

XXXII. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

**Kromoszómaszám-változások és kromoszomális
instabilitás magas hiperdiploid pre-B-sejtes gyermekkori
akut limfoblasztos leukémiás betegeknél**

Készítette:
Varga Dániel
Biológus MSc hallgató

Témavezetők:
Dr. Mátics Róbert
Prof. Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem



Pécs, 2015.

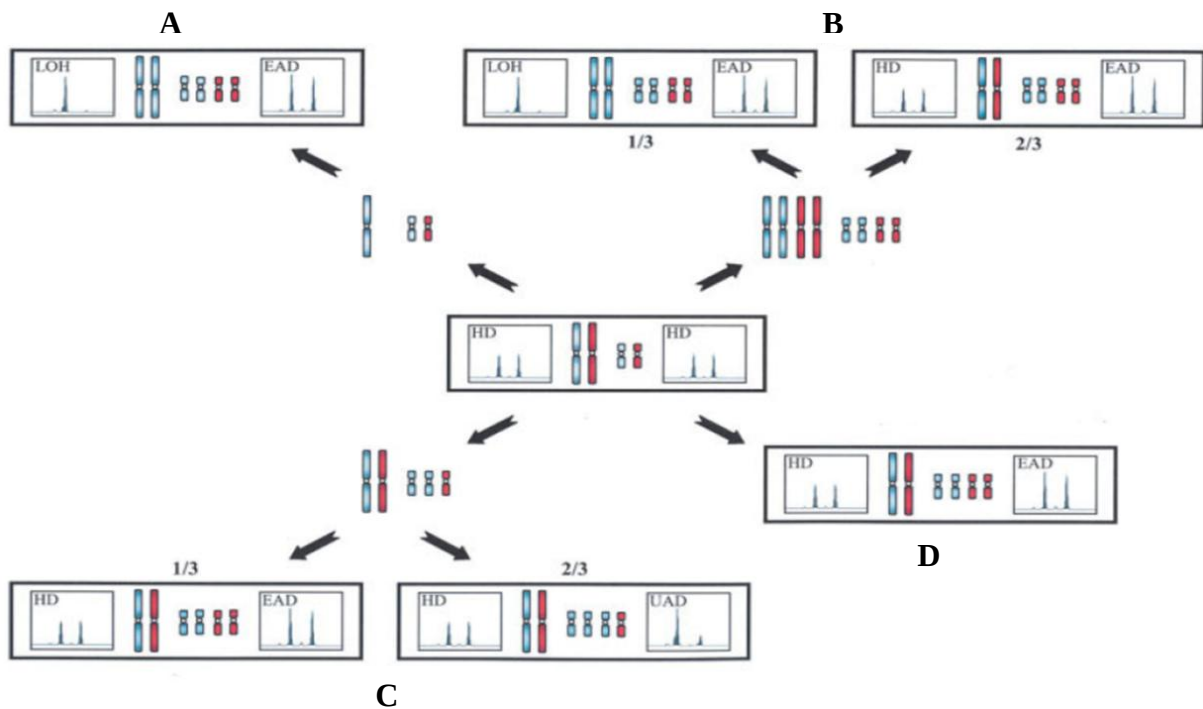
Tartalom

Bevezetés.....	3
Célkitűzés.....	5
Anyagok és módszerek.....	6
Minták	6
FISH próbák	6
A MiFISH minták értékelése.....	7
Statisztikai elemzés	8
Eredmények.....	9
Diskusszió.....	15
Összefoglalás.....	17
Köszönetnyilvánítás	18
Irodalomjegyzék.....	19
Függelék	23
Tételes szerzői hozzájárulás	28

Bevezetés

Már az 1970-es években meghatározásra került a hiperdiploid (HD) pre-B gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (B-pALL), míg a magas hiperdiploid (HeH) kategória csak a 80-as évek közepe táján különült el a hagyományos citogenetikai analízis (CCA), valamint a DNS-citometria felhasználásával [1-10.]. Később, a kezelésre adott válasz alapján, az alacsony hiperdiploid (HeL) kategória is elkülönült. A két alcsoportot a modális szám (MN) alapján különböztetik meg, mely az alacsony hiperdiploidok esetében 47-50 kromoszómát jelent, míg a magas hiperdiploid alcsoport esetében ez 51-67. B-pALL betegek esetében ez utóbbi csoportnak a legnagyobb az előfordulási aránya, mintegy 25-30% [11-13]. A HeH alcsoport tovább rétegezhető. Egyes betegek, melyek DNS-indexe (DI) nagyobb, mint 1,16, modális számuk 56 és 67 közötti, háromszoros triszómiát hordoznak (TT; +4, +10, +17) vagy duplán triszómiások (DT; +4, +10), esetleg egyszeresen triszómiások a 18-as kromoszóma tekintetében, lényegesen nagyobb eséllyel gyógyulnak ki a betegségből, igaz, ezeknek a kérdéses jelenségeknek a megválaszolására még nem sikerült konszenzusra jutni [14-17]. Nemrégiben fény derült arra is, hogy azoknak a HeH betegeknek, akiknek modális száma 58, lényegesen jobb a prognózisuk, mint bármely más citogenetikailag elkülönített alcsoporté, vagy azoké, akik ugyanebben az alcsoportban szintén magas modális számmal és tripla triszómiával rendelkeznek [18-19]. Ezek az adatok mind azt jelzik, hogy a kromoszóma-aberrációk elsődleges jelentésű tényezők a betegség folyamán.

A kromoszómák nem-véletlenszerű nyerődésének patogenetikai következményei nem ismertek [20]. Mechanizmusukról javarészt semmit sem tudni, legalábbis az eddigi adatok ellentmondásosak, mivel kialakulásuk okát négy, csak részben átfedő elméleti vonal is megkísérli magyarázni. Az első megközelítés azt feltételezi, hogy a kezdeti haploid-közeli állapotot a kromoszómaszett megduplázódása követi, a második az előbb tetraploidizációval megsokszorozódott kromoszómák némelyikének későbbi elvesztésével magyarázza a betegség kialakulását. Egy további elmélet szerint az egymást követő sejtosztódások során szekvenciális kromoszómamennyiségek zajlanak, míg az utolsó elmélet egyetlen aberráns mitózis során egyidejűleg kialakuló kromoszómák megjelenését feltételezi (1. ábra) [21-24].



