IgH*) és a *TCR γ* géneket vizsgáljuk.

A módszer hasznossága megkérdőjelezhetetlen, néhány tényező azonban nehezítheti az eredmények értékelését és mindenképpen óvatosságra int azok értelmezése során. Fontos megjegyezni, hogy a klonalitás kimutatása nem minden esetben jelent egyet a malignitással. Ún. pszeudoklonalitás (álpozitív eredmény) az esetek 5–7%-ában is előfordulhat, leggyakrabban bizonyos reaktív sejtproliferációk, immundeficiencia vagy vírusfertőzés kapcsán, de az életkor előrehaladtával is nő a pszeudoklonalitás kimutatásának esélye. Bár a vizsgálat mintegy 96–98%-os találati aránnyal képes azonosítani a monoklonális génátrendeződéseket a B- és T-sejtes limfoid megbetegedésekben, álnegatív esetek is előfordulhatnak az esetek 1–5%-ában. Ezek döntően ritka típusú átrendeződések, valamint a szomatikus hipermutáció következményeként jelentkeznek, amikor is az alkalmazott primerek nem alkalmasak az átrendeződésben részt vevő régiók amplifikálására (7–9). További fontos tényező az is, hogy az *Ig*- és *TCR*-átrendeződések nem feltétlenül sejtvonal-specifikusak. B-sejtes akut limfoid leukémiában (ALL) szenvedő betegek közel 70%-ában fordulhat elő *TCR*-génátrendeződés, a T-sejtes ALL-eseteknek pedig körülbelül 20%-ában mutatható ki valamely *Ig* gén klonalitása (1, 10), mely marker akár még egyes akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő betegekben is kimutatható. Az adott leukémia domináns sejtvonalára nem specifikus klonális átrendeződések (ún. „crosslineage markers”) jelenléte az adott betegség eredetére utalhat (pl. közös limfoid őssejt vagy hemopoetikus őssejt), de akár a rekombinációt irányító/végző enzimek off-target hatása, majd ezt követő szubklonális expanzió következtében is megjelenhetnek (10). Mindezek alapján a klonalitásvizsgálat egy tipikus példája az ún. „kiegészítő” vizsgálatoknak, amely eredménye informatív és segítséget nyújthat a diagnózis felállításában, azonban mindig együtt értékelendő a beteg egyéb paramétereivel és vizsgálati eredményeivel (morfológia, immunhisztokémia, áramlási citometria).

Fontos megjegyezni továbbá, hogy a fentebb ismertetett multiplex PCR-alapú klonalitásvizsgálat érzékenysége az alkalmazott primerek nagy száma miatt mindössze 1–10%, így MRD meghatározására csak igen korlátozottan használható. Az érzékeny, MRD-monitorozásra is alkalmas klonalitásvizsgálat egy bonyolultabb és idő-, valamint költségigényes eljárás. Ennek során szükséges a diagnóziskor kimutatott génátrendeződés szekvenciájának pontos meghatározása, majd ennek ismeretében az adott beteg génátrendeződésére

specifikus oligonukleotidok tervezése. Ezen allélspecifikus oligonukleotidokkal végzett Q-PCR-reakciók 10^{-4} – 10^{-6} érzékenységi szint elérését is lehetővé teszik, melyet manapság leginkább a gyermekkori akut leukémiák MRD-alapú rizikóbesorolásában hasznosítanak (11, 12).

