

Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval

Kiss Richárd^{1,*}, Papp Gergő², Krizsán Szilvia¹, Kotmayer Lili¹,
Gángó Ambrus¹, Nagy Noémi¹, Bátai Bence¹, Mátrai Zoltán³,
Bödör Csaba¹, Alpár Donát¹

¹MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport,

I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

²I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

³Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Budapest

A krónikus limfocitás leukémia klinikailag heterogén megjelenése genetikai diverzitással párosul. Hazánkban fluoreszcens *in situ* hibridizáció terjedt el a betegekben előforduló, prognosztikai jelentőséggel bíró kiegyensúlyozatlan abnormalitások analizéséhez. A jelenleg szűrt markerek alacsony száma miatt a módszer alábecsülheti a vizsgált leukémiás sejtpopuláció genetikai komplexitását. Tanulmányunkban a multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció hatékonyságát vizsgáltuk genomikus kópiaszám-eltérésekkel járó aberrációk kimutatásához krónikus limfocitás leukémiában. Tizen-nyolc olyan beteg diagnóziskori mintáját analizáltuk SALSA P037 és P038-as szondakeverékekkel, akikben a korábbi diagnosztikai vizsgálat molekuláris citogenetikai eltérést jelzett. Öt, ibrutinibterápiában részesülő betegnél kezelés előtt és azt követően vett mintapárokat vizsgáltunk. Az eredmények egy részét fluoreszcens *in situ* hibridizációval validáltuk. A két alkalmazott módszerrel összesen 63 aberrációt azonosítottunk 18, célzott terápiában nem részesülő beteg mintájában. A multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció 59 eltérést tárt fel, melyből minden olyan aberrációt sikerrel validáltunk ($n = 38$), melyhez rendelkezésre állt fluoreszcens *in situ* hibridizációs szonda. Utóbbi módszerrel további 4 eltérés mutatkozott, melyek mintában való reprezentáltsága 20% alattinak bizonyult, ezért nem igazolódott MLPA-val. Az öt, ibrutinibterápiában részesülő beteg közül két betegben jelent meg új kópiaszám-eltérés a kezelés megkezdése utáni mintában, egy esetben a kezelés előtti mintában azonosítható aberrációk eliminálódtak a kezelés során, két esetben pedig egyáltalán nem mutatkozott abnormalitás a mintapárokból. Intézetünkben beállítottuk a multiplex ligációfüggő szondaamplifikációt krónikus limfocitás leukémia vizsgálatához. A módszer hasznos eszköze lehet ezen entitás diagnosztikájának és kutatásának. A jelenleg használt technikákat kiegészítve teljesebb képet adhat a betegség genetikai komplexitásáról és segítheti az egyes betegek pontosabb prognosztikai besorolását.

Kulcsszavak: CLL, MLPA, FISH, onkohematológia

Screening for genomic copy number alterations in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification

Chronic lymphocytic leukemia is a clinically heterogeneous disease with diverse genetic background. In Hungary, fluorescence *in situ* hybridization is usually applied to infer unbalanced abnormalities with prognostic significance. Due to the low number of currently screened markers, this method may potentially underestimate the genetic complexity of the leukemic cell population analyzed. Power of multiple ligation-dependent probe amplification was tested to detect genomic copy number alterations in chronic lymphocytic leukemia. Using SALSA P037 and P038 probemixes, we analyzed diagnostic samples from 18 patients harboring molecular cytogenetic aberrations. Pre- and post-treatment sample pairs were analyzed from 5 patients receiving ibrutinib therapy. Results were validated by fluorescence *in situ* hybridization. The two methods identified 63 aberrations in 18 patients not receiving targeted therapy. Multiplex ligation-dependent probe amplification revealed 59 alterations and all of those were successfully validated for which fluorescence *in situ* hybridization probes were available ($n = 38$). The latter method revealed 4 additional aberrations with an abundance of <20%. Two patients undergoing ibrutinib treatment displayed newly emerging aberrations in the

*Levelezési cím: Dr. Kiss Richárd, Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. E-mail: kiss.richard@med.semmelweis-univ.hu, Tel.: +36-1-215-7300/54473

post-treatment sample while in 1 patient, aberrations detected in the pre-treatment sample disappeared during therapy. In 2 further patients, aberrations were not detected. In our department, we established multiplex ligation-dependent probe amplification for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. The technique could serve as a useful tool for research and diagnostics of this entity. By complementing the currently applied techniques, it could provide a more comprehensive picture of the disease-associated genetic complexity and contribute to the efficient prognostic classification of patients.

Keywords: CLL, MLPA, FISH, oncohematology

(Beérkezett: 2018. április 2.; elfogadva: 2018. április 15.)

Rövidítések

CLL = krónikus limfocitás leukémia; CK = komplex kariotípus; FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; MLPA = multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció; PCR = polimeráz láncreakció

Az elmúlt évtizedek kutatásai mélyrehatóan feltárták a különböző malignus hematológiai betegségekhez asszociáltan megjelenő genetikai és genomikai eltéréseket, ezzel lehetővé téve az entitások részletesebb klasszifikációját, javítva a pontos diagnózis és prognózis felállítását, valamint molekuláris célpontokat azonosítva a betegek célzott kezeléséhez [1]. A leukémiák patogenezise gyakran komplex folyamat, melyhez számos genetikai abnormalitás társulhat, beleértve a DNS kópiaszám-változással járó aberrációkat is, bizonyos genomikus régiók hiányát (delécio), többletet (gain), vagy éppen sokszorozódását (amplifikáció) [2, 3].

A krónikus limfoid leukémia (CLL) a leggyakoribb felnőttkori malignus hematológiai betegség a fejlett országokban, 100.000 lakosonként évente átlagosan 5,8 újonnan diagnosztizált férfi, valamint 3,0 újonnan diagnosztizált női beteggel [4, 5]. Hazánkban mintegy 400–450 újonnan diagnosztizált eset fordul elő évente [6]. A CLL prognózisa és klinikai lefolyása rendkívül változatos, egyes betegek éveket-évtizedekig stabilak maradnak akár kezelés nélkül is, míg másoknál rövid időn belül progrediál a betegség, a diagnózis felállítása után azonnali terápiás beavatkozást igényelve. A betegek különböző prognosztikai csoportokba való besorolása mellett fontos az adott klinikai helyzetben prediktívnek számító markerek alapos vizsgálata is a kezelés megkezdése előtt, mint például a *TP53* gént érintő defektusok szűrése ibrutinibkezelést megelő-

zően [7, 8]. Az elmúlt években számos új célzott terápiás gyógyszer került elfogadásra a CLL kezeléséhez, melyek egyes betegek számára jelentős túlélési előnyt biztosíthatnak a standard kemo-immunoterápiával szemben.