1. ábra: Négy elmélet a kromoszómaszám-változásokra. A: kezdeti haploid-közeli állapot, majd duplikáció; B: tetraploidizáció, később egyedi kromoszómavesztések; C: az egymást követő mitózisok során szekvenciális nyerések; D: szimultán nyerések kromoszómánként (Paulsson et al.[23]).

Jól ismert tény, legalábbis az 51-54-es modális számmal rendelkező HeH B-pALL betegek esetében, hogy a 4-es, 6-os, 10-es, 14-es 17-es, 18-as, 21-es és X kromoszómák a legérzékenyebbek a nyeréseket illetően, közel 100%-os incidenciával és gyakorta 21-es tetraszómiával [12, 25]. Összességében, a mai prenatális patológiai szakirodalomban a HeH B-pALL kialakulásának okaként az egyetlen rendellenes mitózis miatt egyidejűleg kialakuló többletkromoszómák megjelenését (4. elmélet) szokás emlegetni, nem pedig a kromoszómális instabilitást (CIN) [13, 25].

A nyolc leggyakrabban érintett kromoszóma kópiaszámának eltéréseit (CNAs) vizsgáltuk 89 kezelt HeL és HeH B-pALL beteg csontvelőmintájának különálló sejteiben 2x4 színű multitarget interfázisos fluoreszcens in situ hibridizáció (MiFISH) és számítógépes mikroszkópos munkaállomásának segítségével. A nyolc paraméteres korrelált adatok nem csak a kromoszómanyeréseknek és a kromoszómális instabilitásnak hierarchikus vizsgálatát tették lehetővé számunkra, hanem a klonális heterogenitását és evolúcióját is, melyekből következtetni lehet a kromoszómanyerések patomechanizmusára.

Célkitűzés

Kutatásunk célja:

- tisztázni, hogy a hiperdiploid pre-B-sejtes gyermekkori akut limfoblasztos leukémia mely pathomechanizmussal alakul ki:
 - kezdeti haploid-közeli állapot, majd duplikáció,
 - tetraploidizáció, később egyedi kromoszómavesztések,
 - az egymást követő mitózisok során szekvenciális nyerések,
 - szimultán nyerések kromoszómánként;
- megvizsgálni, hogy a kromoszómanyerések véletlenszerűek vagy hierarchikusak-e;
- képet kapni a maladaptív radiáció és a szelekció szerepéről a B-pALL szomatikus evolúciójában.

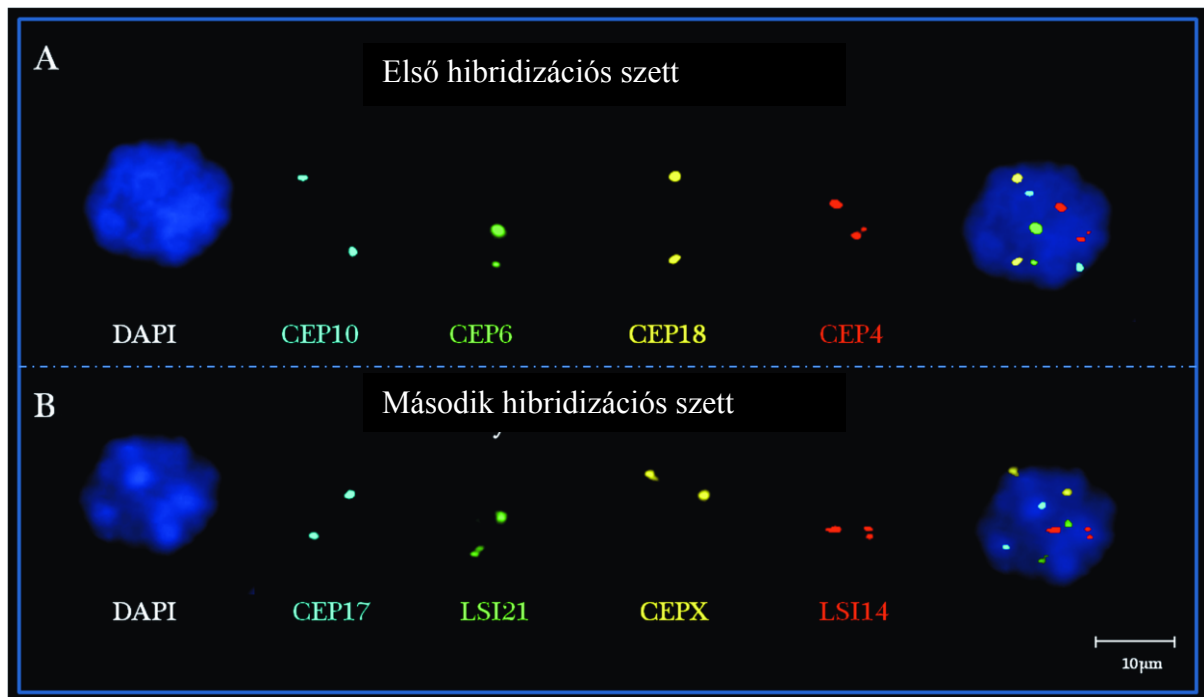
Anyagok és módszerek

Minták

Összesen 214 B-pALL csontvelői sejtminta került vizsgálatra, melyek közt a nemek aránya 105 nő és 109 férfi volt, az átlagos életkor pedig 5,9 év. A betegség 194 esetben *de novo*, 20 esetben pedig visszaeső állapotú volt. A tanulmányhoz jóváhagyását adta a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjának Etikai Bizottsága, továbbá írásos beleegyezésüket a páciensek szülei vagy gyámjai. A vizsgálat megfelelt a Helsinki Nyilatkozatban elvártaknak. A diagnózis a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjának Patológiai Intézetében, morfológiai, fenotípusos és genotípusbeli kritériumok szerint zajlott [26,27]. Csak azon minták elemzése folytatódott, amelyek hiperdiploid (HD) státuszúak voltak és negatívak a t(9;22)(q34;q11.2) (BCR-ABL1 génfúzió), t(v;11q23) (MLL átrendeződés), t(12;21)(p13;q22) (ETV6-RUNX1 génfúzió) és a t(1;19)(q23;p13.3) (TCF3-PBX1 génfúzió) kariotípusra.