Kromoszómaeltérések célzott szűrése

A malignus hematológiai betegségek nagy részére jellemzőek a kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan kromoszómaaberrációk. Reciprok transzlokációk és inverziók során újonnan kialakuló fúziós gének keletkezhetnek, mint például a *BCR-ABL1* kiméra CML-ben és ALL-ben vagy a *CBFB-MYH11* AML-ben, míg más esetekben intakt kódoló régióval rendelkező protoonkogének kerülhetnek egy másik gén promóterének enhancer hatása alá. Utóbbira példák az *IgH* gént érintő transzlokációk, melyek számos B-sejtes kórképben megjelennek (13). Kiegyensúlyozatlan aberrációk a tumorsejtek ploiditásának megváltozásához (pl. hiperdiploiditás plazmasejtes mielómában), tumorszuppresszor gének vesztéséhez (pl. TP53-deléció CLL-ben), haploinsufficienciához (pl. 5q- MDS-ben), vagy éppen korábban kialakult fúziós onkogének sokszorozódásához (pl. extra Philadelphia-kromoszóma CML-ben) vezethetnek. Ezen eltérések azonosítása néhány esetben diagnosztikus jelentőségű, míg máskor a genetikai szubklassifikációt vagy a prognosztikai besorolást segítik. Diagnóziskor való kimutatásuk legtöbb esetben iFISH-sel, ritkábban áramlási citometriával vagy PCR-vizsgálattal történik (2. táblázat).

Pontmutációk, kisebb inszerciók és deléciók kimutatása

A kromoszómatranszlokációk és más nagy kiterjedésű genomikai abnormalitások mellett számos onkohematológiai kórképben jelennek meg pontmutációk, melyek gyakran kapcsolatba hozhatók az adott betegség kialakulásával és/vagy progressziójával. Köszönhetően a szekvenálási technológiák fejlődésének, a legkülönbözőbb jelátviteli utakat érintő mutációk száma szinte exponenciálisan nőtt az elmúlt évtizedben, és egyre nő azon mutációk száma is, amelyek már szerves részét képezik a molekuláris diagnosztikai algoritmusoknak (3. táblázat). Kiemelt példaként említhető a mieloproliferatív neopláziák (MPN) csoportja, ahol az elmúlt tíz év felfedezéseinek köszönhetően a *JAK2*-, *CALR*-, *MPL*- és egyéb ritka mutációk képében a betegségecsoport szinte teljes genetikai hátterét megismertük, s e mutációk vizsgálata mára a mindennapi diagnosztika és entitásklasszifikáció részévé is vált (14, 15).

Az egy nukleotidot érintő szubsztitúciók és kisebb deléciók, valamint inszerciók kimutatásának közvetlen, általánosan elterjedt módszere a fentebb bemutatott Sanger-szekvenálás (4. ábra). Sanger-szekvenálást alkalmaztak a humán genom projekt során is, és a mai napig egy központi metodika az onkohematológiai diagnosztikában. Fontos megjegyezni azonban, hogy a módszer érzékenysége mindössze körülbelül 20%-os, így az adott mutációnak a tumorsejtek legalább ekkora hányadában jelen kell lennie ahhoz, hogy elkerüljük az