A betegek prognosztikai csoportokba sorolásához, illetve az optimális kezelés megválasztásához a CLL sejtek konvencionális- és molekuláris citogenetikai vizsgálatai hasznos információt szolgáltathatnak, ugyanis a CLL-es betegek mintegy 85%-ában található valamilyen citogenetikai eltérés [9]. A leggyakrabban előforduló kópiaszám-eltérések a jó prognózissal társuló izolált del(13q) (esetek 50–60%-ában), az intermediér prognózissal járó 12-es triszómia (+12; 12–25%), illetve a rossz prognózist meghatározó del(11q) (*ATM*) (10–20%) és del(17p) (*TP53*) (5–10%) [9]. Ezeknek az eltéréseknek a kezelés előtti vizsgálata a legújabb nemzetközi ajánlás szerint minden esetben elvégzendő (1. táblázat) [10]. Az egyedi eltérések mellett klinikai jelentőséggel bír az egyes aberrációk együttes előfordulása is. Komplex kariotípus (CK, complex karyotype) esetén a betegben 3 vagy annál több kromoszómaaberráció detektálható, mely tipikusan rövidebb diagnózis és első kezelés között eltelt idővel (TTFT, time to first treatment), illetve teljes túléléssel társul (OS, overall survival). Ezen felül a CK előre jelezheti a betegek kezelésre adott kedvezőtlen válaszát, még az új célzott terápiák mellett is [11, 12], ezért napjainkban továbbra is változatlanul fontos a betegség genetikai hátterének átfogó diagnosztikai vizsgálata. A korábban specifikusan említett négy aberráció mellett, CLL-ben további visszatérő kiegyensúlyozatlan eltérések is azonosításra kerültek, mint például a 6q, 8p, 9p és 10q kromoszómakarokat érintő delécio; a 2p, 8q és 18q régiókat érintő többletek-amplifikáció; valamint a 19-es kromoszóma triszómiája.

1. táblázat | Kezelés megkezdése előtt elvégzendő genetikai vizsgálatok CLL-ben

Aberráció	Jelentőség	Módszer	Indikáció
del(11q)	prognosztikus	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(13q)	prognosztikus	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(17p)	prognosztikus és prediktív	FISH	minden kezelési vonal előtt
+12	prognosztikus	FISH	minden kezelési vonal előtt
Komplex kariotípus*	prognosztikus és prediktív	G-sávok kariotipizálás	klinikai tanulmányokban ajánlott

*3, vagy annál több kromoszóma aberráció együttes jelenléte

Bár ezek prognosztikai jelentőségéről jelenleg még korlátozott mértékben állnak rendelkezésre adatok, célzott vizsgálatuk többek között segítheti a többszörös genetikai eltérést hordozó esetek felderítését is [4, 13–15]. Számos malignus hematológiai kórképpel szemben CLL-ben a ki-egyensúlyozott kromoszómaeltérések mint a kromoszómatranszlokációk viszonylag ritkák, esetleges jelenlétük kedvezőtlen prognózissal társul [16].

A citogenetikai eltérések kimutatásának hagyományos módszere a G-sávok karyotípus elemzése. CLL konvencionális citogenetikai vizsgálatoknál a leukémiás sejtek alacsony mitotikus aktivitása miatt B-sejtosztódást stimuláló ágenst szükséges a tenyésztő médiumhoz adni, melyet több napos tenyésztés követ. A módszer egyéb diagnosztikai tesztekhez képest időigényes és a metafázisok elemzése nagy gyakorlatot kíván. A jelenlegi diagnosztikai munkafolyamatban ezért elterjedtebb módszer a célzott fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) teszt, mellyel azonban csak 3–4 genomikus lokusz vizsgálható egyidejűleg. A módszer előnye, hogy alkalmas nagy mennyiségű sejt gyors analizálására. A FISH hátránya, hogy a leggyakrabban használt kereskedelmi szondák csak több lokuszt vizualizálnak egyszerre, valójában egyetlen visszatérő aberráció kimutatására fókuszálnak. A CLL-es betegek genetikai hátterének diagnosztikai vizsgálatához hatékonyan hozzájárulhatna egy olyan módszer, mellyel nagyszámú lokusz vizsgálható egyidejűleg, rövid átfordulási idővel.

Tanulmányunkban célul tűztük ki egy a magyar hematológiai diagnosztikában és kutatásban jelenleg még korlátozott mértékben elterjedt technika, a multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA) beállítását CLL-es betegek klinikai mintáinak analizálásához. A módszerrel egy reakcióban 55–60 genomikus régió kópiaszám-eltérései vizsgálhatóak. Továbbá célunk volt az eljárás megbízhatóságának elemzése FISH vizsgálatokkal összevetve, végül néhány ibrutinibterápiában részesülő betegben vizsgáltuk a DNS kópiaszám-eltérések időbeli változását a kezelés függvényében.

Módszer

Munkánk során a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében, illetve a Dél-pesti Cent-

rumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ajánlása alapján diagnosztizált CLL-es betegek mintáit vizsgáltuk [17]. Tanulmányunkba 18 beteget vontunk be, akiknél a diagnosztikai vizsgálatok során genetikai eltérést azonosítottunk FISH analízissel (#1–18). További 5, ibrutinibterápiában részesülő beteg esetében a kezelés előtt és azt követően vett mintapárokat vizsgáltuk (#19–23).

FISH vizsgálatához perifériás vér és csontvelő mintákból nyert, Carnoy-oldatban fixált sejteket használtunk. Az MLPA vizsgálatához ezen fixált sejtekből, illetve EDTA-val antikoagulált perifériás vér mintákból ficoll gradiens centrifugálással szeparált mononuklális sejtekből végeztünk DNS izolálást High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. Negatív kontrollnak klonális malignus betegséget nem hordozó mintákból izolált DNS-t használtunk.

A tanulmányunk tárgyát képező MLPA technika elsősorban kópiaszám-eltérések vizsgálatára alkalmas félkvantitatív módszer, melynek során a minta DNS-specifikus, vizsgálandó szakaszaihoz hibridizált szondákat sokszorozunk fel. A keletkezett PCR termékek hossz alapján történő szétválasztását és mennyiségi analizését fluoreszcens kapilláris elektroforézissel végezzük. Kiegyensúlyozatlan eltérések vizsgálatokhoz az adott genomikus szakasz betegmintában lévő kópiaszámára a keletkezett, lokuszspecifikus PCR termékek normál kontrollokhoz viszonyított relatív mennyiségéből következtetünk. Delécio esetén az adott genomikus pozícióban a normál referencia mintához képest kevesebb PCR termék keletkezik, többletampifikáció esetén az elvártnál több.