FISH próbák

Laborunkban rendelkezésünkre álltak a 4-es, 6-os, 10-es, 17-es, 18-as és X kromoszómák centromer jelölési szondái (CEP), míg a 14-es és 21-es kromoszómákhoz lókuszspezifikus azonosítókat (LSI) terveztünk a <http://www.ensembl.org/>, <http://genome.ucsc.edu/>, <http://projects.tcag.ca/efish/>, és a <http://bacpac.chori.org/> oldalak információi és szoftverei segítségével [28-34]. Korábbi összehasonlító genomi hibridizációs illesztéseink alapján azok a BAC klónok kerültek kiválasztásra, melyek a 14-es kromoszóma (25,309,486–26,165,333) és a 21-es kromoszóma (38,801,781–39,646,010) stabil régióit lefedték. A CEP és LSI próbák szenzitivitását és specificitását valamint jelminőségét összehangolt irányelvek szerint vizsgáltuk metafázisos preparátumokon [35]. A próbák és a fluorofór jelölők különböző kombinációit interfázisos FISH-sel teszteltük, hogy a reakció körülményeit (FISH-jelek intenzitását, fluoreszcencia erősségét, a próba mennyiségét és hibridizációját) optimalizáljuk. A fentiek eredményeként az első szett próbái a CEP4 (vörös), a CEP6 (zöld), CEP10 (aqua) és a CEP18 (arany), míg a második készlet próbái az LSI14 (vörös), az LSI21 (zöld), a CEP17 (aqua) és a CEPX (arany) voltak (2. ábra).



2. ábra: A célsejtek 2x4 iFISH jelölései. A: az első szett (CEP szett) próbái a CEP4 (vörös), a CEP6 (zöld), CEP10 (aqua) és a CEP18 (arany). B: a második szett (LSI & CEP szett) próbái az LSI14 (vörös), az LSI21 (zöld), a CEP17 (aqua) és a CEPX (arany). DAPI: magfestés.

A MiFISH minták értékelése

Minden egyes többszínű jelölés után a metszeteket Zeiss Axioplan-MOT II. (Feldbach, Németország) segítségével elemeztük. A mikroszkóp fel volt szerelve egy számítógép-vezérelte, motorizált szkennelőállomással, egy X-Cyte fém-halogenid lámpával, mely a fényt kvarc optikai szálakkal transzmittálja, szűrőkkel továbbá egy hűtött CCD kamerával. A rendszert a MetaCyte és Isis modulokból álló Metafer 4.0 szoftver kontrollálta (Metasystems GmbH, Altlussheim, Németország). Miután a négy próba első szettje hibridizációra került, a metszeteket a fentebb leírt alapvető sejtmag felismerő morfolometriai paraméterek alapján azonosítottuk, és mintánként 1000 önálló magot rögzítettünk a DAPI csatorna képei és a pontos 3D-s koordináták alapján [36,37]. A jelző minták értékelését kézzel rögzítettük a felvett populációkon és az elemzést addig folytattuk, amíg legalább 300 mag világos jelzése nem került rögzítésre (mind a négy jelzőcsatorna esetén). Egy vagy több csatorna elégtelen jelzése esetén a sejtet kizártuk a további vizsgálatból. A FISH próbák második hibridizációja után, a metszetek vizsgálata a korábban azonosított sejtek félautomata áthelyezésével történt, amelyek lehetővé teszik a nyolc próba iFISH vizsgálatát az egyes sejtek szintjén. Az adatok elemzése során csak azokat a sejteket vettük figyelembe, melyek legalább egy értékelhető jelet mutattak mind a nyolc próba esetében. A kontroll kísérlet során 19 egészséges önkéntes

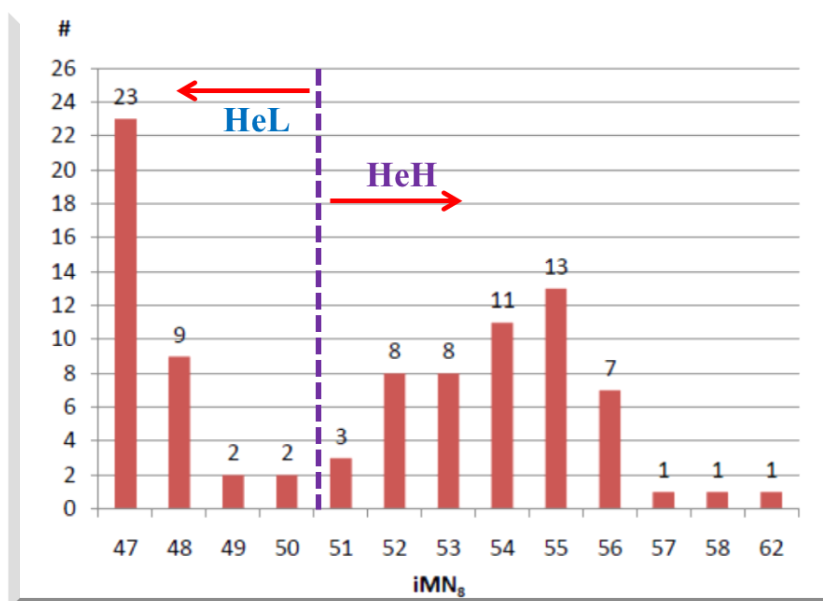
hatszáz perifériás vérsejtjét hibridizáltuk pontosan ugyanazokkal a 2x4 DNS-markerekkel, majd három képzett kutató függetlenül értékelte az egyes kromoszómákat.

Statisztikai elemzés

A jel pozitivitás cut-off értékeinek meghatározására Poisson-eloszlás alapján került sor (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) a normális diploid kontrollsejtek alapján a fent leírtak szerint. A beteg minták esetén az aneuploidia kombinációkat tekintettük relevánsnak, ha minden aneuszómia szint a kijelölt cut-off értéken túlnak bizonyult. A klonális evolúció matematikai modellezésére klaszter- és hálózatanalízis szoftvereket (MEGA 5 és NETWORK 4.6.1.) használtunk, Steiner-fa paramétereket számítottuk [38,39]. A klaszter- és hálózati elemzéseket a betegek mindkét alcsoportjában elvégeztük, betegenként figyelembe véve az összes egyedi szubklónt, vagy csak azokkal dolgoztunk, amelyeket legalább két sejt reprezentált.

