

Daganatos megbetegedések célzott diagnosztikáját és kezelését támogató molekuláris diagnosztikai eljárások a mindennapokban

Routine application of molecular diagnostic techniques for precision diagnostics and therapy in oncology

Kotmayer Lili, Papp Gergő, Baghy Kornélia, Zajta Erik, Matolcsy András, Bödör Csaba

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

E-levél: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A daganatos betegségek diagnosztikájának és optimális kezelési stratégiájának megtervezésében napjainkban kulcsszerepet töltenek be a molekuláris patológiai vizsgálatok. A diagnosztikus, prognosztikus és prediktív biomarkerek szenzitív azonosítása és nyomonkövetése jelenti a precíziós medicina alappillért, amely számos daganattípus esetében vezetett a betegek életkilátásainak jelentős javulásához, paradigmaváltást eredményezve az onkológiában. Összefoglaló közleményünkben a precíziós medicina legkorszerűbb eszköztárát ismertetjük a Semmelweis Egyetem országos szintű molekuláris patológiai tevékenységének és az elmúlt évek fejlesztéseinek áttekintése által.

KULCSSZAVAK molekuláris diagnosztika, prediktív biomarkerek, precíziós medicina, újgenerációs szekvenálás

SUMMARY Molecular genetic testing has become one of today's most important fields of modern pathology, playing a key role in both diagnostics and optimal therapeutic decision making in oncology. Sensitive detection and monitoring of distinct diagnostic, prognostic and predictive biomarkers are the main cornerstones of precision medicine. Utilizing these results has led to the improvement of cancer patients' life expectancy in many entities, resulting in a paradigm shift in oncology. In this review, we present the state-of-the-art armamentarium of precision medicine by depicting the nationwide molecular pathology activities and recent developments at Semmelweis University.

KEY WORDS molecular diagnostics, predictive biomarkers, precision medicine, next generation sequencing

Bevezetés

A patológia egyike az onkológiai betegellátás legfontosabb területeinek, szerepe azonban az elmúlt időszakban jelentősen megváltozott. A szövettani és morfológiai eltérések vizsgálata mellett napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a daganatos megbetegedések genetikai hátterének megismerését célzó vizsgálatok, melyek számos malignitás esetében új diagnosztikai kritériumrendszerek, valamint prognosztikai és

prediktív biomarkerek megjelenését eredményezték. Az így kialakult új diszciplína, a molekuláris patológia szolgáltatja napjainkban a precíziós medicina alappillért. Az elmúlt évtizedben a molekuláris biológiai technológiák robbanásszerű fejlődésének köszönhetően exponenciálisan felgyorsult a különböző daganattípusok genomikai hátterének megismerése, ami számos új terápiás célpont felfedezését és molekuláris támadáspontú célzott terápia bevezetését eredményezte az onkológiában, ami több szolid és hematológiai daganatos megbetegedés terápiájában is jelentős áttörésekhez vezetett az elmúlt években.

A klasszikus immunhisztokémiai (IHC) és fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok mellett ma már rutinszerűen alkalmazott DNS- és RNS-alapú molekuláris vizsgálatokkal olyan prognosztikai és prediktív biomarkerek, célzott terápiás célpontok és rezisztenciát előrejelző mutációk, valamint a *minimálisan érheterő reziduális betegség (MRD)* monitorozására alkalmas eltérések azonosíthatók, melyek együttes vizsgálata megeremtetette a daganatok átfogó genetikai profilozásának alapjait. Az egyes eltérések vizsgálatára szorító diagnosztikai panelek mellett egyre több entitás-

Rövidítések

AML	akut myeloid leukaemia
CLL	krónikus lymphocytás leukaemia
CML	krónikus myeloid leukaemia
CPG	komprehenzív genomikai profilozás
ddPCR	digitális droplet PCR
ESMO	Európai Klinikai Onkológiai Társaság
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
IHC	immunhisztokémia
MPN	myeloproliferatív neoplasmák
MRD	mérhető/minimális reziduális betegség
MSI	mikroszatellita instabilitás
NGS	újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)
RQ-PCR	valós idejű, kvantitatív PCR
PCR	polimeráz láncreakció
TKI	tirozin-kináz-inhibitor
TMB	tumor mutációs terhelés