Vizsgálatainkhoz SALSA MLPA P037 CLL-1 és SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverékeket használtunk, melyeket a gyártó (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) bocsátott rendelkezésünkre. A P037-es és P038-as szondakeverékek 41, illetve 35 genomikus cél régió kópiaszám-vizsgálatára alkalmasak. A szondakeverékek részletes összetételét a 2. táblázat tartalmazza. A reakció során keletkező PCR termékek méret szerinti szeparálását ABI 3500 (Applied Biosystems) kapilláris elektroforézis készülékkel végeztük. Az elektroferogramok analizését és a relatív kópiaszámok meghatározását az ingyenesen elérhető Coffalyser.Net (www.mlpa.com) szoftverrel végeztük.

2. táblázat | A tanulmányban genomikus kópiaszám eltérések kimutatásához használt MLPA szondakeverékek

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék				SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék			
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszómapozíció	Szondahossz (bázispár)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszómapozíció	Szondahossz (bázispár)
<i>REL</i>	7	2p16.1	223	<i>PTEN</i>	5	10q23.31	368
<i>REL</i>	11	2p16.1	292	<i>PTEN</i>	9	10q23.31	472
<i>ALK</i>	4	2p23.2	418	<i>ATM</i>	1	11q22.3	184
<i>ALK</i>	27	2p23.2	481	<i>ATM</i>	55	11q22.3	226
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	178	<i>RDX</i>	11	11q22.3	281
<i>MYCN</i>	3	2p24.3	205	<i>ATM</i>	63	11q22.3	288
<i>MYCN</i>	2	2p24.3	247	<i>ATM</i>	13	11q22.3	373

2. táblázat | (folyt.)

SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverék				SALSA MLPA P038 CLL-2 szondakeverék			
Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma-pozíció	Szondahossz (bázispár)	Vizsgált gén	Vizsgált exon	Kromoszóma-pozíció	Szondahossz (bázispár)
MYCN	3	2p24.3	365	ATM	44	11q22.3	463
AIM1	2	6q21	436	PPP2R1B	4	11q23.1	338
SEC63	16	6q21	445	CADM1	1	11q23.3	361
TNFAIP3	9	6q23.3	211	CD27	3	12p13.31	142
TNFAIP3	2	6q23.3	493	STAT6	4	12q13.3	136
LATS1	4	6q25.1	457	HMGA2	2	12q14.3	418
IGF2R	3	6q25.3	235	PAH	4	12q23.2	240
PARK2	10	6q26	352	IGF1	4	12q23.2	310
TNFRSF10B	5b	8p21.3	241	RB1	17	13q14.2	160
TNFRSF10A	1	8p21.3	312	DLEU2	11	13q14.2	178
EIF3H	2	8q24.11	142	KCNRG	1	13q14.2	221
MYC	3	8q24.21	160	DLEU1	down	13q14.2	381
MYC	3	8q24.21	281	DLEU1	2	13q14.2	402
CDKN2B	2	9p21.3	228	RB1	27	13q14.2	480
CDKN2A	3	9p21.3	256	ATP7B	4	13q14.3	245
ATM	14	11q22.3	173	AKT1	4	14q32.33	148
ATM	22	11q22.3	337	KIA0125	up	14q32.33	203
LRMP	21	12p12.1	321	MTA1	3	14q32.33	445
CCND2	5	12p13.32	358	TP53	1	17p13.1	166
CDK4	8	12q14.1	274	TP53	2a	17p13.1	198
IFNG	4	12q15	217	TP53	6	17p13.1	274
CHFR	4	12q24.33	400	TP53	5	17p13.1	319
KCNRG	3	13q14.2	148	TP53	10	17p13.1	346
MIR15A	1	13q14.2	166	CDKN2D	2	19p13.2	265
FNDC3A	6	13q14.2	190	LDLR	7	19p13.2	301
DLEU2	2	13q14.2	195	CCNE1	12	19q12	391
RB1	21	13q14.2	382	AKT2	6	19q13.2	328
ATP7B	6	13q14.3	306	MIR498	1	19q13.42	427
DLEU7	1	13q14.3	373	COL11A1*	15	1p21.1	454
DLEU7	2	13q14.3	466	SERPINC1*	5	1q25.1	172
TP53	4b	17p13.1	263	ZNF638*	2	2p13.2	355
TP53	7	17p13.1	286	SCN1A*	12	2q24.3	211
TP53	3	17p13.1	299	GBE1*	7	3p12.2	500
TP53	1	17p13.1	409	IL4*	1	5q31.1	130
COL11A1*	29	1p21.1	136	GARS*	5	7p14.3	258
USH2A*	60	1q41	154	STX1A*	8	7q11.23	294
EDAR*	3	2q12.3	267	OPTN*	11	10p13	192
COL3A1*	32	2q32.2	451	RPGRIP1*	20	14q11.2	490
GBE1*	7	3p12.2	500	SEMA7A*	15	15q24.1	436
SCN5A*	9	3p22.2	391	ABAT*	2	16p13.2	409
KLKB1*	3	4q35.2	184	CACNG2*	4	22q12.3	154
NIPBL*	5	5p13.2	200				
IL4*	1	5q31.1	130				
KIAA0319*	22	6p22.3	427				
COL5A1*	24	9q34.3	344				
ABCC8*	14	11p15.1	328				
SPG11*	36	15q21.1	472				