Eredmények

Kétféle szubklónt azonosítottunk a leukémiás mintákban: (i) olyan szubklónokat, amelyeknél az össz-kromoszómaszám azonos, (ii) illetve olyan egyedi szubklónokat, amelyek olyan sejtek csoportjaként definiálhatók, amelyek tökéletesen azonos konstellációval rendelkeznek a nyolc vizsgált kromoszómát tekintve, a 2x4 iFISH vizsgálat alapján. A kromoszómaszám alapján definiált szubklónt ennek megfelelően több egyedi szubklón alkothatja. Először a kromoszómaszám növekedése alapján definiált szubklónok kerültek elemzésre páciensenként. Minden egyes leukémiás minta esetében megkaptuk azon szubklónok előfordulási gyakoriságát, melyek különfélék kromoszómaszám és modális szám (MN) tekintetében, amely úgy definiálható, mint a leggyakoribb klón kromoszómaszáma. Mivel ebben a tanulmányban csak nyolc kromoszóma került vizsgálatra, az iMN_8 megjelölést (az MN értéke az interfázisban, FISH-sel azonosított nyolc kromoszóma esetén) vezettük be, megkülönböztetendő ezt az MN értéket a hagyományos, metafázisos analízis során meghatározott MN értéktől. E paraméterek szerint, a 214 leukémiás mintából 89 (41,6%) bizonyult hiperdiploidnak (HD, $iMN_8 \geq 47$) rekurrens genetikai rendellenességek nélkül, ahogy az fentebb leírtuk. Ezek közül 36 (a HD betegek 40,4%-a illetve az összes beteg 16,8%-a) volt HeL (iMN_8 47-50), míg 53 (a HD betegek 59,6%-a és az összes beteg 24,8%-a) volt HeH (iMN_8 51-67, a legmagasabb MN érték a sorozatban 62). Az iMN_8 értékek bimodális eloszlást mutattak, a HeL csoport esetében 47-es, HeH esetében 55-ös csúccsal (3. ábra).

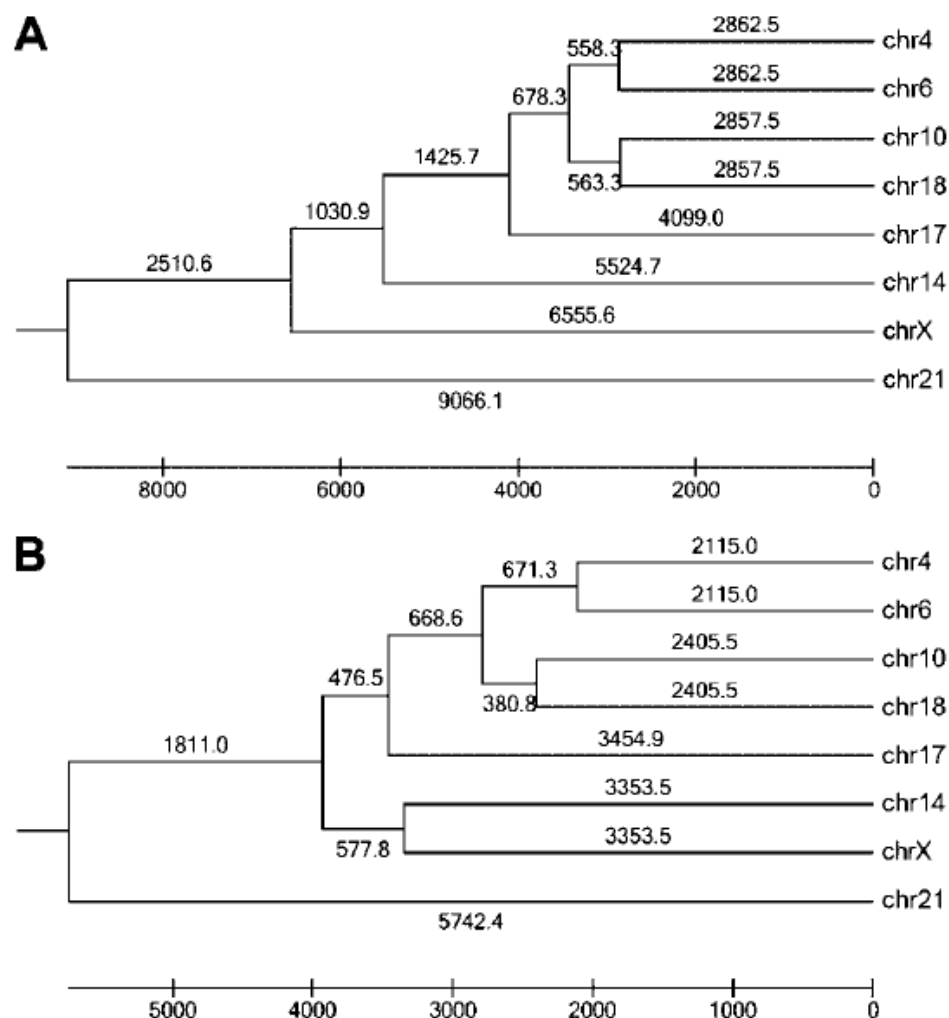


3. ábra: Az iMN_8 értékek bimodális gyakorisági eloszlása a 89 HD leukémiás mintában. Jól megfigyelhető a 47-es HeL és az 55-ös HeH csúcs, köztük a 49-50-es árokkal.

