

Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye plazmasejtes myelomában szenvedő betegein

Kosztolányi Szabolcs dr.¹ ■ Horváth Bálint²
Hosnyánszki Diána² ■ Kereskai László dr.² ■ Sziládi Erzsébet dr.³
Jáksó Pál dr.² ■ Alizadeh Hussain dr.¹ ■ Szuhai Károly dr.⁴
Alpár Donát dr.^{2, 5*} ■ Kajtár Béla dr.^{2*}

¹Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, I. Belgyógyászati Klinika, Pécs

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, Pathológiai Intézet, Pécs

³Tolna Megyei Balassa János Kórház, Hematológiai Osztály, Szekszárd

⁴Leiden University Medical Center, Department of Cell and Chemical Biology, Leiden, The Netherlands

⁵Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, MTA–SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Budapest

Bevezetés: A plazmasejtes myeloma változatos klinikai lefolyással járó hematológiai malignitás, melyhez heterogén genetikai háttér társul. A betegség patogeneziséhez és progressziójához asszociáltnak gyakran jelennek meg visszatérő kromoszomális és szubkromoszomális eltérések, melyek diagnóziskor való kimutatása segíti a betegek genetikai karakterizálását, klasszifikációját és prognosztikai besorolását.

Célkitűzés: Tanulmányunkban átfogóan értékeltük a Pécsi Klinikai Központ és a Tolna Megyei Balassa János Kórház plazmasejtes myelomában szenvedő betegein 2005 és 2018 között általunk elvégzett molekuláris citogenetikai vizsgálatok eredményeit.

Módszer: Az említett periódusban 231 beteg csontvelői és perifériás vérmintájában szűrtünk visszatérő genetikai aberrációkat fluoreszcens *in situ* hibridizációval. A módszerrel az immunoglobulin-nehézlánc-gént érintő kromoszóma-transzlokációkat, az 1p és 17p kromoszómakarokat érintő veszteségeket, az 1q kromoszómakart érintő többletet, valamint a 13-as kromoszómát érintő kiegyensúlyozatlan aberrációkat vizsgáltuk. Negyvenkét beteg mintáján multiplex ligatíofüggő szondaamplifikációval vizsgáltuk az 1p, 1q, 5q, 12p, 13q, 16q és 17p kromoszómakarok jellemző veszteségeit és többleteit. A vizsgált időszakban 116 csontvelői mintán kariotipizálásra is sor került.

Eredmények: Összesen 233 genetikai eltérést azonosítottunk célzottan, az aberrációk gyakorisága megfelelt a korábbi nemzetközi tanulmányok által látottaknak. Azonos kromoszómakarokat fluoreszcens *in situ* hibridizációval, valamint multiplex ligatíofüggő szondaamplifikációval vizsgálva az eredmények 96,2%-os egyezést mutattak. Az utóbbi technikával a fluoreszcens *in situ* hibridizációval detektált abnormalitásokon túl további 21 kiegyensúlyozatlan genetikai aberrációt azonosítottunk 16/42 betegben (38%).

Következtetés: Eredményeink alapján az általunk használt két molekuláris citogenetikai módszer együttes alkalmazása jelentősen segítheti a jövőben a plazmasejtes myelomában szenvedő hazai betegek átfogóbb genetikai karakterizálását.

Orv Hetil. 2019; 160(24): 944–951.

Kulcsszavak: onkohematológia, plazmasejtes myeloma, molekuláris citogenetika, FISH, MLPA

Molecular cytogenetic analyses of patients with plasma cell myeloma in Tolna and Baranya counties in Hungary

Introduction: Plasma cell myeloma is a hematological malignancy with heterogeneous genomic landscape and diverse clinical course. Recurrent chromosomal and subchromosomal aberrations commonly occur in this entity and are associated with the pathogenesis and progression of the disease. The identification of these alterations aids genetic characterization, classification and prognostication of patients.

*A. D. és K. B. közösen tervezte és felügyelte a tanulmányhoz kapcsolódó munkát.

Aim: Molecular cytogenetic investigations of plasma cell myeloma patients treated at the University of Pécs Clinical Center and János Balassa County Hospital of Tolna County, Szekszárd, between 2005 and 2018 were evaluated in our study.

Method: 231 patients were screened for genetic aberrations using fluorescence *in situ* hybridization. Translocations involving the immunoglobulin heavy chain gene, losses of 1p and 17p chromosome arms, gains of 1q chromosome arm and unbalanced aberrations of chromosome 13 were investigated. Losses and gains of 1p, 1q, 5q, 12p, 13q, 16q and 17p chromosome arms were analyzed using multiplex ligation-dependent probe amplification in 42 patients. During the investigated period, 116 bone marrow karyotyping was also performed.

Results: In total, 233 genetic aberrations were identified using our targeted approaches; the frequency of specific aberrations correlated with data of the recent literature. Concordance of results gained by fluorescence *in situ* hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification was 96.2% by analyzing the same chromosome arms. The latter technique revealed 21 additional genetic aberrations in 16/42 patient samples (38%) as compared to fluorescence *in situ* hybridization.

Conclusions: Our results suggest that the combined application of the two molecular cytogenetic methods may facilitate a more detailed characterization of genetic aberrations of plasma cell myeloma patients in Hungary.

Keywords: oncohematology, plasma cell myeloma, molecular cytogenetics, FISH, MLPA

Kosztolányi Sz, Horváth B, Hosnyánszki D, Kereskai L, Sziládi E, Jáksó P, Alizadeh H, Szuhai K, Alpár D, Kajtár B. [Molecular cytogenetic analyses of patients with plasma cell myeloma in Tolna and Baranya counties in Hungary]. *Orv Hetil.* 2019; 160(24): 944–951.