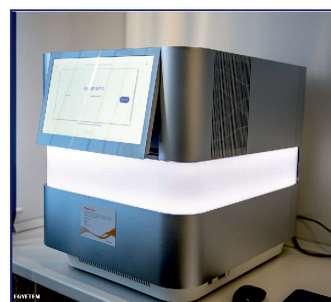
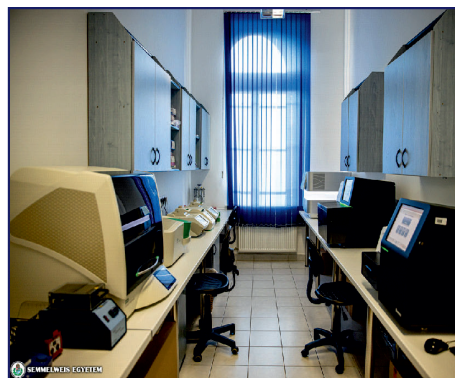
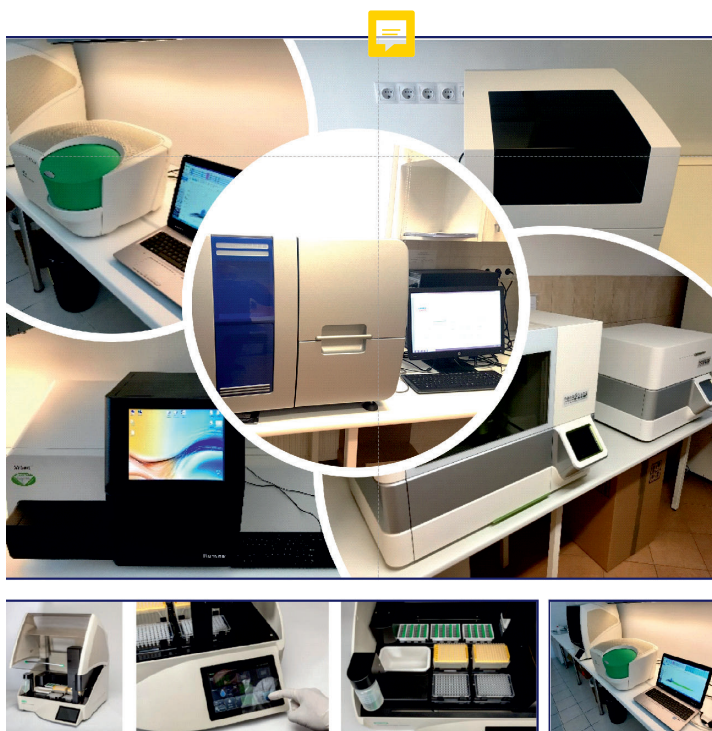
ban kerülnek előtérbe a komplex (ún. multigén) genetikai vizsgálatok, melyek a nagy áteresztőképességű és érzékenységgű molekuláris módszerek alkalmazásával minden eddiginél pontosabb képet nyújtanak a tumorgenezis genetikai hátteréről. A molekuláris diagnosztikai eszköztár legkorszerűbb komponenseit jelentik a nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálás (NGS, *next generation sequencing*), valamint a genetikai eltérések nagy érzékenységgű kimutatására alkalmas droplet-digitális PCR (ddPCR).

A Semmelweis Egyetem országos centrumként a hazai onkológiai és onkohematológiai betegek jelentős részének molekuláris diagnosztikai ellátását végzi, évente a tizenötezeret is meghaladó vizsgálatszámmal. Az elmúlt négy évben a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) támogatásával megvalósult Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP16) *Magyar Onkogenom és Személyre Szabott Diagnosztika és Terápia Programjának*, valamint ipari szereplőkkel való együttműködésnek köszönhetően az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztikai részlegében a legkorszerűbb NGS és ddPCR technológiákra épülő, valamennyi klinikai igényt kielégítő laboratóriumi és bioinformatikai infrastruktúrát alakítottunk ki (1. ábra), amelynek a mindennapi betegállásba való bevonásával a korábban kizárólag magánszolgáltatók által ajánlott korszerű mo-