2. TÁBLÁZAT. Onkohematológiai megbetegedésekben leggyakrabban vizsgált kromoszómaeltérések

ENTITÁS	KROMOSZÓMAELTÉRÉS	VIZSGÁLT GENETIKAI ELTÉRÉS	JELENTŐSÉG
Krónikus mieloid leukémia (CML)	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i> génfúzió	diagnózis, célzott terápia
Hipereozinofil szindróma	del(4)(q12q12)	<i>FIP1L1-PDGFR</i> génfúzió	diagnózis
	t(v;5)(v;q31-33)	<i>PDGFRB</i> gén átrendeződése	diagnózis
Mielodiszpláziás szindróma (MDS)	-5/del(5q)	nem meghatározott	prognózis
	-7/del(7q)	nem meghatározott	prognózis
	del(20)(q12)	nem meghatározott	prognózis
Akut mieloid leukémia (AML)	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i> génfúzió	szubklasszifikáció, prognózis, célzott terápia
	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> génfúzió	szubklasszifikáció, prognózis
	t(15;17)(q22;q12)	<i>PML-RARA</i> génfúzió	szubklasszifikáció, célzott terápia
	inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i> génfúzió	szubklasszifikáció
	t(v;11)(v;q23)	<i>MLL</i> gén átrendeződése	szubklasszifikáció
	inv(3)(q21;q26)	<i>RPN1-MECOM</i> génfúzió	szubklasszifikáció, prognózis
Akut limfoid leukémia (ALL)	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i> génfúzió	szubklasszifikáció, prognózis, célzott terápia
	t(v;11)(v;q23)	<i>MLL</i> gén átrendeződése	szubklasszifikáció, prognózis
	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i> génfúzió	szubklasszifikáció, prognózis
	+X,+14,+21	hiperdiploiditás	szubklasszifikáció, prognózis
	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i> génfúzió	szubklasszifikáció
	amp(21q22)	<i>RUNX1</i> gén amplifikációja	prognózis
Krónikus limfoid leukémia (CLL)	del(17)(p13)	<i>TP53</i> gén deléciója	prognózis, célzott terápia
	del(11)(q22)	<i>ATM</i> gén deléciója	prognózis
	del(13)(q14)	<i>RB1</i> gén deléciója	prognózis
	+12	12-es kromoszóma triszómiája	prognózis
Plazmasejtes mielóma	t(v;14)(v;q32)	<i>IgH</i> gén átrendeződése	előszűrés
	t(4;14)(p16;q32)	<i>IgH-FGFR3/MMSET</i> génfúzió	prognózis
	t(11;14)(q13;q32)	<i>IgH-CCND1</i> génfúzió	prognózis
	t(14;16)(q32;q23)	<i>IgH-MAF</i> génfúzió	prognózis
	del(17)(p13)	<i>TP53</i> gén deléciója	prognózis
	-13/del(13)(q14)	<i>RB1</i> gén vesztese	prognózis
	del(1)(p32)	<i>CDKN2C</i> gén deléciója	prognózis
	amp(1)(q21)	<i>CKS1B</i> gén nyérése	prognózis
+5,+9,+15	hiperdiploiditás	prognózis	

2. TÁBLÁZAT. Onkohematológiai megbetegedésekben leggyakrabban vizsgált kromoszómaeltérések (folytatás)

ENTITÁS	KROMOSZÓMAELTÉRÉS	VIZSGÁLT GENETIKAI ELTÉRÉS	JELENTŐSÉG
MALT-limfóma	t(v;18)(v;q21)	<i>MALT1</i> gén átrendeződése	diagnózis, prognózis
Folikuláris limfóma	t(14;18)(q32;q21)	<i>IgH-BCL2</i> génfúzió	diagnózis
Köpenysejtes limfóma	t(11;14)(q13;q32)	<i>IgH-CCND1</i> génfúzió	diagnózis
Burkitt-limfóma	t(8;14)(q24;q32)	<i>IgH-CMYC</i> génfúzió	diagnózis
Anaplázias nagysejtes limfóma	t(v;2)(v;p23)	<i>ALK</i> gén átrendeződése	diagnózis, prognózis

álnegatív eredményt. Részben ebből a megfontolásból, részben az egyéb módszerek egyszerűsége és költséghatékonysága miatt a pontmutációk kimutatására több alternatív módszert is használunk a mindennapi gyakorlatban. Ide tartoznak az allélspecifikus PCR (2.c. ábra) és a fluoreszcensen jelölt primerek alkalmazásával elvégzett fragmenshossz-analízis, melyek egyszerűen kivitelezhetőek és alkalmazásukkal 3-5%-os érzékenységi szint is elérhető. Az allélspecifikus PCR előnye az egyszerű és gyors kivitelezhetőség, hátránya, hogy a mutáció pontos helyének és típusának ismerete szükséges a vizsgálathoz. E metodikával vizsgálható többek között a *JAK2V617F* mutáció MPN-ben vagy a *BRAF V600E* mutáció hajás sejt leukémiában (HCL). A kisebb deléciók és inszerciók ugyanakkor jól vizsgálhatóak fragmenshossz-analízissel, mellyel a fluo-