(Beérkezett: 2018. november 22.; elfogadva: 2018. december 9.)

Rövidítések

BAC = (bacterial arteficial chromosome) bakteriális mesterséges kromoszóma; DNS = dezoxiribonukleinsav; FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; *IGH* = (immunoglobulin heavy chain gene) immunoglobulin-nehézlánc-gén; IMWG = (International Myeloma Working Group) Nemzetközi Myeloma Munkacsoport; LDH = (low-density lipoprotein) alacsony sűrűségű lipoprotein; MLPA = (multiplex ligation-dependent probe amplification) multiplex ligatíofüggő szondaamplifikáció; PCM = (plasma cell myeloma) plazmasejtes myeloma; WHO = (World Health Organization) Egészségügyi Világszervezet

A plazmasejtes myeloma (plasma cell myeloma – PCM) terminálisan differenciált B-sejtek kóros mértékű felszaporodásával jár, jelenleg gyógyíthatatlan onkohematológiai betegség [1]. A PCM változatos genetikai hátterére jellemzőek a reciprok kromozómatranszlokációk, a kiegyensúlyozatlan genetikai aberrációkhoz vezető számbeli és szerkezeti (strukturális) kromozómatöbbletek, illetve -vesztések, valamint a pontmutációk [2, 3]. Az egyes abnormalitásoknak, illetve azok kombinációinak kimutatása segíti a PCM-ben szenvedő betegek genetikai jellemzését, klasszifikációját és prognosztikai besorolását [4, 5]. A klinikai gyakorlat szempontjából legjelentősebb, kedvezőtlen körlefelgyással társuló genetikai aberrációk a t(4;14)(p16;32) (*IGH-FGFR3/MMSET* génfüzió) és (14;16)(q32;q23) (*IGH/MAF* génfüzió) transzlokációk, valamint a *TP53*-gén deletiója és az 1-es kromoszóma strukturális eltérései.

A kromoszómális aberrációk feltárását célzó, konvencionális citogenetikai vizsgálatok során nyert adatok ér-

telmezése PCM esetében nagy óvatosságot igényel a plazmasejtek viszonylag alacsony proliferációs aktivitása miatt, mely gyakran vezet álnegatív vagy csökkent reprezentativitású eredményhez. A PCM diagnosztikájában ezért széles körben elterjedtek az interfázisban lévő sejtek magjain végzett célzott, fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH-) vizsgálatok [6]. Bár a FISH nem alkalmas a PCM-re jellemző, gyakran komplex kromozómaátrendeződések átfogó feltárására, feloldóképessége lehetővé teszi számos, kariotipizálással kimutathatatlan 'driver' aberráció detektálását nagyszámú sejten, ezzel biztosítva egyedi sejtlapú, ugyanakkor magas reprezentativitású analízist. A FISH-tesztek hatékony elvégzésének leggyakrabban jelentkező akadály a vizsgálandó myelomás csontvelői aspirátum vérrel való hígulása miatt bekövetkező alacsony plazmasejtarány, mely a plazmasejtek specifikus, mágnesgyöngyös dúsításával növelhető [6].

A klinikai diagnosztikában rutinszinten végzett FISH-tesztekkel kettő, ritkábban három kromoszómális locus vizsgálható egyidejűleg. Emellett a tesztek egy részénél az eredmény helyes értelmezéséhez úgynevezett kontrollszonda használata is szükséges, mellyel a vizsgálni kívánt régió kívül ugyanazon kromoszóma egy távoli szakasza is láthatóvá tehető, ezzel valójában tovább csökkentve az egyidejűleg vizsgálható cél régiók számát. A multiplex ligatíofüggő szondaamplifikáció (MLPA) olyan módszer, mellyel akár 55–60 különböző kromoszómális locus kópiaszám-eltérései is detektálhatók egy időben [7]. A módszer nem nyújt lehetőséget egyedi sejtek vizsgálatára, és megbízható használatához 25–30%-os tumorsejt tisztaság szükséges, ugyanakkor exonszintű

genomikus feloldása meghaladja a FISH tipikus, 100 kilobázis–1 megabázis nagyságrendű feloldóképességét, és a FISH-hez hasonlóan 24 órán belül eredményt szolgáltat [8]. Előnyei ellenére az MLPA széles körű alkalmazása a hazai hematológiai diagnosztikában jelenleg még várat magára.

Tanulmányunkban összesítettük több mint 200 olyan, rosszindulatú plazmasejtes kórképben szenvedő beteg molekuláris citogenetikai eredményeit, akiknek az elmúlt 13 évben diagnosztikus mintái érkeztek a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetébe Baranya, illetve Tolna megyéből. A teljes betegpopuláción elvégzett FISH-vizsgálataink mellett a betegek egy részén teszteltük az MLPA-technika hatékonyságát is, lehetővé téve a két módszer lehetőségeinek és limitációinak közvetlen összehasonlítását.

Módszer

Tanulmányunkba a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában, valamint a Tolna Megyei Balassa János Kórház Hematológiai Osztályán, Szekszárdon, a 2005 és 2018 között plasmacytomával, plazmasejtes myelomával vagy plazmasejtes leukaemiával diagnosztizált betegeket vontuk be. A diagnózis az Egészségügyi Világszervezet (WHO), illetve a Nemzetközi Myeloma Munkacsoport (IMWG) ajánlásainak megfelelően lett meghatározva [9, 10]; a betegek mintáinak szövettani, immunhisztokémiai, áramlási citometriai és genetikai vizsgálatai a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében történtek. A betegek túlnyomó többségénél csontvelői aspirátumból származó setjszuspenziót vizsgáltunk, másoknál csak csontvelői kenet vagy cristabiopsziás minta állt rendelkezésre, míg néhány, plazmasejtes leukémiában szenvedő beteg esetén perifériás vért analizáltunk. Amennyiben a CD45, CD19, CD38, CD138 és CD56 markerekkel végzett áramlási citometriás mérés a csontvelői aspirátumban 20% alatti plazmasejtarányt igazolt, a mintán plazmasejtdúsítást végeztünk CD138-antitesttel konjugált mágneses gyöngyökkel (BD™ IMAg, BD Biosciences, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok [USA], illetve EasySep™, STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada). Dúsítást követően a plazmasejtarányt Mum1 immuncitokémiai reakcióval ellenőriztük.