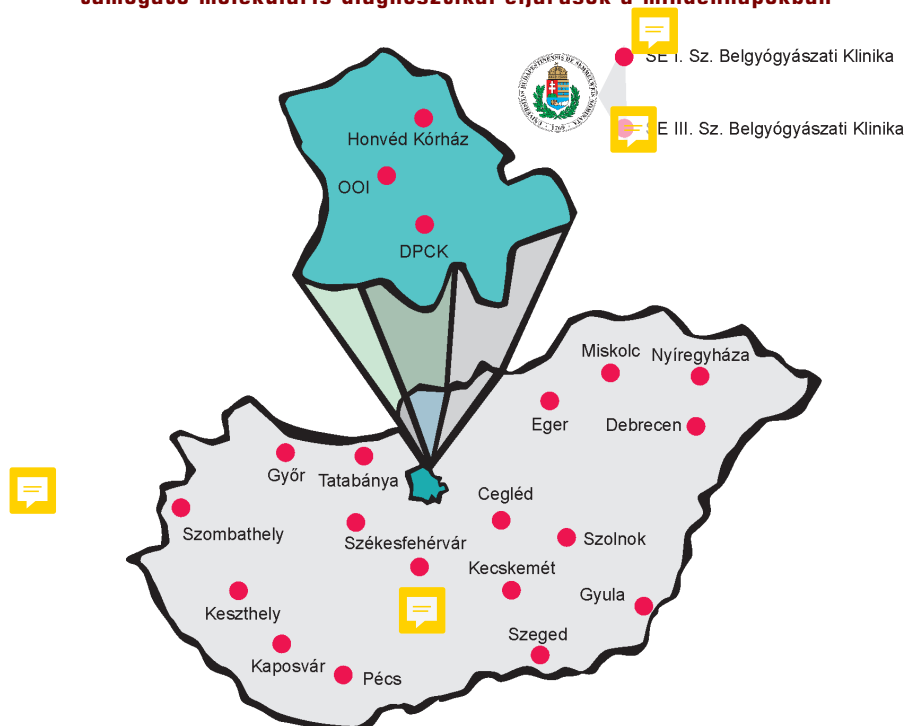
lekuláris diagnosztikai vizsgálatok váltak elérhetővé Egyetemünkön.

Molekuláris vizsgálatok jelentősége az onkohematológiában

Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet 2001 óta működő Onkohematológiai Központja mára szinte országos lefedettséggel, több mint húsz fővárosi és vidéki klinikai hematológiai centrum részére végez molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat (2. ábra). Az onkohematológiai kórképek rendkívül heterogén klinikai megjelenéssel és eltérő genetikai háttérrel bíró entitások. A korábban szinte kizárólag klinikai és morfológiai jellemzők alapján diagnosztizált betegségcsoport esetében mára a molekuláris vizsgálatok elengedhetetlenek a genetikai alapú diagnózis felállításához, valamint a betegek személyre szabott, célzott kezeléséhez és nyomonkövetéséhez. Az elmúlt néhány évben a különböző onkohematológiai kórképek genetikai hátterének megismerésével párhuzamosan emelkedett a mindennapi molekuláris onkohematológiai diagnosztikában vizsgálandó genetikai eltérések száma. A szövetteni, hagyományos citogenetikai, FISH és áramlási citometriai vizsgálatok mellett ma már közel 40-féle DNS- és RNS-alapú vizsgálat alkotja a molekuláris onko-



1. ábra. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztikai részlegén 2016–2020 között kialakított korszerű újgenerációs szekvenálás és droplet digitális PCR-alapú laboratóriumi infrastruktúra.



2. ábra. A Molekuláris Onkohematológia laboratórium klinikai és patológiai együttműködő partner intézményei a 2020-as évben.