reszcens jelölésnek köszönhetően kapilláriselektroforézissel hosszkülönbség detektálható a vad típusú és mutáns allélek között (16). Ezzel a metodikával megbízhatóan vizsgálhatók például a *CALR*-mutációk MPN-ben (6.a ábra), vagy a normális kariotípusú AML prognózisában fontos szerepet betöltő *NPM1*- és *FLT3-ITD*-mutációk (17). Felmerül az *NPM1*- és *FLT3-ITD*-mutációk szerepe az MRD meghatározásában is, ennek kapcsán ugyanakkor fontos szem előtt tartani, hogy az ezen eltérések kimutatására jelenleg rutinszerűen alkalmazott módszerek érzékenysége mindössze 3-5%.

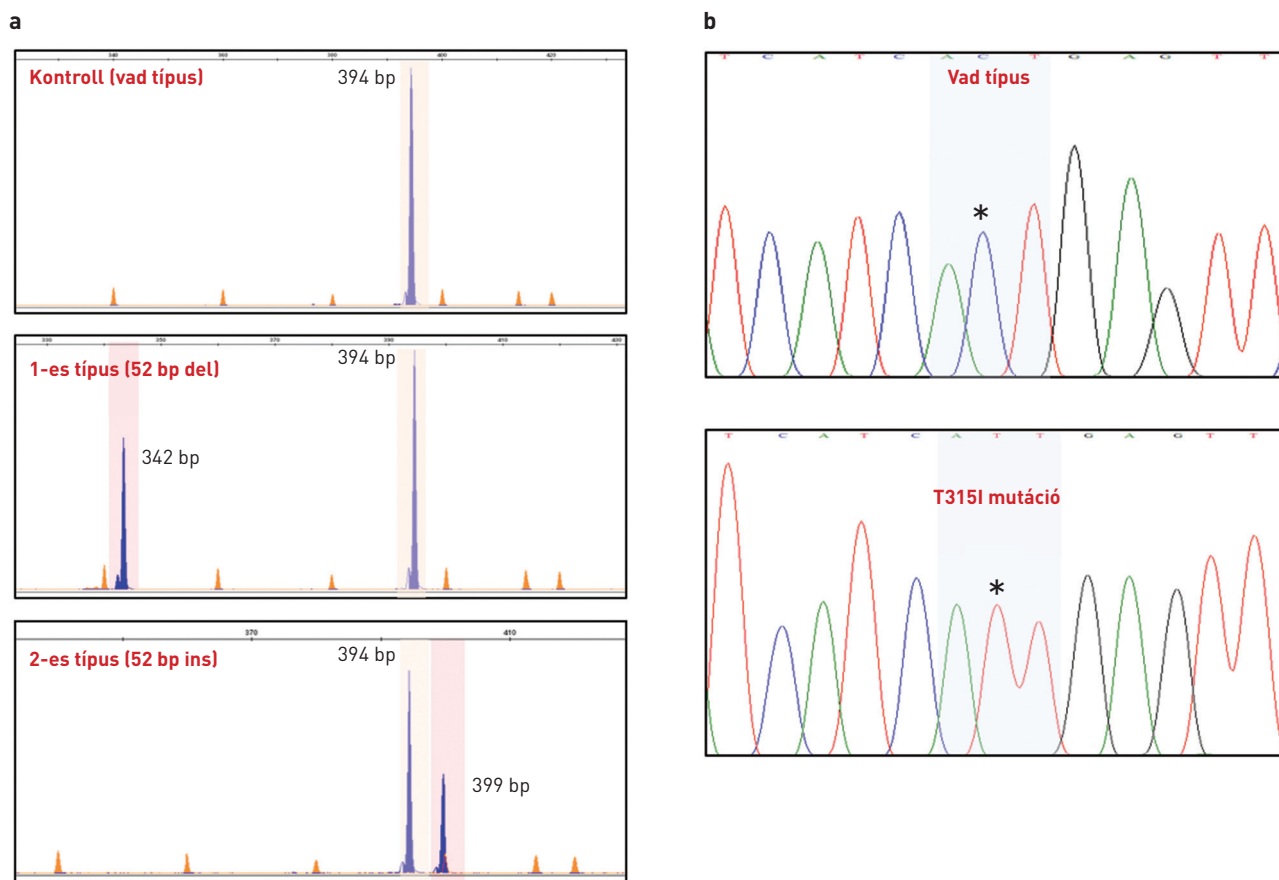
Abban az esetben, ha a vizsgálandó génben elszórtan jelentkeznek mutációk, nem kerülhető el a szekvenálás, a teljes cél régió szekvenciáját meg kell határozni. Erre példaként szolgál a *TP53* gén, mely szinte a teljes kódoló régiójában hordozhat mutációkat. Vizsgálata krónikus limfocitás leukémiában (CLL) indokolt, a legkedvezőtlenebb prognózisú betegek azonosításának céljából (18). A szekvenálással történő mutációkimutatás egy különleges esete a *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum kináz doménjében található rezisztenciamutációk vizsgálata CML-ben, ahol a vizsgálat RNS-ből kiindulva zajlik (6.b ábra). A kináz doménben található mutációk felelősek a betegek egy részében fellépő TKI-rezisztenciáért, továbbá a kimutatott mutáció típusa informatív a választandó TKI-kezelés szempontjából is (19).