116 minta esetében csontvelői kariotipizálásra is sor került, melynek keretében plazmasejtdúsítás nélkül, 24, illetve 48 órás tenyésztést követően legalább 20 metafázis vizsgálatára került sor G-sávozásos technikával.

Az interfázisban lévő sejtmagokon végzett FISH-vizsgálatok során fluoreszcens szondákkal vizualizáltunk olyan genomikus locusokat, melyek a plazmasejtes myelomában jellemzően megjelenő kromoszomális aberrációk által érintettek. Kétszínű jelöléssel vizsgáltuk a 13-as kromoszóma monosomiáját, illetve hosszúkar-deletióját (Vysis LSI D13S319 SO/13q34 SG szonda, Abbott Molecular Inc., Lake Bluff, USA), a 17-es kromoszóma

rövid karján mutatkozó vesztést (Vysis LSI TP53 SO/CEP17 SG szonda), az immunglobulin-nehézlánc (*IGH*)-gént érintő átrendeződéseket (Vysis LSI IGH DC BA szonda), az utóbbi pozitivitása esetén pedig három specifikus *IGH*-transzlokációt, úgymint a t(4;14)(p16;q32) (*IGH-FGFR3/MMSET* génfúzió, Vysis LSI IGH/FGFR3 DC DF szonda), a t(11;14)(q13;q32) (*IGH-CCND1* génfúzió, Vysis LSI IGH/CCND1 XT DC DF szonda) és a t(14;16)(q32;q23) (*IGH-MAF* génfúzió, Vysis LSI IGH/MAF DC DF szonda) átrendeződéseket. Az 1-es kromoszóma rövid karján megjelenő vesztést, illetve a hosszú karon mutatkozó többletet kereskedelemben elérhető szondával (LSI 1q21 SG/SRD 1p36 SO, Kreatech Diagnostics, Amszterdam, Hollandia) és általunk létrehozott, az 1p32.2, 1p21 és 1q21 régiókra specifikus, bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC-) alapú szondákkal vizsgáltuk korábban közölt protokolloknak megfelelően [11]. Az MLPA-val vizsgált betegek mintáin az MLPA-technikával látott eltérések validációjaként analizáltuk az 5-ös kromoszóma rövid és hosszú karjainak eltéréseit is (Vysis LSI EGR1 SO/D5S23, D5S721 SG DC szonda). A FISH-jelek mintázatát Zeiss AxioImager A1 mikroszkóppal (Carl Zeiss Technika Kft., Budapest) és háromdimenziós (3D) vizsgálatot is lehetővé tevő Zeiss AxioPlan 2ie MOT motorizált citometriai műszerrel (MetaSystems, Altlussheim, Németország) értékeltük az Európai Myeloma Network ajánlásainak megfelelően [6]. Ezeknek megfelelően minden minta esetében szondakészletenként legalább 100 sejt vizsgálatára került sor; a transzlokációk esetében 10%-os, a számbeli eltérések esetében 20%-os küszöbértéket alkalmaztunk.

Az MLPA-reakciókhoz SALSA P425-A1 szondakeveréket használtunk (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia); ez 42 olyan szondát tartalmazott, amelyek PCM-ben visszatérően megjelenő aberrációk által érintett kromoszomális régiókra specifikusak, úgymint 1p32 (*EAF1*, *CDKN2C*, *PLPP3* és *DABI* gének), 1p21, 1q21.3 (*CKS1B*-gén), 1q23.3, 5q31.3, 12p13.31, 13q14 (*RBI* és *DLEU1/DLEU2* gének), 16q12 (*CYLD*-gén), 16q23 (*WWOX*-gén) és 17p13 (*TP53*-gén). A reakciókat archivált sejtekből izolált DNS-mintákon, korábbi tanulmányainkból ismert módon végeztük [11, 12]. A polimeráz-lánreakcióval képzett MLPA-szonda-termékeket ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kapilláris-elektroforézis-készülékkel szeparáltuk méretük alapján. Az elektroferogramok analízisét és a relatív kópiaszámok meghatározását a Cofalyser.Net szoftverrel (www.mlpa.com) végeztük. Genomikus többletet 1,3-nál magasabb, vesztést 0,7-nél alacsonyabb relatív kópiaszám esetén határoztunk meg, a minta áramlási citometriával mért tisztaságát is figyelembe véve.