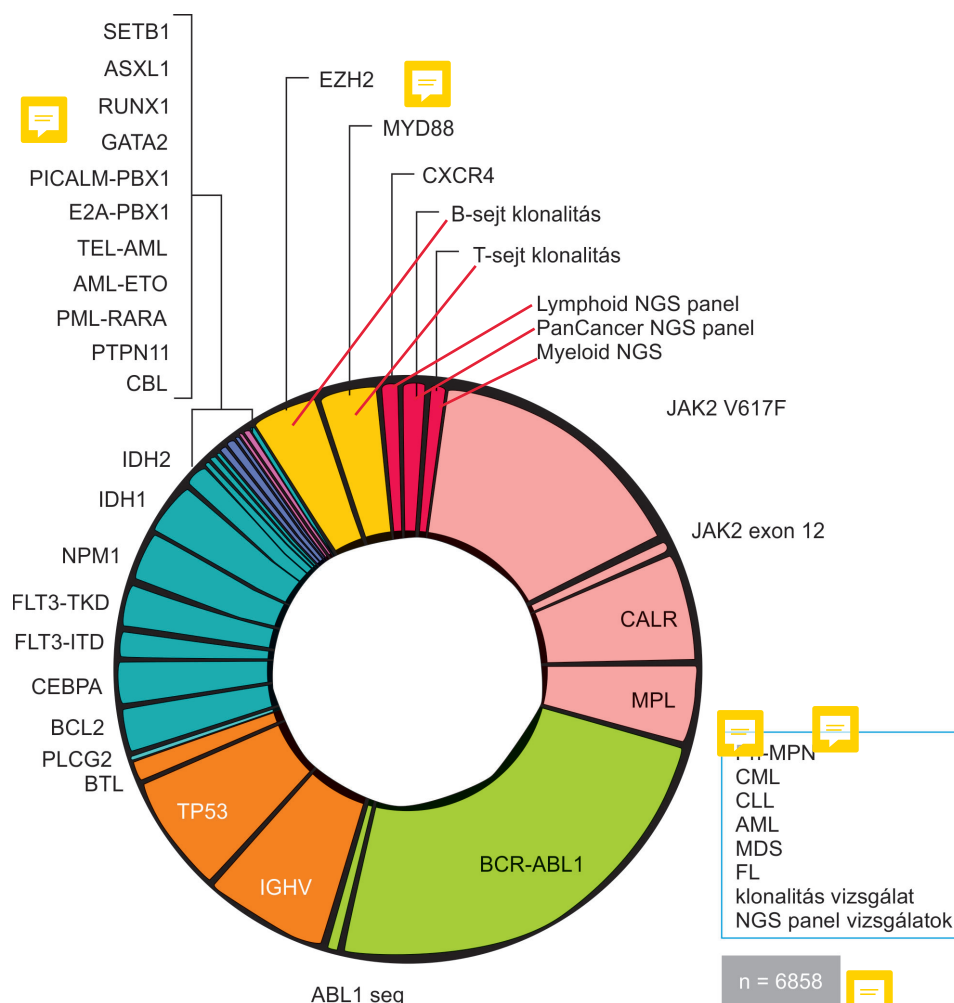
hematológia vizsgálati palettáját (3. ábra). A módszertani repertoár tekintetében pontmutációk szekvenálással vagy valós-idejű allélspecifikus PCR-rel történő kimutatása, immunglobulin (Ig) és T-sejt-receptor (TCR) gének fragmenshossz-analízissel történő azonosítása, visszatérő fúziós transzkriptumok RNS-alapú mennyiségi PCR-rel történő érzékeny nyomkövetése mellett az elmúlt néhány évben bevezetésre kerültek az NGS-alapú vizsgálatok is, melyek számának folyamatos emelkedése figyelhető meg laboratóriumunkban (4. ábra).¹ Figyelembe véve a betegek pontosabb rizikobesorolása és célzott kezelési lehetőségeinek azonosítása kapcsán egyre bővülő klinikai igényeket, a közeljövőben a nagyobb áteresztőképességű NGS-vizsgálatok további térnyerése várható a lymphomák és leukaemák molekuláris diagnosztikájában.

Mivel az Orvosképzés jelen tematikus számában a legfőbb onkohematológiai entitások molekuláris vonatkozásai különálló közlemények formájában kifejtésre kerülnek, az alábbiakban mindössze néhány kiemelt kórkép esetében vázoljuk a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok jelentőségét.