*Referenciaszonda

Szonda-keverék	Target gén – exon	Kromoszóma-pozíció	Betegek															
			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16
P037	MYCN-2	2p24.3																
P037	MYCN-2	2p24.3																
P037	MYCN-3	2p24.3																
P037	MYCN-3	2p24.3																
P037	ALK-27	2p23.2	G	N				N	G	G								
P037	ALK-4	2p23.2	G	N				N	G	G								
P037	REL-7	2p16.1																
P037	REL-11	2p16.1																
P037	AIM1-2	6q21																
P037	SEC63-16	6q21																
P037	TNFAIP3-2	6q23.3																
P037	TNFAIP3-9	6q23.3																
P037	LATS1-4	6q25.1																
P037	IGF2R-3	6q25.3																
P037	PARK2-10	6q26																
P037	TNFRSF10B-5	8p21.3																
P037	TNFRSF10A-1	8p21.3																
P037	EIF3H-1	8q24.11																
P037	MYC-3	8q24.21																
P037	MYC-3	8q24.21																
P037	CDKN2A-3	9p21.3																
P037	CDKN2B-2	9p21.3																
P038	PTEN-5	10q23.31																
P038	PTEN-9	10q23.31																
P038	ATM-1	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	ATM-13	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P037	ATM-14	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P037	ATM-22	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	ATM-44	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	ATM-55	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	ATM-63	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	RDX-11	11q22.3	D	D	D	N	N	D	N	D	D	N	N	N	N	N	N	D
P038	PPP2R1B-4	11q23.1																
P038	CADM1-1	11q23.3																
FISH	[CEP12]	12p11.1-q11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N
P037	CCND2-5	12p13.32																
P038	CD27-3	12p13.31																
P037	LRMP-21	12p12.1																
P038	STAT6-4	12q13.3																
P037	CDK4-8	12q14.1																
P038	HMG2-2	12q14.3																
P037	IFNG-4	12q15																
P038	IGF1-3	12q23.2																
P038	PAH-4	12q23.2																
P037	CHFR-4	12q24.33																
P038	RB1-17	13q14.2																
P037	RB1-21	13q14.2																
P038	RB1-27	13q14.2																
P037	FND3A-6	13q14.2																
P038	DLEU2-11	13q14.2																
P038	KCNRG-1	13q14.2																
P037	KCNRG-3	13q14.2																
P037	MIR15A-1	13q14.2																
P037	DLEU2-intr 1	13q14.2																
P038	DLEU1-2	13q14.2																
P038	DLEU1-intr 2	13q14.2																
P037	DLEU7-2	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	N
P037	DLEU7-1	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	N
P037	ATP7B-6	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	N
P038	ATP7B-4	13q14.3	D	D	D	D	N	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	N
P038	AKT1-4	14q32.33																
P038	MTA1-3	14q32.33																
P038	KIAA0125-up	14q32.33																
P038	TP53-10	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P037	TP53-7	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P038	TP53-6	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P038	TP53-5	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P037	TP53-4b	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P037	TP53-3	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P038	TP53-2a	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P038	TP53-1	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P037	TP53-1	17p13.1	N	N	D	D	N	N	D	N	D	N	N	N	N	N	D	D
P038	CDKN2D-2	19p13.2																
P038	LDLR-7	19p13.2																
P038	CCNE1-12	19q12																
P038	AKT2-6	19q13.2																
P038	MIR498-1	19q13.42																

N negatív FISH mintázat
G többlet FISH alapján
D deléció FISH alapján

normális MLPA profil
többlet MLPA alapján
deléció MLPA alapján

tük. Genomikus többletet 1,2-nél magasabb, deléciót 0,8-nál alacsonyabb relatív kópiaszám esetén határoztunk meg.

A FISH vizsgálatokat az alábbi szondákkal végeztük: Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen, Vysis TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen, Vysis D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen, Vysis CEP 12 (D12Z3) SpectrumGreen, Vysis LSI MYC SpectrumOrange/SpectrumGreen, Vysis ALK SpectrumOrange/Spectrum Green (Abbott Molecular, Lake Bluff, USA), valamint CDK4 SpectrumOrange/CEP 12 (D12Z3) SpectrumGreen (Leica Biosystems, Newcastle, UK). A mintánként 200 interfázisban lévő sejt FISH mintázatának elemzéséhez Nikon Eclipse E600 epifluoreszcens mikroszkópot és Lucia Cytogenetics FISH (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) képanalizáló szoftvert használtunk.

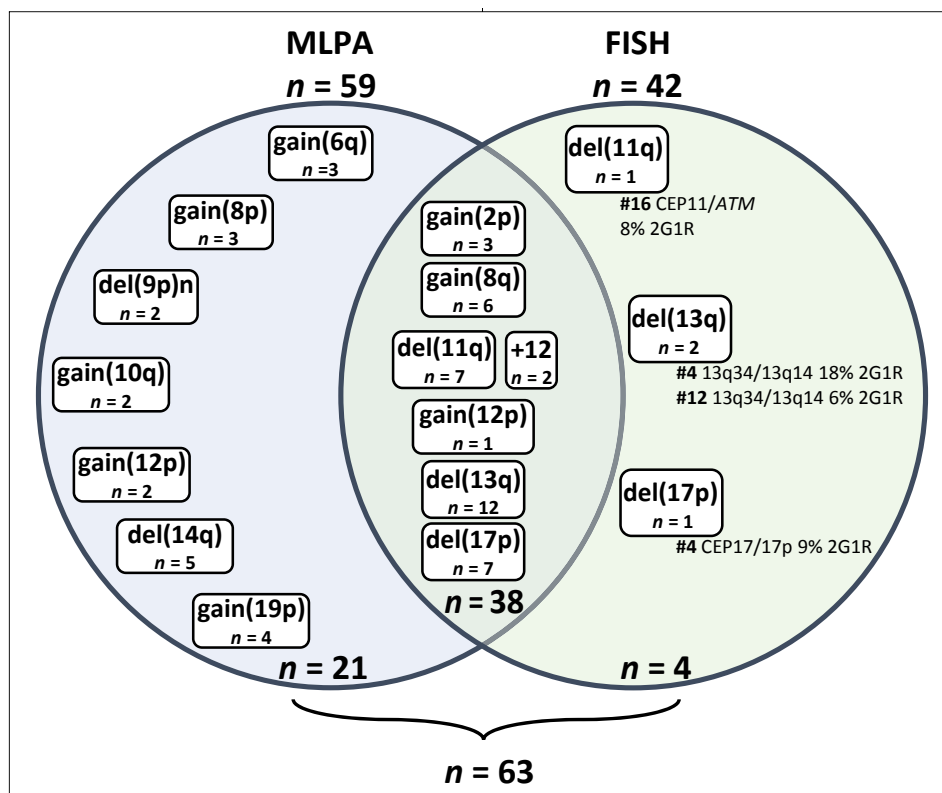
Eredmények

MLPA vizsgálatával összesen 59 aberrációt mutattunk ki a 18 célzott terápiában nem részesülő betegen. A diagnosztikában specifikusan vizsgált del(11q) ($n = 7$), +12 ($n = 2$), del(13q) ($n = 12$) és del(17p) ($n = 7$) aberrációkon felül *c-MYC* ($n = 6$) és *ALK* ($n = 3$) többletet, illetve egy részleges gain(12p)-t, valamint további 21 eltérést mutattunk ki 7 különböző kromoszómán. A leggyakoribb eltérések a 2p, 8p, 6q, 10q, 12p, 14q és 19p kromoszómaregiók többleteit, valamint a 9p és 14q kromoszómaregiók delécióit foglalták magukba (1. ábra).