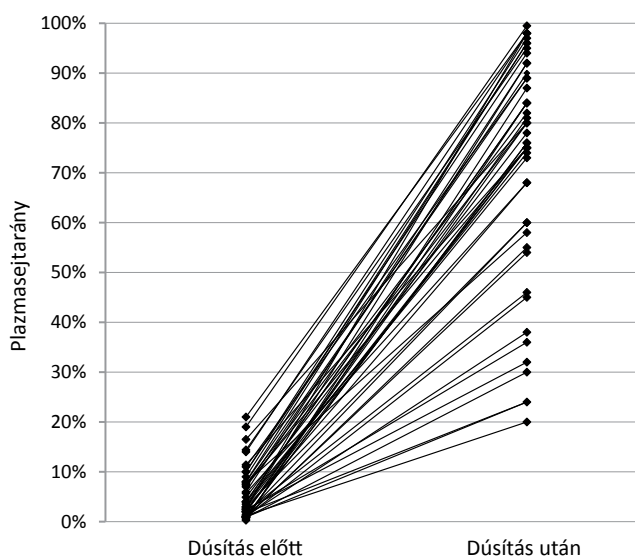
A FISH- és MLPA-eredményeket Fisher-féle egzakt próbával vetettük össze, SPSS 15.0 szoftvert használva (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Eredmények

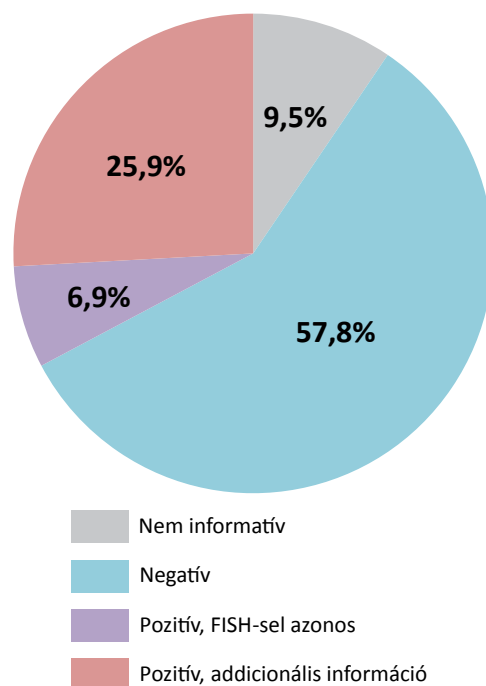
Tanulmányunkban 231 beteg molekuláris citogenetikai eredményeit összesítettük. Csontvelői aspirátumot 191 betegnél tudtunk vizsgálni, csontvelőből származó kenetet 4 betegnél, további 4 betegnél perifériás vért analizáltunk, míg 32 betegnél kizárólag crístabiopsziás minta állt rendelkezésre.

A mágneses sejtdúsítás a csontvelői minták plazmasejt-arányát jelentősen megemelte. 48 esetben került sor a módszer alkalmazására, amikor a plazmasejtek aránya nem haladta meg a 20%-ot; az átlagos plazmasejtarány ezekben a mintákban 5% volt (0,3–20,0%). A dúsítást követően átlagosan 72%-ra emelkedett a plazmasejtek aránya (20–100%); csupán három esetben (6,7%) maradt az érték 30% alatti, a dúsulás mértéke átlagosan tizen-nolcszorosnak bizonyult (1. ábra). A magasabb plazmasejttartalom a FISH- és MLPA-vizsgálatok megbízható értékelését jelentősen fokozta, néhány minta esetében pedig kifejezetten a dúsítás tette lehetővé az összes genetikai vizsgálat sikeres elvégzését azáltal, hogy 30% fölé emelte az abnormális sejtek arányát.

A 116 elvégzett csontvelői kariotipizálás közül 11 (9%) esetben nem sikerült értékelhető metafázist nyerni, 67 (58%) esetben klonális citogenetikai eltérés nem volt kimutatható. Nyolc (7%) esetben a FISH-vizsgálatok során is megfigyelt eltérések igazolódtak, míg 30 (26%) esetben a FISH-tesztek által nem vizsgált klonális aberrációk is mutatkoztak (2. ábra). Az utóbbi minták közül 17-ben (15%) háromnál több, egymástól független eltérés is kimutatható volt, melyek közül legalább az egyik strukturális aberrációnak felelt meg (komplex kariotípus).



1. ábra Plazmasejtdúsítás mágneses sejtszeparálással. 48 minta esetében mágneses sejtszeparálással átlagosan 5%-os plazmasejtarányból 72%-os tisztaságú sejtszuspenziót sikerült nyerni. Valamennyi esetben 20% feletti plazmasejt-koncentrációt lehetett biztosítani a további genetikai vizsgálatok céljára



2. ábra Csontvelői kariotipizálás eredményei plazmasejtes myelomában. 116 diagnosztikus minta esetében került sor kariotipizálásra, 11 esetben nem sikerült értékelhető metafázisokat nyerni, 67 esetben nem igazolódott klonális citogenetikai aberráció. Nyolc minta esetében a FISH során látottakkal azonos eltérések igazolódtak, 30 esetben (25,9%) azonban FISH-sel nem észlelt genetikai abnormalitások is kimutathatók voltak

A teljes beteganyagban elvégzett FISH-vizsgálatok eredményeit az 1. táblázat foglalja össze. Az *IGH*-transzlokációt hordozó betegeken belül közel azonos gyakorisággal mutatkoztak az *IGH-CCND1* (26,8%) és az *IGH-FGFR3/MMSET* (24,7%) génfüziót hordozó esetek, míg *IGH-MAF*-pozitivitást a betegek 10,7%-ában figyeltünk meg. Az 1q kromoszómakar többletét, a

1. táblázat | FISH-vizsgálattal kimutatott aberrációk gyakorisága

Aberráció	Gyakoriság
<i>IGH</i> -gén-törés	40,7%
t(4;14)(p16;q32)	10,0%
t(11;14)(q13;q32)	11,0%
t(14;16)(q32;q23)	4,3%
t(14;?) (q32;?)	15,3%
del(1p)	8,8% ²
gain(1q)	39,8%
-13/del(13q)	42,0%
del(17p)	9,0%

¹*IGH*-transzlokációval kapcsolatban 209 beteg esetében rendelkezünk adattal, az 1p/1q strukturális eltérést 215, a 13-as kromoszóma eltérést, illetve a 17p-deletiót 224 beteg esetében vizsgáltuk.