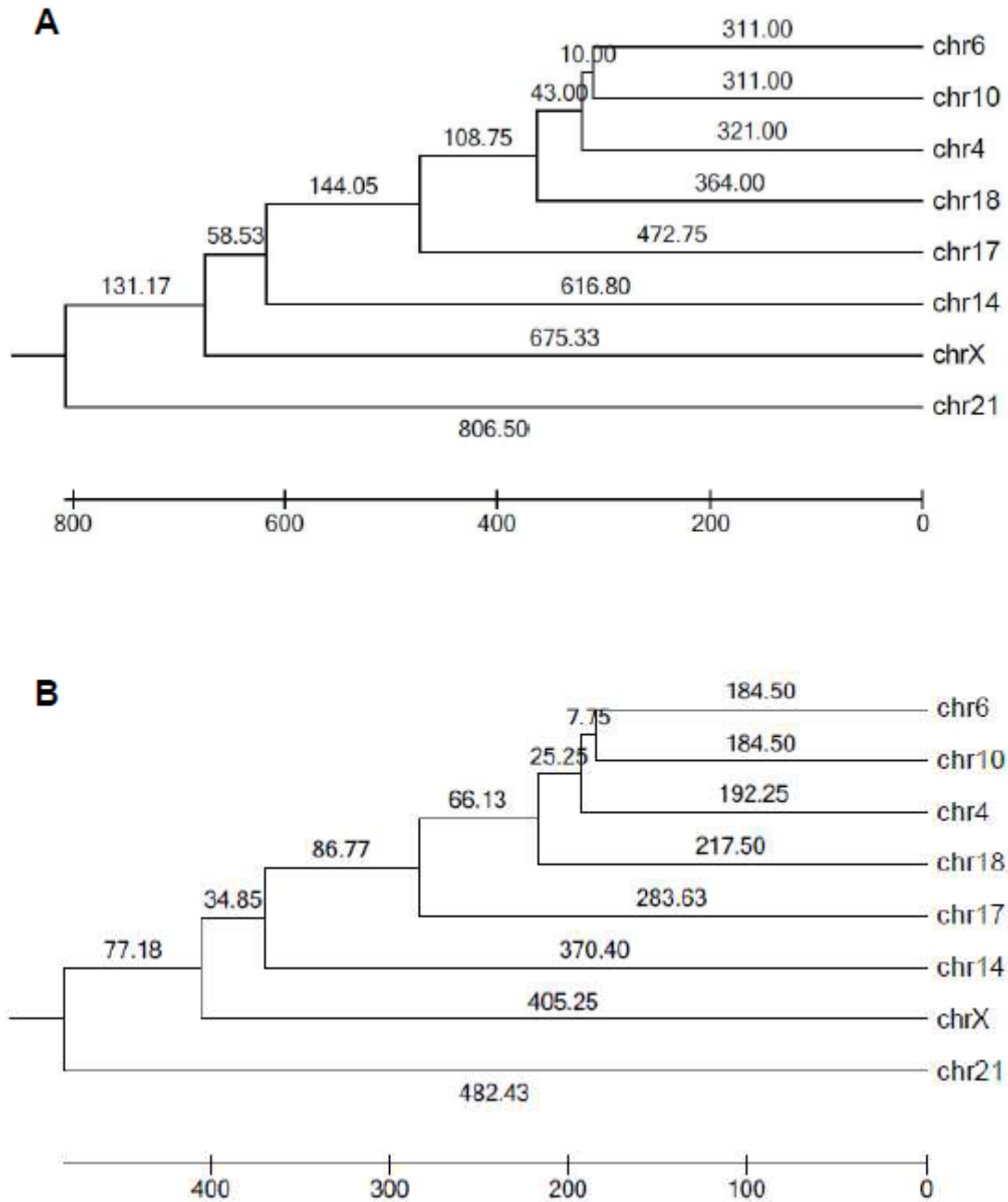
Az egyes célkromoszómák kromoszomális instabilitása (CIN) is vizsgálatra került a betegeknél az iMN₈ függvényében a HeL és HeH B-pALL minták között. Az egyedi szubklónok alapján minden egyes kromoszóma modális kromoszómaszáma (M) meghatározásra került, ezen felül azon sejtek frakcióját (F) is számoltuk, amelyek kromoszómaszáma különbözik az előbbiektől. Az átlagos CIN érték (azaz az eltérő sejtek aránya) a HeL és HeH mintákban 0,13 és 0,23 volt (0,01 - 0,46 és 0,04 - 0,45 rangeben) az egyes betegeknél mind a nyolc kromoszóma tekintetében, illetve 0,07 - 0,20 és 0,16 - 0,30 range-ben a specifikus kromoszómákra azoknál a leukémiásoknál, melyeknél változó volt az iMN₈ érték.

A sejtek kromoszómaszámának vizsgálata feltárta, hogy az átlagos szubklónszám a HeL és HeH leukémiás minták között 6,9 illetve 10,2 volt. Ebben a két csoportban a domináns szubklónok alkották átlagosan a tumor sejtek 49, valamint 34%-át (1. és 2. kiegészítő táblázat). A különböző leukémiás minták szubklónjainak gyakorisági eloszlása három mintázatot mutat: (i) a haranggörbe alakú eloszlás, mely lehet keskeny vagy széles alapú; (ii) más esetekben a köztes szubklónok fokozatossága figyelhető meg a HeL és HeH állapotok között; és (iii) az esetek egy jelentős részében egyértelműen bimodális mintázat látható a HeL és HeH szubklónok többletével (1.A kiegészítő ábra). Különleges kapcsolatra derült fény az iMN₈, a szubklónok típusai és a kromoszómákra vetített modális szám között. Nem figyeltük meg sem a közel-tetraploid sem a közel-haploid leukémia közvetett jeleit. A HeH leukémiás gyűjtemény négy visszaeső leukémiást is tartalmazott. Mindegyik esetben kiújultak ugyanazok a fenotípusos jellemzők, de egyiküknél sem volt ugyanaz az iMN₈. A következőket figyeltük meg: ID1 és 2 esetében az iMN₈ 56 az 54 ellenében; ID5 és 6 esetén 53 vs. 54; ID7 és 8-nál 54 vs. 52; míg ID9 és 10 esetében 55 vs. 57. Annak érdekében, hogy kiderüljön: az egyedi kromoszómaszettek hozzárendelhetők-e az iMN₈ értékhez, az egyes kromoszómák nyerődéseinek gyakorisági eloszlását vizsgáltuk meg. A HeH csoportban, különösen az iMN₈ 51-54 csoportnál, az egyes, azonos iMN₈ értékű leukémiások különböző kromoszómái az aneuploidia rendkívül széles gyakorisági értékeit mutatták (0-10%-tól 80-100%-ig), különösen a 4-es, 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, és kisebb mértékben a 18. kromoszómát illetően. Ez a 21-es és az X kromoszóma esetében nem volt megfigyelhető. A HeL-csoportban, a vizsgált kromoszómák szintén változó nyeréseket mutattak, de alacsonyabb gyakorisággal (3. kiegészítő táblázat).