FISH analízissel sikeresen validáltunk 38, MLPA-val azonosított eltérést, beleértve del(11q), +12, del(13q), del(17p) aberrációkat, valamint *ALK*, *c-MYC* és *CDK4* géntöbbleteket. A FISH vizsgálat további pozitív, del(11q) ($n = 1$), del(13q) ($n = 2$) és del(17p) ($n = 1$) jelenlétére utaló jelmintázatokat tárt fel három betegen, negatív MLPA eredménnyel társulva. Ezekben az esetekben az aberrációt hordozó sejtek aránya 20% alattinak bizonyult, ami nem éri el az MLPA érzékenységi szintjét. Huszonegy, MLPA vizsgálatával azonosított aberráció

1. ábra

FISH és MLPA eredmények összefoglalása. 18 CLL-es beteg diagnóziskori mintáját 76 MLPA szondával és 7 különböző FISH szondakittal vizsgáltuk. A vörös szín MLPA-val kimutatott többletampifikációt, a kék deléciót jelöl, fehér cella esetén az adott régióban nem volt MLPA-val kimutatható kópiaszám-eltérés. A „G” FISH-sel kimutatott többletet, a „D” deléciót jelöl, „N” jelölés esetén pedig normális FISH mintázatot azonosítottunk. A 12-es kromoszóma esetében a FISH és MLPA szondák cél régiói nem fedtek át, így ezen kromoszóma esetében a FISH eredményeket külön sorban jelöltük

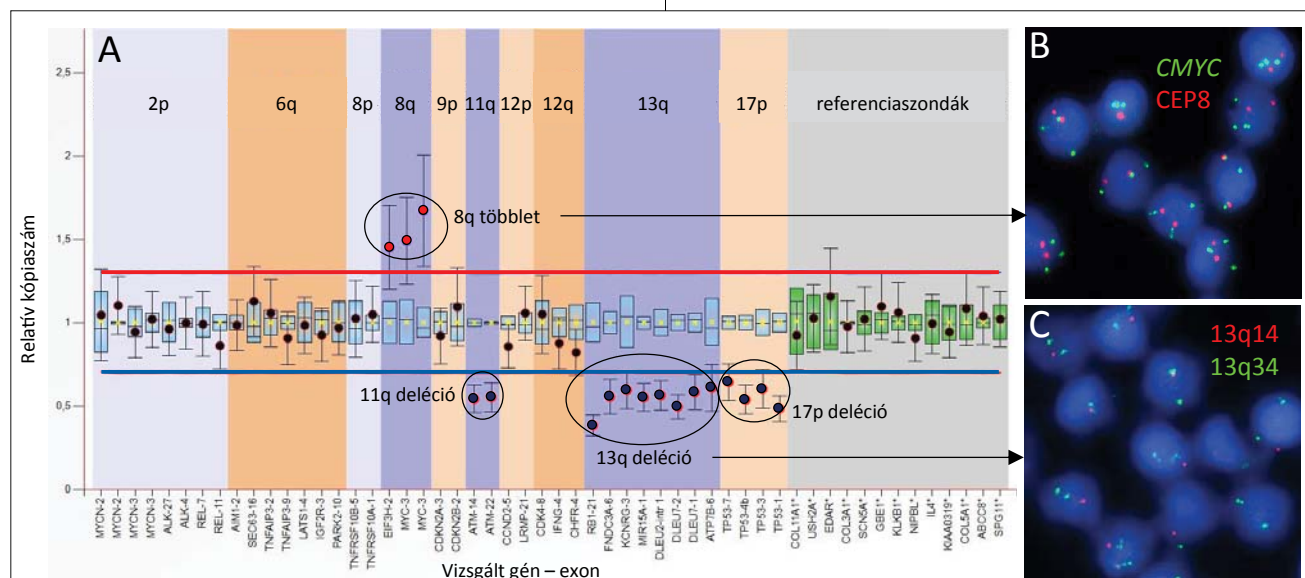


2. ábra

FISH és MLPA technikákkal kimutatott eltérések összehasonlítása. A két módszerrel együtt összesen 63 aberrációt azonosítottunk. Az MLPA vizsgálat 59 kópiaszám-eltérést fedett fel, amelyből 21 esetben FISH validáció nem történt megfelelő szonda hiányában. FISH vizsgálattal 42 eltérést azonosítottunk, ebből 38 esetben MLPA-val is kimutatott eltérést validáltunk, 4 esetben viszont a FISH MLPA-val nem észlelt kromoszómaeltérést azonosított. Ezen eltérések mintában való aránya <20% volt, így az MLPA érzékenységi küszöbét nem érte el

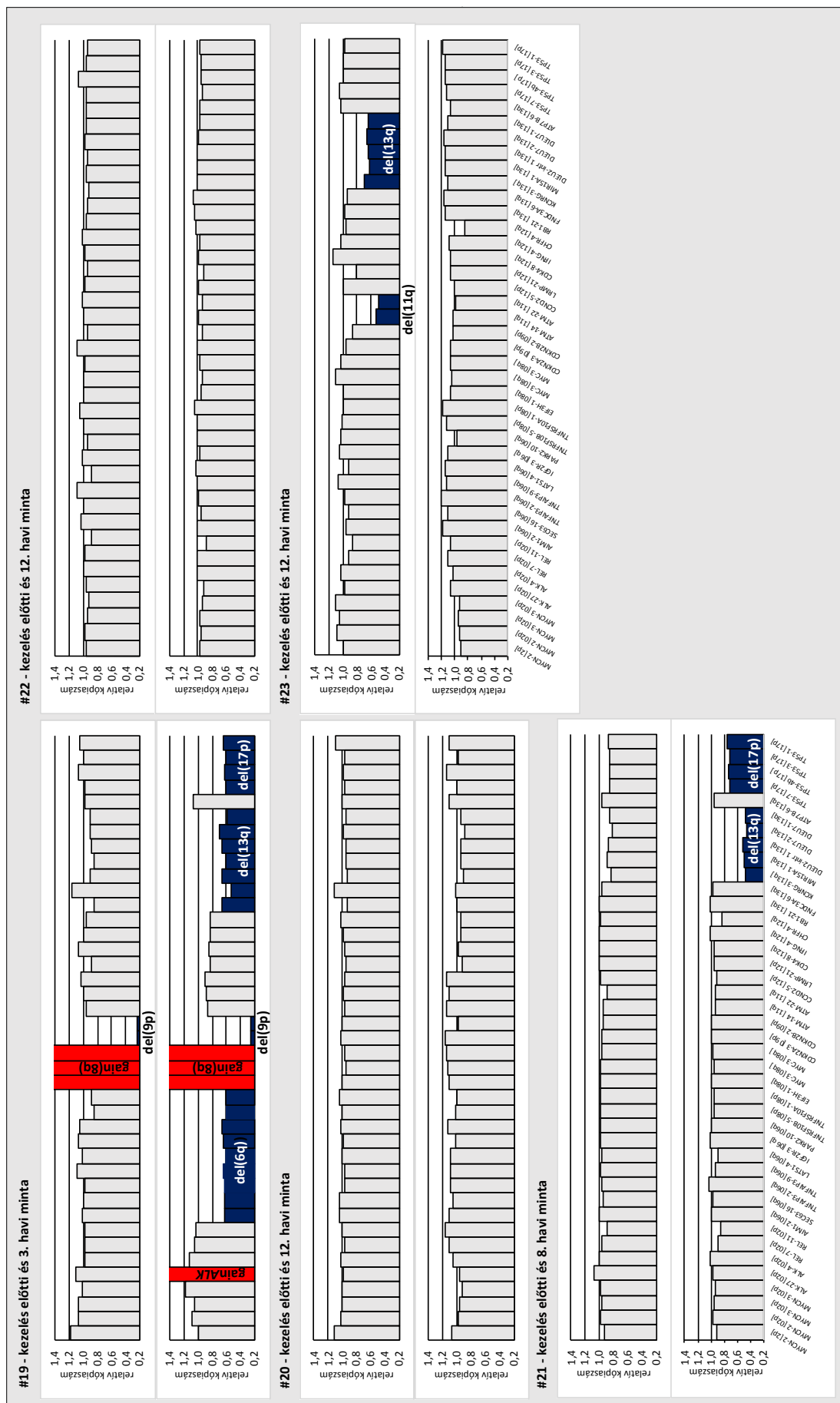
validálására megfelelő FISH szonda hiányában nem került sor. A FISH és MLPA eredmények összehasonlítását az 1.