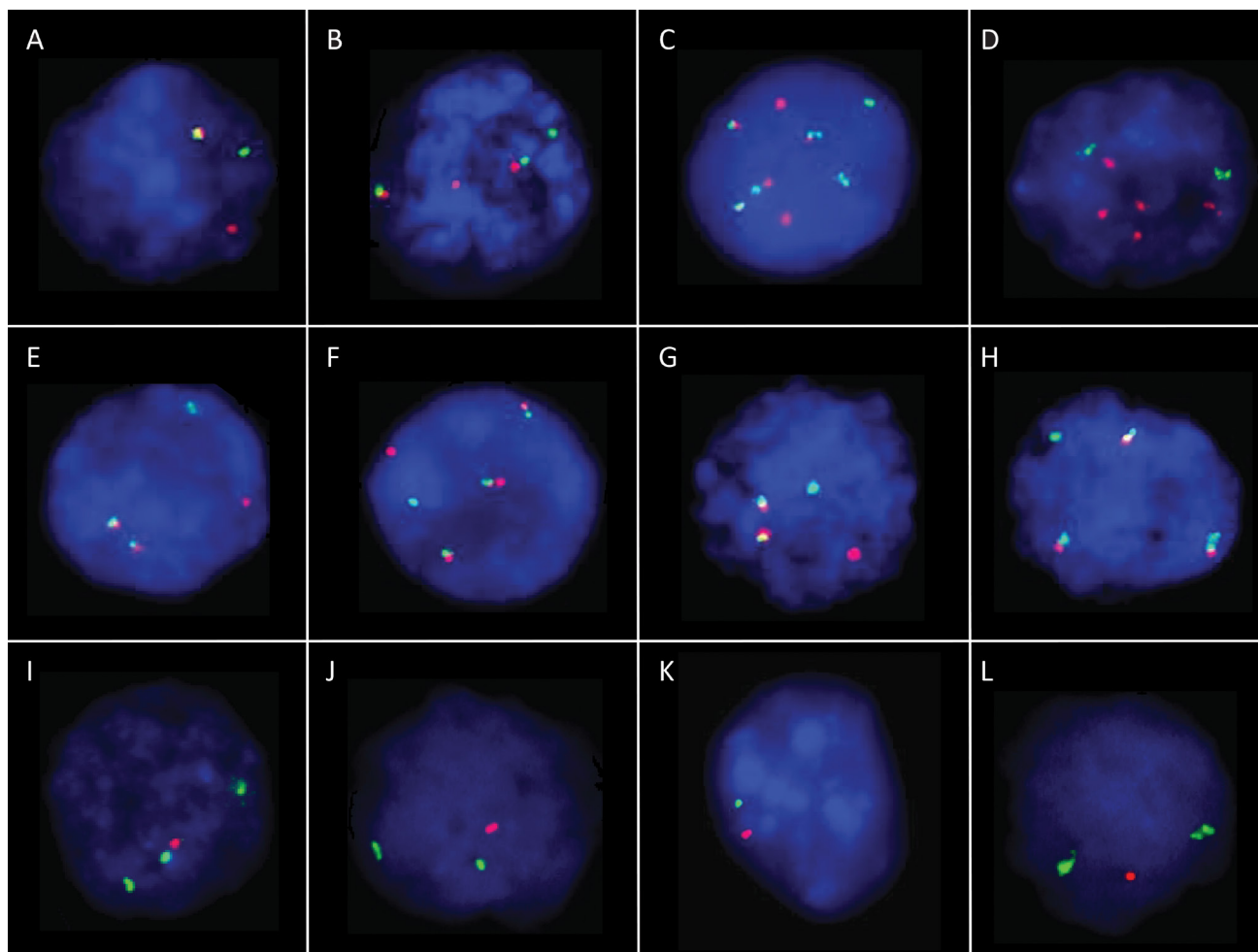
²Kereskedelmi forgalomban elérhető szondával nyert eredmény.

del = deletio (vesztés); FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; gain = többlet; *IGH* = immunoglobulin-nehézlánc-gén; t = transzlokáció

13-as kromoszóma abnormalitásait, valamint a 17p kromoszómakar vesztését az irodalomban ismert gyakoriságokhoz hasonló arányban mutattuk ki, míg az 1p kromoszómakar strukturális vesztése elmaradt a korábbi, DNS-microarray-alapú nemzetközi tanulmányok alapján feltételezett tartománytól. Ennek legvalószínűbb oka abban keresendő, hogy az alkalmazott, kereskedelmi forgalomban elérhető FISH-szonda az 1p36 kromoszóma-locust vizualizálta, míg az 1p-vesztés gyakran lokalizálódik az 1p32, 1p31 vagy 1p21 régiókra. A myeloma FISH-diagnosztikája során gyakran megjelenő jellemző

aberrációs jelmintázatokat, valamint néhány általunk megfigyelt, ritkább alternatív jelmintázatot szemléltet a 3. ábra.

MLPA-módszerrel 57, DNS-vesztéssel vagy többlettel/sokszorozódással járó, kiegyensúlyozatlan aberrációt azonosítottunk 42 beteg csontvelőmintájában. A betegek több mint felében mutatkozott a 13-as kromoszómát érintő monosomia vagy strukturális vesztés, melyet csökkenő gyakorisággal követett az 1-es kromoszóma hosszú karjának többlete, rövid karjának vesztése, az 5-ös kromoszóma hosszú karjának többlete, a 16-os kro-