Krónikus myeloid leukaema (CML)

A Philadelphia-kromoszóma és a BCR-ABL1 fúziós transzkriptum azonosítását követően a *myeloproliferatív neoplasmák* (MPN) körébe tartozó CML a tirozin-

kináz-inhibitor (TKI) imatinib megjelenésével rövid idő alatt az onkohematológia modellbetegségévé vált.² Az immár két évtizede bevezetett imatinib nemcsak a CML kezelését forradalmasította, de nagyban elősegítette a precíziós onkológia megjelenéséhez vezető paradigmaváltást az onkológiában. Egyedülálló módon a CML mára egy krónikus betegséggé szelídült, melynek várható túlélése megegyezik a normál populációéval. A sikeres kezeléshez ugyanakkor elengedhetetlen a betegek molekuláris szintű nyomon követése, amelyre a TKI terápia célpontját jelentő BCR-ABL1 fúziós transzkriptum valós-idejű PCR-rel zajló mennyiségi analízise nyújt lehetőséget. A perifériás vérmintából háromhavonta elvégzendő vizsgálat informálja a klinikust a kezelés hatékonyságáról, a fúziós transzkriptum szintjének emelkedése pedig előre jelezheti az alkalmazott TKI-val szemben fellépő rezisztenciát. Az alkalmazott TKI kezelés hatástalansága esetén az *ABL1* gén kináz doménjének mutációanalízise szükséges a rezisztenciamutációk azonosításához, ami támpontot nyújthat a következő vonalban alkalmazható TKI kiválasztásához. Napjainkban már második és harmadik generációs TKI-k is elérhetőek a CML kezelésében, melyek megfelelő alkalmazásához és hatásuk nyomonkövetéséhez elengedhetetlen segítséget nyújt a molekuláris diagnosztika.³ Intézetünkben mintegy 800 CML-ben szenvedő beteg rendszeres molekuláris nyomonkövetését végezzük a nemzetközi szakmai protolloknak megfe-



3. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriuma által 2020-ban végzett 6858 DNS- és RNS-alapú vizsgálatok megoszlása a különböző kórképekben. Rövidítések: [????????????](#)

lelően, ami a molekuláris onkohematológiai diagnosztikai vizsgálatok megközelítőleg negyedét jelenti (3. ábra).

Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neoplasmák (MPN)

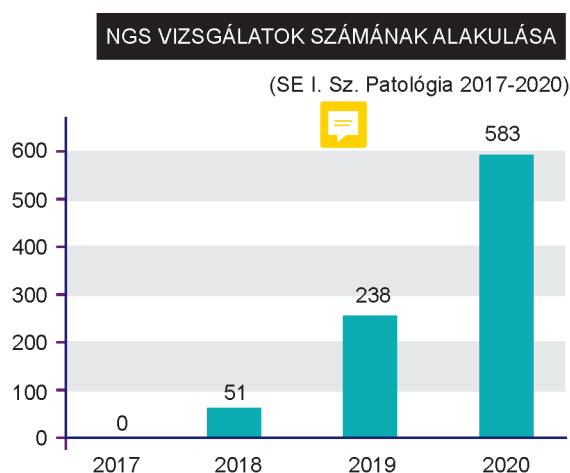
Bár a Philadelphia kromoszóma negatív (PM-MPN) ák csoportjába tartozó essentialis thrombocythaemia (ET), polycythaemia vera (PV) és primer myelofibrosis (MF) genetikai hátterét csak az elmúlt évtizedben ismertük meg, a kórképekben azonosítható genetikai eltérések vizsgálata rövid idő alatt alapvető szerephez jutott a betegségcsoport mindennapi diagnosztikájában. A betegek döntő hányadában (70–98%) azonosítható *JAK2*, *CALR* vagy *MPL* gének valamelyikének mutációi napjainkban már major diagnosztikai kritériumként szerepelnek a betegségcsoport diagnosztikus algoritmusában. Vizsgálatuk perifériás vérből Sanger-szek-

venálás vagy nagy érzékenységű allélspecifikus PCR segítségével történik.⁴

A *JAK2*, *CALR* és *MPL* mutációk diagnosztikus értékük mellett prognosztikus szereppel is bírnak. Az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerül a mutációk mennyiségi kimutatása is, melynek prognosztikai és terápiás relevanciája is ismert. Az ún. mutáns allélterhelés („allele burden”) a mutációt hordozó klón méretére utal és prognosztikus jelentőséggel is bírhat. A *JAK2* célzott terápia nyomkövetésére alkalmas lehet a *JAK2* V617F mutáns alléltömeg mennyiségi meghatározása ddPCR eljárással. Intézetünkben a PM-MPN-ák molekuláris diagnosztikája során évente több mint 1500 vizsgálatot foglal magában (3. ábra).⁵