3. TÁBLÁZAT. Onkohematológiai megbetegedésekben rutinszerűen vizsgált pontmutációk

ENTITÁS	GÉN/MUTÁCIÓ	JELENTŐSÉG
Akut mieloid leukémia	<i>CEPBA</i>	prognózis
	<i>FLT3</i>	prognózis
	<i>NPM1</i>	prognózis
Hajás sejt leukémia	<i>BRAF V600E</i>	diagnózis
Krónikus limfocitás leukémia	<i>TP53</i>	prognózis, célzott terápia
Krónikus mieloid leukémia	<i>ABL1</i>	célzott terápia
Mieloproliferatív neopláziák	<i>JAK2 V617F</i>	diagnózis
	<i>JAK2 exon 12</i>	diagnózis
	<i>CALR</i>	diagnózis
	<i>MPL</i>	diagnózis
Szisztémás masztocitózis	<i>KIT</i>	diagnózis
Waldenström-makroglobulinémia	<i>MYD88 L256P</i>	diagnózis

Fúziós transzkriptumok vizsgálata

Mivel a hematológiai daganatok nagy részére jellemzőek a visszatérő kromoszómatranszlokációk, az ezek nyomán kialakuló kíméra génekről átíródó fúziós transzkriptumok kimutatásának és mennyiségi követésének kulcsszerepe van az onkohematológiai molekuláris diagnosztikában. A fúziós transzkriptumok közül több is az adott entitásra specifikus, az adott kórkép patogenezisében is kulcsszerepet játszik, így diagnosztikus jelentőséggel bír. A legfontosabb vizsgált fúziós transzkriptumokat a 4. táblázat foglalja össze. Klasszikus példák a krónikus mieloid leukémiában (CML) megjelenő *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum vagy az akut promielocitás leukémiára (APL) jellemző *PML-RARA* fúziós transzkriptum. A génfúziók vizsgálata RNS-ből indul ki, amit a reverz transzkripciót követő PCR-vizsgálat követ.