3. ábra

Abnormális FISH-jelmintázatok plazmasejtes myelómában. **A)** Az immunoglobulin-nehézlánc (*IGH*)-gén törésére utaló disszociációs jelmintázat. Intakt allélok esetén a zöld és piros szondák közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a törésponti régió két oldalán, normális sejtmagokban így a két allélnak megfelelően 2 fúziós jelet eredményezve (2F mintázat). Pozitív sejtmagokban az egyik allél interkromoszomális transzlokációja következtében a törésponttól centromerikus, illetve telomerikus irányban elhelyezkedő szondák különböző kromoszómákra helyeződnek, ezáltal térben eltávolodnak egymástól, az 1 fúziós (1F) mellett 1 piros (1P) és egy zöld (1Z) jelet létrehozva (1F1P1Z mintázat). **B)** *IGH-CCND1* génfúzióhoz vezető reciprok transzlokáció a 11-es és 14-es kromoszómák hosszú karjai között. A duplafúziós szondakészlet nagy kiterjedésű piros és zöld szondái a *CCND1*- (11q13), illetve az *IGH*- (14q32) gén törésponti szakaszait fedik le teljesen, normális sejtmagokban 2P2Z jelmintázatot létrehozva. Transzlokáció esetén egy-egy piros és zöld szonda kettéhasad, a törésponttól distálisan elhelyezkedő kromoszómaszakaszok kicserélődnek, így az eltérő színű szondafragmentumok kölcsönösen egymás mellé helyeződnek, fuzionálnak (2F1P1Z mintázat). **C)** *IGH-CCND1* génfúzió kimutatása duplafúziós szondával tetraploid kromoszómakészletű betegben (4F2P2Z mintázat). **D)** *IGH-CCND1* génfúzió kimutatására irányuló vizsgálat, mely végül *CCND1*-amplifikáció jelenlétét igazolta (5P2Z mintázat). **E)** *IGH-FGFR3/MMSET* génfúzióra utaló duplafúziós 2F1P1Z jelmintázat (*IGH*: zöld, *FGFR3*: piros jel). **F)** *IGH-FGFR3/MMSET*-pozitivitást, valamint a fúziós gén kópiaszámnyerését igazoló 3F1P1Z jelmintázat. **G)** *IGH-MAF* génfúziót jelző, tipikus duplafúziós 2F1P1Z jelmintázat (*IGH*: zöld, *MAF*: piros jel). **H)** *IGH-MAF* génfúziót, a fúziós gén kópiaszámnyerését, illetve a transzlokációban nem érintett *MAF*-allél vesztését vizualizáló, atipikus 3F1Z jelmintázat. **I)** 1p36-locus-vesztésre (piros jel), valamint 1q21-allélnyeresésre (zöld jel) utaló 1P3Z jelmintázat. **J)** A 13-as kromoszómán bekövetkezett strukturális monoallélikus vesztés 1P2Z jelmintázattal (13q14: piros jel, 13qter: zöld jel). **K)** A 13-as kromoszóma monosomiája 1P1Z mintázattal. **L)** A 17-es kromoszómán lévő *TP53*-gén (piros szignál) monoallélikus hiánya, ugyanazon kromoszóma megtartott számú centromerikus régiója (zöld jel) mellett. A sejtmagok kék háttérfestését 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) végzett teljes DNS-festés biztosította. (Objektív: 63×.) A fotók a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetében készültek

2. táblázat | MLPA-vizsgálattal kimutatott aberrációk gyakorisága 42 beteg diagnosztikus mintájában

Aberráció	Gyakoriság
del(1p)	30,9%
gain(1q)	45,2%
gain(5q)*	28,6%
del(12p)	16,7%
-13/del(13q)	52,4%
del(16q)	19,0%
del(17p)	9,5%

*A FISH-validálás teljes kromoszómatöbblet jelenlétét igazolta.

del = deletio (vesztés); FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; gain = többlet; MLPA = multiplex ligatiofüggő szondaamplifikáció

moszóma hosszú karjának vesztése, valamint a 12-es és 17-es kromoszómák rövid karjainak vesztése (2. táblázat). Emellett 3 betegben az 5q kromoszómakar vesztését, illetve 1 betegben a 16q kromoszómakar többletét azonosítottuk.

Az MLPA- és FISH-eredményeket a mindkét módszerrel vizsgált 42 betegben, 5 kromoszómakar (1p, 1q, 5q, 13q, 17p) vonatkozásában tudtuk összehasonlítani. A 210 (42 × 5) adatpontból 202 esetben egyezett meg a vizsgálatok eredménye, ami 96,2%-os konkordanciának felel meg (3. táblázat). Az 1p kromoszómakar vizsgálatánál tapasztalt nagymértékű egyezést az ennél a 42 betegnél specifikusan validációs célból alkalmazott, BAC-klon-alapú FISH-vizsgálat is segítette. A 8 eltérő eredmény közül 5-nél a FISH-teszt mutatott ki pozitívítást az 1q, 5q, 13q és 17p kromoszómakarokon; az MLPA negatív eredménye nagy valószínűséggel a minták 30%-ot meg nem haladó plazmasejt tisztaságának volt köszönhető. Három esetben kizárólag az MLPA fedett fel aberrációt, két betegben az 1p kromoszómakar azon régiójában, melyet egyik alkalmazott FISH-szonda sem fedett, egy betegben pedig a 17p kromoszómakar olyan rövid szakaszán mutatva ki eltérést, mely a FISH-vizsgálat feloldóképességét nem érte el. Összességében az MLPA 21 olyan aberrációt mutatott ki 16 betegben (38%), melyek az általunk végzett FISH-vizsgálatokkal

rejtve maradtak. Ugyanakkor FISH-analízissel összesen 38 olyan kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan aberrációt mutattunk ki a 42 betegben, melyeket az alkalmazott MLPA-kittel nem voltunk képesek detektálni. Továbbá, a FISH-validáció során az MLPA-teszt alapján 5q-többletnek mutatózó aberrációk mindegyikéről kiderült, hogy valójában aneusomia, számbeli kromoszómatöbblet áll az eltérés hátterében.