Krónikus lymphocytás leukaemia (CLL)

A CLL molekuláris vizsgálata a rendkívül heterogén genetikai hátterének köszönhetően az eddig ismer-



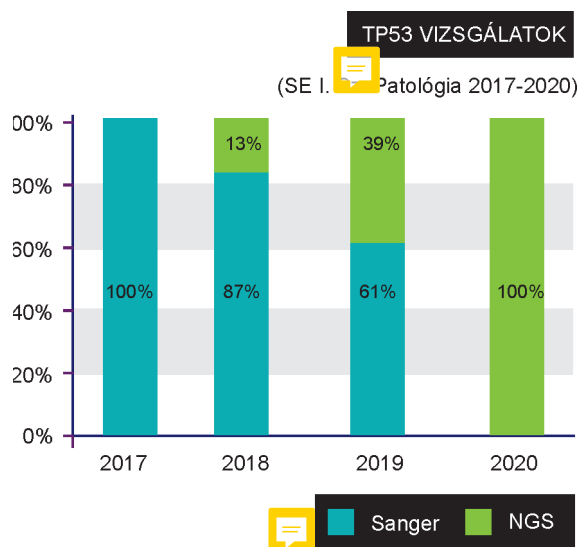
4. ábra. Az újgenerációs szekvenálás alapú vizsgálatok számának emelkedése az onkohematológiai kórképekben a 2018. évi bevezetést követően a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriumában.

tetett onkohematológiai kórképektől eltérő megközelítést igényel, hiszen a nagyszámú eltérés azonosítása csak több módszer együttes alkalmazásával lehetséges. Bár a CLL diagnózisának felállításához nem szükséges a genetikai eltérések ismerete, a kórképben alkalmazott rizikóbecslés során egyes citogenetikai és molekuláris defektusok vizsgálata elengedhetetlen.⁶ A sokáig csak FISH-sel detektálható kópiaszám-eltérések vizsgálatára szorítkozó rizikóstratifikációs besorolásban nagy előrelépést jelentett a molekuláris vizsgálatok megjelenése, melyekkel újabb prognosztikai és prediktív bio-

markerek is azonosításra kerültek. A prognosztikai és prediktív biomarkerek közül kiemelendők a Sanger-szekvenálással meghatározott IGHV mutációs státusz, valamint a *TP53* tumorsuppresszor gén teljes kódoló régióját érintő patogén mutációk, melyek detektálását célzott szekvenálással, végezzük. A *TP53* mutációanalízis kiváló példája az NGS-alapú eljárások térnyerésének: míg 2017-ben még valamennyi *TP53* vizsgálat hagyományos szekvenálással zajlott laboratóriumunkban, 2020-ban az NGS már teljesen felváltotta a hagyományos szekvenálási eljárást (5. ábra).

Az IGHV és *TP53* mutációanalízisek már a CLL-ben elérhető célzott terápiák indikációját is jelentik, így a IGHV státusz meghatározás és az NGS-sel igazolt *TP53* mutációk azonosítása rövid idő alatt a CLL legfontosabb molekuláris vizsgálataivá váltak. Intézetünkben e két biomarker vizsgálata 2017 óta elérhető, az elmúlt 3 évben a European Research Initiative on CLL (ERIC) nemzetközi szervezet által akkreditált laboratóriumként jelentős évenkénti mintaszámon végezzük a két biomarker vizsgálatát (3. ábra).^{7, 8}