és 2. ábra szemlélteti. A két módszerrel együttesen 63 aberrációt detektáltunk a 18 betegben, átlagosan 3,5 aber-



3. ábra

MLPA és FISH módszerekkel kimutatott, reprezentatív kópiaszám-eltérések a #3-as beteg mintájában. (A) A P037-es szondakeverékkel elvégzett MLPA reakciót követően a relatív kópiaszámprofilon 8q többlet, del(11q), del(13q) és del(17p) eltérések ábrázolódnak. Az x tengelyen az egyes MLPA szondák, az y tengelyen azok relatív kópiaszáma látható. A vörös vonal feletti értékek kópiaszámtöbbletre, a kék vonal alattiak pedig delécióra utalnak. (B) A minta CMYC FISH vizsgálata során a vizsgált régió szám feletti kópiaszámára utaló jelminztázat mutatkozott a sejtmagok 90%-ában. A zöld (SpectrumGreen) szonda a 8q kromoszóma CMYC régióját, a piros (SpectrumOrange) kontrollszonda pedig a 8-as kromoszóma pericentromerikus régióját jelöli. (C) FISH vizsgálattal a 13q14 lokusz monoallélius deléciójára utaló jelminztázat volt megfigyelhető a sejtmagok 88%-ában. A piros szonda a 13q14 régiót, a zöld pedig a 13q34, telomer közeli régiót jeleníti meg



4. ábra

Ibrutinibterápiában részesülő betegek kezelés előtti és kezelés során vett mintáinak kópiaszám-eltérései. A felső profil minden esetben a kezelés előtti minta, az alsó a kezelés során vett minta MLPA profilját mutatja. A mintákat a SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeveréssel vizsgáltuk. Az x tengelyeken a vizsgált régiókat, az y tengelyen azok relatív kópiaszámát tüntettük fel. Az egyes lókusztok esetében akkor határoztunk meg többletet, ha a relatív kópiaszám 1,2 felettinek mutatkozott, a deléció jelenlétét 0,8 alatti kópiaszámhoz kötöttük. A kópiaszám-többletekre utaló eredményeket vörössel, a deléciókra utalókat kékkel jelöltük.

rációt eredményezve betegenként. Tizenhárom betegen észleltünk legalább 3 kromoszómát érintő kópiaszám-eltérést, melyhez hasonló komplexitást kizárólag MLPA módszert használva 11, míg FISH vizsgálattal csupán 2 betegen tudtunk volna azonosítani. A 3. ábra egy reprezentatív, komplex genetikai eltérést hordozó betegen mutatja be az MLPA és FISH által kimutatott abnormalitásokat.

Az ibrutinibterápia hatására megjelenő klonális evolúciós változásokat 5 kezelt beteg mintapárjain vizsgáltuk SALSA MLPA P037 CLL-1 szondakeverékkel. Az első minta minden beteg esetében az ibrutinibkezelés megkezdése előtti időpontból származott, a második minta 3 beteg esetében (#20, #22, #23) a kezelés 12., egy-egy beteg esetében pedig a 8. (#21) és 3. havában (#19) került levételre. A #19 beteg esetében a kezelés megkezdése előtt csupán 8q többlet és del(9p) volt kimutatható, míg a kezelés harmadik hónapjára a korábbi eltérések mellett 2p többlet, del(6q), del(8p), del(13q) és del(17p) is mutatkozott (4. ábra). A #20 és #22 betegekben a kezelés megkezdésekor nem volt MLPA-val kimutatható aberráció, és ez az állapot mindkét esetben megmaradt, egy éves kezelést követően is. A #21 beteg az ibrutinibkezelés előtt nem hordozott MLPA-val kimutatható aberrációt, a 8. havi mintában azonban del(13q)-t és del(17p)-t detektáltunk. A #23 beteg esetében diagnóziskor del(11q) és del(13q) volt kimutatható, a 12. havi mintában viszont nem mutatkozott aberráció (4. ábra).

Megbeszélés

Tanulmányunk során a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében beállítottuk az MLPA módszert CLL-ben szenvedő betegek genetikai vizsgálatához. Összevetettük az MLPA és a FISH megbízhatóságát és hatékonyságát a legfontosabb kromoszómaeltérések azonosításának, illetve a többszörös genetikai eltérést mutató esetek szűrésének tekintetében. Végezetül, alkalmaztuk a technikát egy klinikai kutatás szempontjából aktuális kérdés vizsgálatára, az ibrutinibterápia alatt megjelenő/dinamikusan változó kópiaszám-eltérések tanulmányozására.