Megbeszélés

A PCM terápiája jelentős fejlődésen ment keresztül az elmúlt két évtizedben, a betegek túlélési esélyei jelentősen javultak az új terápiás lehetőségeknek köszönhetően [13]. A proteozómagátlók és immunmodulátorok kombinált, illetve egymást követő alkalmazásával a várható medián túlélés a korábbi „kemoterápiás” korszakban elérhető, átlagosan 3–4 évről 7–8 évre nőtt. Mindezek ellenére a PCM továbbra is változatos klinikai lefolyást mutat, és a betegek 15–20%-a még mindig 2 éven belül meghal a betegség progressziója következtében [14]. A PCM kezelésének változásához szorosan társult a betegség biológiai, ezen belül genetikai hátterének alaposabb megismerése [2, 15, 16]. Számos tanulmány talált egyértelmű összefüggést a PCM változatos progressziója, klinikai lefolyása, az egyes gyógyszerek mellett észlelt terápiás válasz és az egyes betegek által mutatott eltérő genetikai háttér között [5, 17–20]. Ennek nyomán az IMWG jelenlegi ajánlásai az emelkedett LDH, csökkent szérumalbumin és magas béta-2-mikroglobulin paraméterek mellett magukban foglalják prognosztikailag meghatározónak tűnő, tipikusan FISH-sel kimutatott markerek vizsgálatát is, mint a del(17p), a t(4;14) és a t(14;16), valamint újabban az 1-es kromoszóma hosszú karjának többlete [10, 21, 22]. Ezzel összhangban a hazai hematológiai gyakorlatban is igényelt az adott esetben akár terápiás döntést is meghatározó aberrációk kimutatása, mint a t(4;14) (*IGH-FGFR3/MMSET* génfüzió), a t(14;16) (*IGH-MAF* génfüzió) és a del(17p) (*TP53*-gén-vesztés); klinikai szempontból ezenkívül fontosnak tartják az 1q kromoszómakar többletének, illetve az 1p kar vesztésének vizsgálatát is [13].

3. táblázat | A FISH- és az MLPA-eredmények összehasonlítása

		FISH									
		del(1p)		gain(1q)		gain(5q)		-13/del(13q)		del(17p)	
		Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg
MLPA	Poz	11	2	19	0	12	0	22	0	3	1
	Neg	0	29	1	22	2	28	1	19	1	37
Konkordancia		95,2%		97,6%		95,2%		97,6%		95,2%	

del = deletio (vesztés); FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; gain = többlet; MLPA = multiplex ligatiofüggő szondaamplifikáció; Neg = negatív; Poz = pozitív

A PCM klinikai menedzsmentjének szempontjából relevánsnak gondolt genetikai aberrációk száma még mindig egyre növekvő tendenciát mutat, amire a rutin patológiai diagnosztikának bizonyos mértékben, a hazai kezelési lehetőségeket és finanszírozási kereteket is figyelembe véve, válaszolnia kell. Ezzel a szándékkal történt meg a FISH-módszer céltudatos bevezetése a PCM diagnosztikájába, mellyel a leggyakoribb kiegyensúlyozott transzlokációk és kiegyensúlyozatlan kópiaszám-eltérések specifikusan kimutathatók. A jelen tanulmányban bemutatott, több mint egy évtized alatt összegyűjtött FISH-eredmények nagymértékű egyezést mutatnak korábbi, nemzetközi tanulmányok keretében nyert adatokkal, mind a vizsgált *IGH*-transzlokációk gyakorisága, mind a kópiaszámvesztések és -többletek előfordulása tekintetében [3, 20]. Az egyetlen kivétel ez alól az 1p-deletio volt, melynek optimális vizsgálatához a jövőben alternatív szonda vagy akár több szonda párhuzamos használata is szükséges lehet az egyes betegekben előforduló aberrációk jelentősen eltérő lokalizációja miatt. Technikai szempontból elmondható, hogy a FISH egyaránt alkalmazható csontvelői aspirátumon és perifériás vérmintán, ha pedig reprezentatív mintaként csupán crista biopsziás anyag áll rendelkezésre, szöveti körülmények között is.

A FISH-analízis lehetőségeit azonban korlátozza, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető szondák többsége reakcióként csak egyetlen aberráció kimutatását teszi lehetővé, a rendelkezésre álló sejtszuszpenzió/szövetminta mennyisége pedig gyakran limitált. Ez különösen igaz olyan esetekben, amikor a minta alacsony tisztasága miatt plazmasejtdúsításra van szükség. A mágneses plazmasejt-szelekcióval nyert eddigi tapasztalataink arra utalnak, hogy a módszer valóban képes jelentősen növelni a vizsgálandó sejtszuszpenzió tisztaságát, ezáltal lehetővé téve informatív genetikai vizsgálatok elvégzését. Az eljárás azonban jelentősen csökkentheti a minta mennyiségét, ezért a betegek hatékony genetikai karakterizálásához szükség lehet olyan módszerek alkalmazására is, melyekkel több genomikus locus vizsgálható egyidejűleg.

A kariotipizálás során lehetőség nyílik a teljes genom vizsgálatára, azonban a myelomasejtek korlátozott tenyésztethetősége és *in vitro* sérülékenysége miatt a vizsgálat korlátozott szereppel bír a plazmasejtes myeloma diagnosztikájában. Speciális tenyésztési körülmények nélkül a vizsgálat gyakran nem reprezentatív, hiszen a mintában lévő, nem neoplasztikus vérképző sejtek gyakran túlnövik a neoplasztikus sejteket. Kariotipizálással azonban lehetőség nyílik a teljes kromoszómakészlet átfogó analizésére, ezáltal olyan eltérések is felismerhetők vele, melyek kimutatását a rutindiagnosztikában alkalmazott célzott vizsgálatok nem teszik lehetővé. A mintáink 15%-ában észlelt komplex kariotípus megjelenése megfelel az irodalomban közölt gyakoriságnak; a jelenleg plazmasejtes myelomában is kedvezőtlen prognózissal társul [23]. A fentiek értelmében a célzott módszerek

használata mellett a csontvelői minták kariotipizálásának is van hozzáadott értéke a plazmasejtes myeloma genetikai diagnosztikájában.