6. ÁBRA. A fragmenshossz-analízis és Sanger-szekvenálás értékelésének bemutatása. (a) A calreticulin génjét érintő deléciók és inszerciók kimutatása PCR-t követő kapilláriselektroforézissel. A PCR-reakció során a *CALR* gén megfelelő régióit amplifikáljuk fluoreszcensen jelölt primerpárral, majd a keletkező termékek elválasztását kapilláriselektroforézissel végezzük. A felső panelen látható, hogy vad típusú gén esetében csak egyféle méretű termék keletkezik. A középső panelen az ún. 1-es típusú *CALR*-mutáció látható, ahol a normális méretű termék mellett egy másik, 52 bázispárral rövidebb termék is megjelenik. Az alsó panelen a 2-es típusú *CALR*-mutáció látható, ahol a normális allélt jelentő csúcs mellett egy másik, 5 bázispárral hosszabb termék is megjelenik, ami a mutáns allélt reprezentálja. (b) A *BCR-ABL1* tirozinkináz domén T315I pontmutáció kimutatása Sanger-féle szekvenálással. A felső panelen látható normális *ABL1* gén 315. kodonja ACT nukleotidsorrenddel treonin aminosavat kódol. Az alsó panelen látható elektroforetogramon a 315. kodonban egy C>T nukleotidcseré (*) történt. Az új, ATT kodon izoleucin aminosavat kódol.

Valamennyi esetben kiemelt fontosságú az adott fúziós gén esetében a pontos töréspont meghatározása diagnóziskor. A töréspont pontos ismeretének birtokában lehetséges csak a későbbiek során megfelelő típusú fúziós transzkriptum monitorozása. Erre a legismertebb példa a *BCR-ABL1* fúziós gén töréspontjának meghatározása a CML és egyes ALL esetek diagnóziskor, ami „major”, „minor” vagy „mikro” variáns formájában jelenhet meg.

Bár a fúziós gének és transzlokációk a PCR-alapú vizsgálatok mellett hagyományos citogenetikai eljárással (kariotipizálás) és FISH-sel is kimutathatóak, az MRD meghatározásához a Q-PCR rendelkezik a gyakran szükséges, mély molekuláris válasz megítélését lehetővé tevő magas szenzitivitással. A fúziós transzkriptumok Q-PCR-rel történő nyomon követése során pontos mennyiségi (génexpresszió)

meghatározásra nyílik lehetőség a fentebb bemutatott módszer alapján (3. ábra). A leukémiákra jellemző fúziós transzkriptumok mennyiségi nyomon követése is nemzetközi ajánlás alapján történik [20, 21]. Az iskolapéldának számító CML esetében a *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum mennyiségének alakulása az alkalmazott tirozinkináz-gátló (TKI) terápia eredményességének fontos indikátora. Az Európai Leukémia Net (ELNET) legújabb ajánlása alapján, az onkológiában elsőként, a *BCR-ABL1* fúziós transzkriptum szintjének alakulása alapján hivatalosan is megítélhető a célzott TKI-terápia hatékonysága, és adott esetben terápiás váltás is eszközölhető az eredmény alapján [22].

A fúziós transzkriptumok kimutatása során nagy érzékenységre törekszünk (10^{-5}), melynek eléréséhez kritikus fontosságú a megfelelő mennyiségben rendelkezésre álló

4. TÁBLÁZAT. Onkohematológiai megbetegedésekben leggyakrabban vizsgált fúziós transzkriptumok

ENTITÁS	FÚZIÓS TRANZ-KRIPTUM	KROMOSZÓMA-ELTÉRÉS	JELEN-TŐSÉG
Akut mieloid leukémia	PML-RARA	t(15;17)(q24;q21)	prognózis, követés (MRD)
	CBFB-MYH11	inv(16)	
	RUNX1/RUNX1T1	t(8;21)(q22;q22)	
Akut limfoid leukémia	ETV6-RUNX1	t(12;21)(p13;q22)	prognózis, követés (MRD)
	E2A-PBX1	t(1;19)(q23;p13)	
	MLL-AF4	t(4;11)(q21;q23)	
Krónikus mieloid leukémia	BCR-ABL1	t(9;22)(q34;q11)	követés, célzott terápia
Hipereozinofil szindróma	FIP1L1-PDGFR	del(4)(q12)	diagnózis