Az MLPA előnye, hogy i) DNS mintán elvégezhető, így nem igényel sejtenyésztestet vagy intakt sejtmagokat; ii) hosszú ideig tárolt minták, akár formalin-fixált és parafinba ágyazott anyagok vizsgálatára is alkalmas [18]; iii) 55–60 DNS szakasz is vizsgálható vele egyidejűleg; iv) exonszintű feloldást tesz lehetővé, mivel a cél régiókhoz kapcsolódó szondák hossza általában csupán 55–80 bp közötti; v) 24 órán belül eredményt szolgáltat; vi) akár 96 lyukú plate-ekben is kivitelezhető; és vii) az elvégzéséhez szükséges eszközök (PCR- és kapilláris elektroforézis készülék) a legtöbb molekuláris genetikai laboratóriumban rendelkezésre állnak, így a módszer beállítása nem igényel nagyszabású beruházást. Ebből következően az MLPA a hazai onkohematológiai kutatás és diagnosztika széles körben használatos, hasznos vizsgáló módszerévé

válhat [19]. Mindezek mellett a vizsgált mintákban alacsony arányban reprezentált szubklonális citogenetikai eltérések kimutatására továbbra is a FISH a legalkalmasabb módszer, továbbá előfordulhat számos olyan komplex kromoszómaeltérés, illetve kiegyensúlyozott átrendeződés, melyek kimutatására még mindig a G-sávós kariotipizálás és/vagy a FISH a megfelelő eljárás.

Eredményeink nagymértékben megegyeznek a nemzetközi irodalomban publikált tapasztalatokkal, miszerint genomikus kópiaszám-eltéréseket CLL-ben vizsgálva az MLPA és FISH eredmények erős korrelációt mutatnak, amennyiben az aberrációkat hordozó sejtek aránya a mintában eléri/meghaladja az MLPA 20–25%-os érzékenységi szintjét [20–22]. Vizsgálatunk során csupán négy esetben fordult elő diszkrepancia a két metodika között, a kérdéses aberráció aránya valamennyiszer 20% alattinak bizonyult. A diagnosztikai munkafolyamat során a minták tisztasága általában meghatározásra kerül áramlási citometriával, alacsony CLL-es sejtarány esetén pedig a leukémiás sejtek mágneses sejtszeparálással dúsíthatók. Ezen megfontolások figyelembevételével biztonsággal észlelhetők a CLL sejtpopulációban uralkodó, domináns eltérések. Természetesen, az MLPA detektálási küszöbét el nem érő, szubklonális aberrációk dúsítást követően is rejtve maradhatnak.

Az MLPA előnye a FISH módszerrel szemben, hogy egy reakcióban akár 55–60 különböző célrégió is vizsgálható, ezáltal a minta genetikai komplexitása átfogóbban feltérképezhető. Mivel kiegyensúlyozatlan aberrációk FISH módszerrel való vizsgálatához az érintett célrégiót vizualizáló szonda mellett, ugyanazon kromoszóma többnyire intakt szakaszához kapcsolódó, úgynevezett kontrollszonda is használatos, FISH analízissel minden genomikus aberráció vizsgálatát tipikusan külön szokás elvégezni, dedikált szondapár segítségével. Ez alacsony áteresztőképességű és viszonylag költséges vizsgálatot tesz lehetővé, melynek következtében a rutin diagnosztikai analízis általában néhány aberráció vizsgálatára korlátozódik [9, 10], potenciálisan alábecsülve a minta genomikai komplexitását. A rutin FISH panel részét nem képező kromoszómák eltéréseinek specifikus jelentőségére példa a del(6q), mely egy közelmúltbeli közlemény alapján kedvezőtlen prognózist jelez, illetve a potenciális terápiás célpontot jelentő, *FOXO3* transzkripciósfaktor alacsony expressziójával társul [23].

FISH analízissel legjobb esetben is csupán a 20–50 kilobázisnál hosszabb DNS szakaszokat érintő eltérések vizsgálhatók biztonsággal [24], mely miatt rejtve maradhatnak ennél a nagyságrendnél kisebb kiterjedésű aberrációk, úgymint exonszintű mikrodélációk, például a 13q és 11q kromoszómakarokon [22, 25]. Az MLPA által nyújtott nagyobb felbontás jelentőségére jó példa a del(13q) analízise, mely eltérés izolált jelenléte kedvező prognózissal társul, viszont azon betegek esetében, akiknél az *RBI* gén nem érintett, hosszabb TTFT figyelhető meg az *RBI* délációt hordozó betegekhez képest [26]. Vizsgálatunkban 12 beteg esetében mutattunk ki del(13q)-t MLPA-val,

ebből 4 esetben az *RBI* gén érintetlen volt, egy esetben pedig csak részleges delécio volt megfigyelhető. Hagyományos FISH vizsgálattal ez a két alcsoport nem lett volna elkülöníthető.

Munkánk során MLPA-val számos olyan kópiaszám-eltérést is felfedtünk, melyek kizárólag FISH alkalmazása mellett rejtve maradtak volna. A mindkét módszerrel vizsgált betegek 72%-ában (13/18) mutattunk ki legalább 3 aberrációt, ami jelentősen magasabb arány a komplex kariotípus irodalomban közölt, körülbelül 20%-os előfordulásához képest [27]. Ennek oka egyrészt abban keresendő, hogy az MLPA és a FISH összehasonlításához technikai jellegű tanulmányunkba olyan betegeket vontunk be, akiknél valamely diagnosztikai FISH vizsgálat pozitív eredménnyel zárult, másrészt a komplex kariotípus egy konvencionális citogenetikai fogalom, mely minimum 3–10 megabázis kiterjedésű aberrációk együttes jelenlétére utal. Az általunk kimutatott, esetenként rövid szubkromoszomális vagy akár exonszintű aberrációk G-sávós kariotípus elemzéssel nem detektálható eltérések. Ebből következően a tanulmányunkban azonosított, legalább 3 genetikai eltérést hordozó betegek egy része valószínűleg nem rendelkezett komplex kariotípussal. Mindazonáltal jelenlegi ismereteink szerint a szubkromoszomális kópiaszám-eltérésekből fakadó genetikai komplexitás is független markere a rossz prognózisnak [27], így az általunk alkalmazott, kombinált módszertani megközelítés segíthet kiszűrni a hagyományos értelemben komplex kariotípust nem hordozó, mégis kedvezőtlen prognózissal rendelkező betegek egy részét. A komplex kariotípus a CLL prognózisának meghatározására használatos nemzetközi prognosztikus indextől (CLL-IPI) és a *TP53*-státuszától független jelzője a betegség kedvezőtlen kimenetelének [11, 12, 28]. Ebből következően a sokszoros kópiaszám-eltérést hordozó betegek azonosítása kiemelt fontosságú. A kombinált FISH és MLPA analízissel detektált sokszoros eltérések klinikai jelentőségének megítéléséhez további, nagyobb esetszámú vizsgálat szükséges.

Az elmúlt években számos új gyógyszer jelent meg a CLL kezelésében, mint a BTK-gátló ibrutinib és acalabrutinib, a Bcl-2-gátló venetoclax, vagy a PI3K-gátló idelalisib [29–32]. Ezen új és rendkívül hatékony terápiás modalitások megjelenése tovább növeli a komplex genetikai eltéréseket hordozó esetek azonosításának jelentőségét, ugyanis amellet, hogy ezen betegek esetében egyrészt nem hatékony a standard kemo-immunoterápia, ibrutinibkezelés esetében is rosszabb prognózis várható, ellentétben az izolált del(17p)-vel [33, 34].