Ahhoz, hogy az egyes leukémiás minták kromoszómanyeréseinek konkrét sorrendjét tisztázzuk, az egyéni szubklónok felhasználásával klaszteranalízist hajtottunk végre. Az egyes betegek kromoszómanyeréseinek sorrendje igen változatos, ám a 21-es és/vagy az X kromoszóma mindig a fák alapját (base of the tree) képezik. Az összes HD és HeH beteg összegzett klaszterei nagyon egységes mintázatot mutattak minden algoritmus segítségével (MEGA 5: NJ, UPGMA és ME). A 21-X-14-csoport képezi a fa alapját; a 10-es és 18-as kromoszómák együtt alkotnak egy második csoportot; a 4-es és 6-os kromoszómák egy újabb klaszterbe sorolhatók, míg a 17-es kromoszóma, nem következetesen, az utóbbi kettő valamelyikéhez sorolódott. A két adatbázis elemzése (minden egyedi szubklónt illetve csak az egynél több példányban reprezentált szubklónokat alapul véve), azonos eredményt adott: a fa alapját képező három kromoszóma ugyanaz, és a későbbiekkel is csak kisebb eltérések figyelhetők meg (4. és 5. ábra; 1.C kiegészítő ábra).

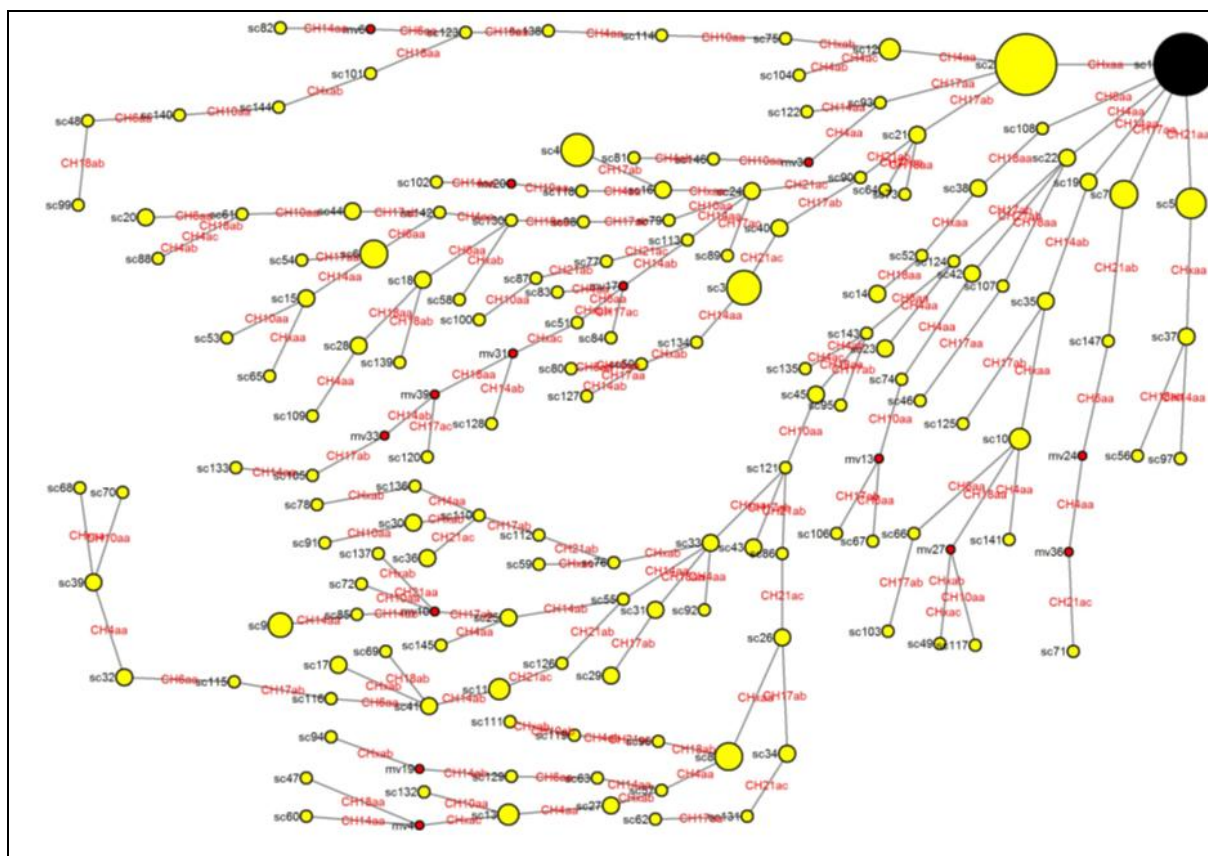


4. ábra: A kromoszómák nyerésének UPGMA klasztere minden HD beteg (A) illetve csak a HeH betegek (B) összes egyedi szubklónja alapján.



5. ábra: A kromoszómák nyerésének UPGMA klasztere minden HD beteg (A) illetve csak a HeH betegek (B) legalább két sejt által reprezentált szubklónjai alapján.

A nyolcparaméteres korrelált adatbázis alapján meghatározott egyedi szubklónokat hálózatanálízishez használtuk (6. ábra; 1.B kiegészítő ábra).