minta, ami legalább 5-10 ml perifériás vért vagy csontvelő-aspirátumot jelent (CML monitorozásakor legalább 10 ml perifériás vérről van szükség a molekuláris válasz mélységének meghatározásához). Mivel a Q-PCR-vizsgálatok RNS-ből indulnak ki, rendkívüli jelentőséggel bír, hogy a vizsgálati minták a mintavételt követő 24 órán belül feldolgozásra kerüljenek.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008
2. Kearney L. Molecular cytogenetics. Best Pract Res Clin Haematol 14:645-669, 2001
3. Pajor L. Az interfázis citogenetika alkalmazási lehetőségei az onkopatológiai diagnosztikában. Orv Hetil 139:2939-2946, 1998
4. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. J Mol Diagn 8:141-151, 2006
5. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25:402-408, 2001
6. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 17:2257-2317, 2003
7. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. Leukemia 26:2159-2171, 2012
8. Langerak AW, Groenen PJ, Jm van Krieken JH, et al. Immunoglobulin/T-cell receptor clonality diagnostics. Expert Opin Med Diagn 1:451-461, 2007
9. Liu H, Bench AJ, Bacon CM, et al. A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. Br J Haematol 138:31-43, 2007
10. Szczepanski T, Pongers-Willems MJ, Langerak AW, et al. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. Curr Top Microbiol Immunol 246:205-213; discussion 214-5, 1999
11. Garand R, Beldjord K, Cave H, et al. Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. Leukemia 27:370-376, 2013

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KITEKINTÉS

Az elmúlt évtizedben a molekuláris diagnosztika virágzásának vagyunk tanúi az onkológiában. Különösen érvényes ez a hematológiai daganatokra, ahol egyre több entitás esetében jelennek meg új vizsgálandó molekuláris markerek. Az újabb célzott terápiák megjelenésével egyre fontosabb szereppel bír azon eltérések kimutatása is, amelyek előrejelzik bizonyos kezelések hatékonyságát, illetve bizonyos esetekben az adott terápiával szembeni rezisztenciát. Az ennek nyomán klinikusi oldalról egyre növekvő vizsgálati igények emelkedett terhet rónak a molekuláris diagnosztikai munkát végző laboratóriumokra, melyek a jelenlegi metodikák alkalmazásával már most is maximális kapacitásuk határán mozognak. Lényeges előrelépést jelenthet, és bizakodásra ad okot az ún. újgenerációs szekvenálás („next generation sequencing”, NGS) megjelenése, mely forradalmi változást jelent a DNS- és RNS-szekvenálási technológiák terén. Alkalmazásával valamennyi fentebb említett eltérés vizsgálható, nagy áteresztőképességének köszönhetően pedig az adott vizsgálat irányától függően teljes exomok, genomok, illetve transzkriptumok is gyorsan és költséghatékonyan vizsgálhatók. Bár a hagyományos PCR-eljárások egyeduralmát egyik új technológia sem tudta megtörni az elmúlt három évtizedben, a jelenlegi tendenciák és reményeink szerint az NGS jelenti majd az onkohematológiai molekuláris diagnosztika megújulását a közeljövőben.

12. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia 21:604-611, 2007
13. Dyer MJ. The pathogenetic role of oncogenes deregulated by chromosomal translocation in B-cell malignancies. Int J Hematol 77:315-320, 2003
14. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Exp Hematol 43:599-608, 2015
15. Krahling T, Balassa K, Meggyesi N, et al. Komplex molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus myeloproliferatív neoplasiák diagnosztikájában. Orv Hetil 155:2074-2081, 2014
16. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. Leukemia 19:1479-1482, 2005
17. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 373:1136-1152, 2015
18. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 26:1458-1461, 2012
19. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood 118:1208-1215, 2011
20. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. Leukemia 17:2474-2486, 2003
21. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. Leukemia 17:2318-2357, 2003
22. Bacarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood 122:872-884, 2013