Az MLPA használata előnyös lehet a CLL sejtpopuláció összetételének terápia során végbemenő változásainak elemzéséhez is. Egyes kemoterápiás készítmények alkalmazása például a 2-es kromoszóma rövid karjának nyelését hordozó kemorezisztens szubklónok felszaporodásával jár [35], de jól ismert a *TP53*-aberrációkat hordozó szubklónok pozitív szelekciója is kemo-immunoterápia hatására [36]. Az új célzott gyógyszerek alkalmazása során bekö-

vetkező genomikus kópiaszám-változások megismerése segíthet megérteni ezen készítmények által létrehozott szelekciós nyomásokat, illetve az ennek nyomán végbemenő klonális evolúciós folyamatokat. Vizsgálatunkban ibrutinibkezelte betegek mintapárjain több kromoszóma-aberráció megjelenését és eltűnését is megfigyeltük, ami felveti egy nagyobb beteganyagban, hosszabb követési idővel elvégzendő tanulmány létjogosultságát.

Összességében az MLPA hasznos eszköze lehet a CLL diagnosztikájának és kutatásának. Hagyományos FISH vizsgálat mellett alkalmazva, azt kiegészítve egy átfogóbb képet szolgáltathat az entitás genetikai hátteréről mind a diagnózis idején, mind pedig a terápiás beavatkozást követően, ezzel is hozzájárulva a betegek személyre szabott kezelésének esetleges jövőbeli javításához.

Nyilatkozat: A kézirat korábban más folyóiratban nem jelent meg, és máshova beküldésre nem került. A levelező szerző elolvasta a *Hematológia–Transzfuziológia* szerzői útmutatóját.

Anyagi támogatás: A közlemény megírásához kapcsolódó munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH K119950 és NVKP_16-1-2016-0004 pályázata, az az Emberi Erőforrások Minisztériuma által nyújtott Új Nemzeti Kiválósági Program ÚNKP-17-4-III-SE-9 pályázata, valamint a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programjának LP95021 pályázata támogatta. A felhasznált szondakeverékeket az MRC-Holland bocsátotta a szerzők rendelkezésére.

Szerzői munkamegosztás: K. R. és A. D.: A bemutatott tanulmány megtervezése. M. Z.: Betegminták gyűjtése. K. R., P. G., K. Sz., K. L., G. A., N. N., B. B., M. Z., B. Cs. és A. D.: A kísérletek kivitelezése és értékelése. B. Cs. és A. D.: A tanulmánnyal kapcsolatos vizsgálatok koordinálása és felügyelete. K. R., B. Cs. és A. D.: A kézirat elkészítése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek a közleményhez kapcsolódó közvetlen érdekltségeik nincsenek.

Irodalom

- [1] Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood* 2017; 130: 410–423.
- [2] Greaves M. Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 163–172.
- [3] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306–313.
- [4] Rodriguez-Vicente AE, Diaz MG, Hernandez-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet*. 2013; 206: 49–62.
- [5] Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2018; pii: S0140-6736: 30422–30427.
- [6] Muci O, Nagy Z. Treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. [A krónikus limfoid leukémia diagnózisának és terápiajának aktuális kérdései.] *Magyar Onkol*. 2016; 60: 127–136. [Hungarian]

- [7] Fésüs V, Marosvári D, Kajtár B, et al. TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia. [A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában.] Orv Hetil. 2017; 158: 220–228. [Hungarian]
- [8] Mátrai Z. The significance of 17p deletion and p53 mutation in CLL. [A 17p deléción és p53 mutáció jelentősége CLL-ben.] Orvostovábbképző Szemle 2017 [Hungarian]
- [9] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000; 343: 1910–1916.
- [10] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2018; doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.
- [11] Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. Blood 2017; 129: 3495–3498.
- [12] Leeksa A, Baliakas P, Mellink C, et al. Genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia defined by array-based analysis: definitions, associations with other biomarkers and clinical impact. Blood 2017; 130: 4280.
- [13] Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. Leukemia 2004; 18: 476–483.
- [14] Fabris S, Mosca L, Cutrona G, et al. Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2013; 88: 24–31.
- [15] Haeflrich C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. Leukemia 2007; 21: 2442–2451.
- [16] Guipaud O, Deriano L, Salin H, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. Lancet Oncol. 2003; 4: 505–514.
- [17] 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.
- [18] Atanesyan L, Steenkamer MJ, Horstman A, et al. Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. Am J Clin Pathol. 2017; 147: 60–68.
- [19] Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research. [Multiplex ligatíofüggő szondaamplifikáció az onkohematológiai kutatásban és diagnosztikában.] Orv Hetil. 2018; 159: 583–592. [Hungarian]
- [20] Fabris S, Scarciolla O, Morabito F, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization to detect chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: a comparative study. Genes Chromosomes Cancer. 2011; 50: 726–734.
- [21] Al Zaabi EA, Fernandez LA, Sadek IA, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification versus multiprobe fluorescence *in situ* hybridization to detect genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia: A tertiary center experience. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD 2010; 12: 197–203.
- [22] Stevens-Kroef M, Simons A, Gorissen H, et al. Identification of chromosomal abnormalities relevant to prognosis in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. Cancer Genet Cytogenet. 2009; 195: 97–104.
- [23] Jarosova M, Hrubá M, Oltová A, et al. Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. Am J Hematol. 2017; 92: 604–607.
- [24] Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, et al. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. J Mol Med (Berl). 1999; 77: 266–281.
- [25] Abdool A, Donahue AC, Wohlgemuth JG, et al. Detection, analysis and clinical validation of chromosomal aberrations by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic leukemia. PLOS ONE. 2010; 5: 15407.
- [26] Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2011; 50: 633–643.
- [27] Ouillette P, Collins R, Shakhani S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011; 118: 3051–3061.
- [28] Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. Oncotarget. 2017; 8: 54297–54303.
- [29] Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2013; 369: 32–42.
- [30] Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2016; 374: 323–332.
- [31] Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2016; 374: 311–322.
- [32] Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2014; 370: 997–1007.
- [33] Thompson PA, Wierda WG, Ferrajoli A, et al. Complex karyotype, rather than del(17p), is associated with inferior outcomes in relapsed or refractory CLL patients treated with ibrutinib-based regimens. Blood 2014; 124: 22.
- [34] Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. Cancer 2015; 121: 3612–3621.
- [35] Cosson A, Chapiro E, Bougacha N, et al. Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. Leukemia 2017; 31: 1625–1629.
- [36] Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2014; 123: 2139–2147.