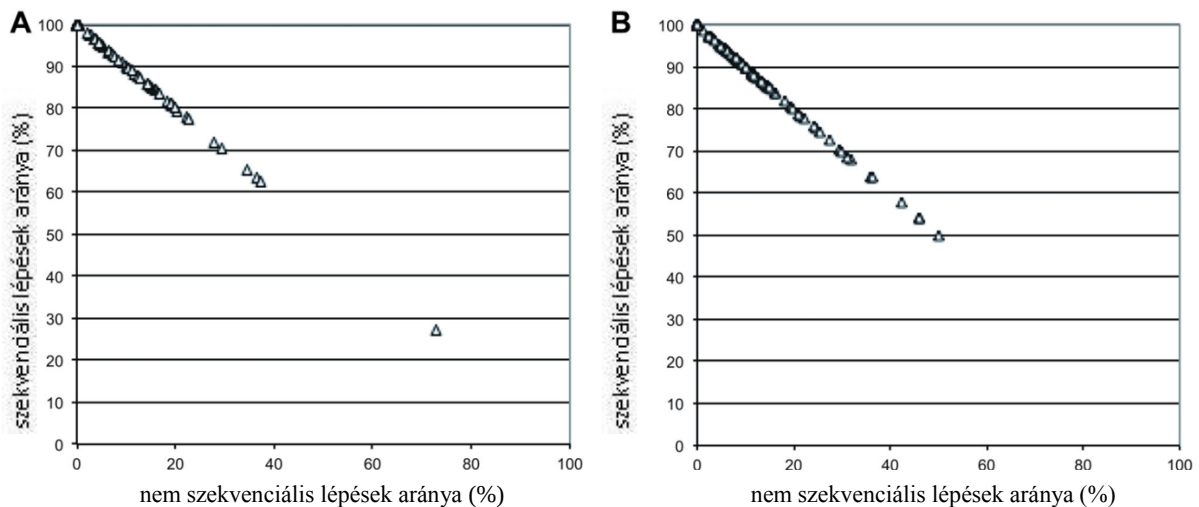
6. ábra: a 29-es beteg egyedi szubklónjainak Steiner-fája. A sárga körök jelölik az egyes szubklónokat (sc1, sc2, stb.), átmérője arányos az adott konstellációval rendelkező klónok számával. Az összefüggő szubklónokat vonalak kötik össze, melyen az érintett kromoszóma (CH#) és a nyeres típusa van feltüntetve: aa jelöli a diszómia-triszómia átmenetet, ab pedig a triszómia-tetraszómia átmenetet és így tovább. A vörös foltok mediánvektorokat jelölnek, melyek olyan szubklónokat reprezentálnak, amik nincsenek, vagy nem kerültek elő. A fekete folt a „kiindulópont”, az a sejt, mely (iMN₈ szerint) normál kariotípussal rendelkezik.

A HD betegek iMN₈ indexei korreláltak a megtalált egyedi szubklónok számával (az összes és az egysejtes klónok kizárása utáni esetben is ($r = 0.423$, $P < 0,001$ ill. $r = 0.395$, $P < 0,001$)), és - ennek megfelelően - a Steiner-fa hosszával is ($r = 0.387$, $P < 0,001$ ill. $r = 0.467$, $P < 0,001$). Az egyedi szubklónok számának átlaga szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabbnak bizonyult a HeH-csoportban a HeL csoporthoz képest minden szubklónt figyelembe véve, és az egysejtes klónok kizárásával egyaránt (73.6 [range: 14-187] vs 39.6 [range: 2-170] és 26.7 [range: 4-55] vs 15.3 [range: 2-45]). A Steiner-fához tartozó különböző paramétereket az 1. táblázat tartalmazza. Ezek az eredmények jól mutatják a szomatikus evolúció során lezajló maladaptív radiáció kiterjedt mivoltát.

1. táblázat: Az egyedi szubklónok számának és a Steiner-fa vonatkozó adatainak korrelációja a leukémia alcsoportjaiban.

	HD		HeL		HeH	
	r	P	r	P	r	P
Klónszám vs. Steiner-fa hossz						
Minden kariotípus	0.977	<0.001	0.978	<0.001	0.981	<0.001
Egysejtesek kizárásával	0.977	<0.001	0.981	<0.001	0.964	<0.001
"Szimultán" mutációk vs. Steiner-fa hossz						
Minden kariotípus	0.798	<0.001	0.897	<0.001	0.774	<0.001
Egysejtesek kizárásával	0.494	<0.005	0.504	<0.05	0.368	<0.01
Klónszám-1 / Steiner-fa hossz						
Minden kariotípus	0.848		0.797		0.868	
Egysejtesek kizárásával	0.907		0.936		0.897	

Mind a HD, mind a HeL és HeH csoportokban, az egyedi szubklónok tényleges száma lineárisan korrelált a a legrövidebb fa mutációinak összes számával (azaz a Steiner-fa hosszával). Ezenfelül a feltételezett szimultán (valójában csak "szimultán") mutációk száma lineárisan korrelált a Steiner-fa hosszával. A detektált klónszám-1 és a Steiner-fa hossza közötti arány a különféle leukémiás alcsoportokban tájékoztató jellegű a szekvenciális vagy a szimultán mutációk gyakoriságára vonatkozóan. Ezen arányok átlaga nagyon hasonlóan bizonyult a különböző alcsoportokban, még azután is, hogy az egyetlen sejtben képviselt egyedi szubklónokat kizártuk (tartomány: 0,8-0,9) (7. ábra).



7. ábra: A HD betegek szekvenciális nyeréseinek százalékos aránya a „szimultán” nyerések százalékos arányának függvényében a fellelt egyedi szubklónok számaránya szerint. A: egynél több sejtben reprezentált szubklónok esetén (átlag: 90,7%); B: az összes szubklón esetén (átlag: 84,8%).

Diszkusszió

A kaukázusiak között a magas hiperdiploid (HeH) leukémia (MN 51-67) képviselte a pre-B gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (B-pALL) legnagyobb altípusát [12,13,25,40]. A citogenetikai, klinikai és genetikai vizsgálatok hosszú történetének ellenére nem született konszenzus további klinikai és terápiás szintek, a kromoszómaszett kóros megnövekedésének jelentősége, vagy az aneuploidia mechanizmusa tekintetében, [14-18,20]. Ez a vizsgálat megkísérelt rávilágítani a HD leukémia kromoszómanyeréseinek mechanizmusára, kialakulására és evolúciójára.