A teljesgenom-szintű analízist biztosító, microarray-alapú és új generációs szekvenálási technikák magas költsége jelenleg nem teszi lehetővé azok széles körű alkalmazását a hazai molekuláris patológiai diagnosztikában. Az MLPA ebben a környezetben kézenfekvő alternatívának tűnik költséghatékonyasága, valamint viszonylag egyszerű és gyors kivitelezhetősége miatt. A módszer alkalmas a jelenlegi hazai kezelési protokollok mellett potenciális jelentőséggel bíró összes kiegyensúlyozatlan aberráció egyidejű kimutatására, ezáltal egyértelműen segíthetné a PCM-ben szenvedő magyar betegek mintáinak átfogóbb genetikai karakterizálását. Ezenkívül eredményeink alapján az MLPA genomikai feloldása néhány esetben lehetővé teheti olyan kis kiterjedésű aberrációk kimutatását is, melyek FISH-sel nem detektálhatók, igaz, a reakció elvégzéséhez a FISH-nél megszokottnál képest valamivel magasabb mintatisztaság szükséges (30% *versus* 20%), ami a plazmasejtek mágneses dúsításával az esetek több mint 90%-ában elérhető. Ugyanakkor a FISH képes a PCM genetikai karakterizálása szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró kiegyensúlyozott transzlokációk kimutatására, valamint egyedi sejtszintű vizsgálatra, mely segíthet a myelomás sejtpopuláció betegeken belüli heterogenitásának, klonális evolúciós folyamatainak feltérképezésében [24, 25]. A kariotipizálás mellett a jövőben ezért célunk a FISH és az MLPA együttes prospektív alkalmazása folyamatosan bővülő betegpopulációnkon, valamint az így nyert citogenetikai és molekuláris citogenetikai adatbázis összevetése a betegek által mutatott klinikai manifesztációval és terápiás válasszal.

Anyagi támogatás: A közlemény megírásához kapcsolódó munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH, K_16-119950, NVKP_16-1-2016-0004 és KH_17-126718 számú pályázata, a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programjának LP95021. számú pályázata és Bolyai János Kutatási Ösztöndíj programja, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-4-SE-62-es kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programja támogatta. Az MLPA-vizsgálatokhoz a szondakeveréket az MRC-Holland bocsátotta a szerzők rendelkezésére.

Szerzői munkamegosztás: A. D., K. B.: A tanulmány megtervezése és felügyelete. K. Sz.: Az adatok összegyűjtése és kiértékelése. H. B., H. D., K. L., Sz. E., J. P., A. H., Sz. K., A. D., K. B.: A vizsgálatok elvégzése és az adatok kiértékelése. K. Sz., A. D., K. B.: A kézirat megírása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek a közleményhez kapcsolódó közvetlen érdekltségeik nincsenek.

Irodalom

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375–2390.
- [2] Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010; 116: e56–e65.
- [3] Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 335–348.
- [4] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016; 91: 719–734.
- [5] Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012; 26: 349–355.
- [6] Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameje G, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97: 1272–1277.
- [7] Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol*. 2012; 21: 189–206.
- [8] Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research. [Multiplex ligatíofüggő szondaamplifikáció az oncohematológiai kutatásban és diagnosztikában.] *Orv Hetil.* 2018; 159: 583–592. [Hungarian]
- [9] McKenna RW, Kyle RA, Kuehl WM, et al. Plasma cell myeloma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds.) WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Mature B-cell neoplasms: plasma cell neoplasms. 4th edn. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008; pp. 202–208.
- [10] Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15: e538–e548.
- [11] Alpar D, de Jong D, Holczer-Nagy Z, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization are complementary techniques to detect cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 785–793.
- [12] Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, et al. High-throughput copy number profiling by digital multiplex ligation-dependent probe amplification in multiple myeloma. *J Mol Diagn*. 2018; 20: 777–788.
- [13] Varga G, Mikala G, Váróczy L, et al. Management of multiple myeloma in Hungary in 2016. [A myeloma multiplex megközelítése Magyarországon 2016-ban.] *Orv Hetil.* 2016; 157: 123–137. [Hungarian]
- [14] Avet-Loiseau H. Ultra high-risk myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 489–493.
- [15] Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014; 5: 2997.
- [16] Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 3911–3920.
- [17] Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4585–4590.
- [18] Jacobus SJ, Kumar S, Uno H, et al. Impact of high-risk classification by FISH: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E4A03. *Br J Haematol*. 2011; 155: 340–348.
- [19] Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* 2012; 119: 2100–2105.
- [20] Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14: 100–113.
- [21] Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; 28: 269–277.
- [22] Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; 127: 2955–2962.
- [23] Nemeč P, Zemanova Z, Kuglik P, et al. Complex karyotype and translocation t(4;14) define patients with high-risk newly diagnosed multiple myeloma: results of CMG2002 trial. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 920–927.
- [24] Nagy Z, Kajtár B, Jáksó P, et al. Evolutionary sequence of cytogenetic aberrations during the oncogenesis of plasma cell disorders. Direct evidence at single cell level. *Leuk Res*. 2011; 35: 1114–1116.
- [25] Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 1067–1076.

(Kajtár Béla dr.,
Pécs, Szigeti út 12., 7624
e-mail: belakajtar@yahoo.com)