Az iMN₈ értékek előfordulásának gyakorisága az általunk vizsgált nyolc leggyakrabban érintett kromoszóma esetén jól korrelált a kariotipizálásból származó adatokkal [7,13,15]. Módszereink alkalmazásával, mint például a szubklónok kromoszómanyerések számának meghatározása és minden egyedi vagy legalább két sejttel reprezentált szubklónok számbavételével, a szubklonális landscape nagy heterogenitást mutatott. Az első megközelítés szerint a domináns klónok csak körülbelül a felét vagy harmadát teszik ki a leukémiásoknak a HeL és HeH alcsoportokban. Ez az adat alátámasztja a néhány, genetikailag nem szubtipizált B-pALL beteg négy kromoszómáját vizsgáló iFISH tanulmányt, de szemben áll legnagyobb elérhető CCA adatbázissal, melynél az esetek 84%-ánál csak egyetlen sejtet vizsgáltak [12,42,43]. A CCA és iFISH adatok közötti eltérés magyarázható a CCA eljárás esetén feltételezhetően fellépő eltérő szubklonális növekedési előnyökkel, melyek klónszelekciót eredményeztek, valamint a célzottabb iFISH tanulmány jóval magasabb reprezentációjával. A CCA megfelelne a korrelált adatgyűjtéshez, feltéve, hogy az feltűnteti a minta összes normális és genetikailag abnormális klónját, ám úgy tűnik, nem ez a helyzet. A CCA szelektív felismerő funkciójának ellenére, a CCA adatok nagy tömegét összegezve meghatározhatók egy adott betegség, mint például a HeH B-pALL, tipikus genetikai aberrációi. Ez azonban nem kompenzálja a sejt-specifikus genetikai adatok hiányzó összefüggéseit [44]. Ezek lehetnek az okai, hogy az új technológiák eredményei alapján a CCA szerinti kvázi monoklonális jelleg a B-pALL esetében biztosan nem tartható [41].

Az iMN₈ kategóriák szerinti önálló kromoszómanyerések gyakorisági eloszlása alapján kiderült, hogy azonos iMN₈ kategóriában nem ugyanazon kromoszómaszettek felelősek a nyerési mintázatokért. Ez az eredmény és a klaszteranalízisünkből levont következtetések, miszerint csak a kromoszómák töredéke változik csoportosan, arra utalnak, hogy folyamatos, egymást követő kromoszómaszámbeli változások játszanak szerepet a leukémia

pathogenezisében. A hálózati elemzések további bizonyítékként szolgálnak erre a patomechanizmusra. A Steiner-fa reprezentálja a legrövidebb lehetséges utat, hogy egyetlen faként ábrázolhassuk egy adott beteg különböző szubklónjait. A lineáris, nem pedig logaritmikus kapcsolat a Steiner-fa hossza, valamint az egyedi konstellációkkal és „szimultán” mutációkkal rendelkező szubklónok száma között, azt mutatja, hogy kromoszomális változások főként egymás után, egyenként, azaz szekvenciálisan következtek. A detektált egyedi szubklónok aránya-1 és a Steiner-fa hossza közötti arány 1,00, ha minden mutáció szekvenciális és 0,00-hoz tart, ha az összes mutáció egyidejű. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a numerikus aberrációk körülbelül 90%-a szekvenciálisan történt. Bár ezek lehetnek nyerések vagy veszteségek, mindkét esetben valószínű, hogy a jelenség szelekciós nyomás által vezérelt nem véletlenszerű folyamatoknak tudható be. Mivel a korábbi allélikus dózis analízisek és a CCA vizsgálat kizárták a poliploidizációt és az azt követő kromoszómavesztést, azt jelzik, hogy a kromoszómák egymást követő, szekvenciális nyerése marad a potenciális patogén útvonal. Ezt bizonyítja az is, hogy az alacsonyabb MN-nél nyerődött kromoszómák megmaradnak, miközben az MN növekszik, továbbá az itt bemutatott szubklónok gyakori bimodális eloszlása miatt úgy véljük, az adatok inkább szekvenciális nyeréseket, semmint vesztést jeleznek az érintett kromoszómák esetében [21,23,24,25]. A növekvő MN-értékek esetében – egy pont után – a klónszám viszont csökkenni kezd, ami szelekciós erők hatására utal.

Mindezeket összevetve kijelenthetjük, hogy:

- a klonális evolúció preB pALL esetében szekvenciális kromoszómayerések útján történik, ami nagy számú szubklón maladaptív radiációját okozza.
- a szimultánnak tűnő nyerések igen nagy valószínűséggel mintavételi hiba következményei.
- a nyerődések „sorrendje” nem véletlenszerű, a 21-X-14 csoport tagjai nagyobb eséllyel, a 10-17-18 kisebb, a 4-6 pedig még kisebb eséllyel nyerődnek átlagosan, de betegenként ez különböző lehet.

Összefoglalás

A kromoszómaszám alapján átlagosan 6,9 és 10,2, míg egyedi konstellációval 15,3 és 26,7 szubklónt lehetett azonosítani a betegség HeL és HeH alcsoportjaiban. A klaszteranalízis kimutatta, hogy a kromoszómák kópiaszámának eltérései (CNAs) erősen konzerváltak voltak, a network-analízis szerint pedig az összes számbeli rendellenesség 80-90%-át szekvenális kromoszómaszám-változásokkal lehet magyarázni. A leukémia mindkét alcsoportjában szignifikánsan kimutatható a kromoszómális instabilitás, ezenfelül a szubklónok segítségével a betegség szomatikus evolúciójára is új predikciók állíthatók fel.

Az új megközelítéssel előállított adatok azt jelzik, hogy a kromoszómális instabilitás - mely a szubklonális landscape heterogenitását okozza -, a kromoszómaszámok szekvenciális változása, az így kialakuló maladaptív radiáció és az ezt követő (kontra)szelekció egyaránt döntő, de nem kizárólagos szerepet játszanak a HeH B-pALL pathomechanizmusában, és minőségileg nem, de mennyiségileg különböznek a HeL B-pALL pathomechanizmusától.

A jövőben, ezen leukémiák kromoszómális szegregációs gépezetét vizsgálva azonosíthatunk bizonyos hibákat, melyek talán egy újfajta terápia esetleges célpontjai lehetnek [44]. Ezen túlmenően, a korrelált kromoszóma adatok analízise lehetővé teszi számunkra, hogy meghatározzunk egy, pusztán három próbából álló szettet, amely közel 100%-os specificitással és érzékenységgel képes megjósolni a HeH állapotot, amelyet már korábban is megpróbáltak a CCA adatok alapján [46].