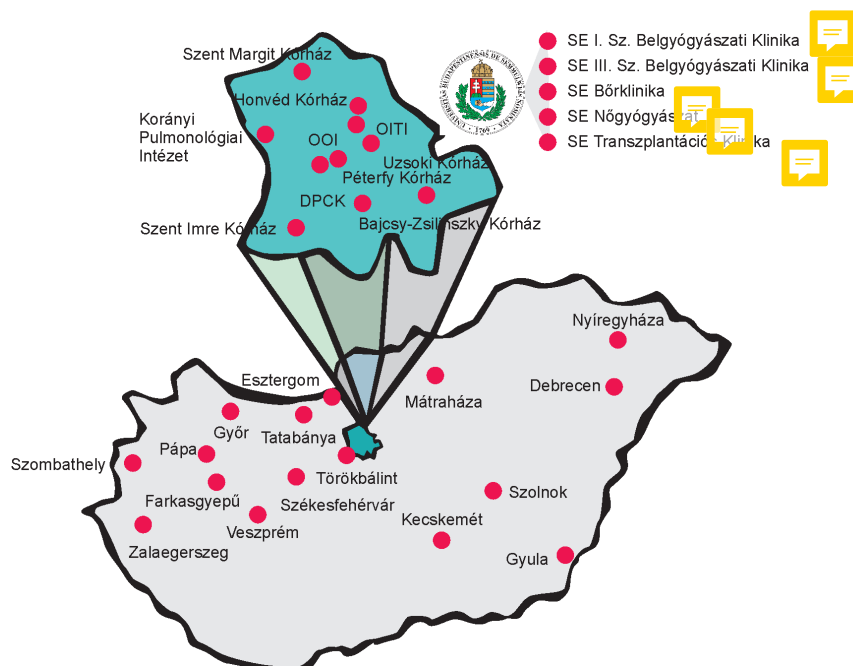
A terápiás indikációt jelentő eltérések mellett az elmúlt pár évben a célzott terápiákkal (**BTK gátlószer** és **BCL2 gátlószer**) szemben fellépő rezisztencia genetikai hátterét is megismerhettük CLL-ben, aminek vizsgálatában szintén megfigyelhető a nagy érzékenységu módszerek térnyerése. Az ibrutinib rezisztencia-asszociált *BTK* p.C481S mutáció mellett jelenleg már a *PLCG2* és a venetoclax rezisztencia hátterében álló *BCL2* mutációk vizsgálata is ultraszenzitív ddPCR-módszerrel történik és adataink alapján első detektálásuk akár hónapokkal megelőzheti a progresszió első klinikai jeleit.⁹



5. ábra. Az újgenerációs szekvenálási vizsgálatok térnyerése a Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Onkohematológia laboratóriumában a *TP53* mutációanalízis példáján szemlélítve.

Akut myeloid leukaemia (AML)

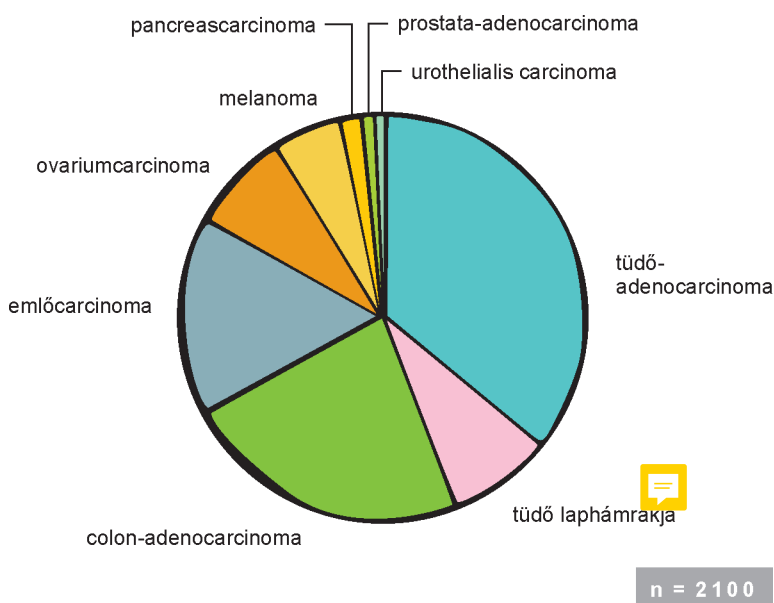
A myeloid rendszert érintő onkohematológiai kórképek közé tartozó AML egy kedvezőtlen túléléssel jellemezhető megbetegedés, melynek diagnosztikája a közelmúltig a morfológiai jegyek és citogenetikai vizsgálattal azonosítható kromoszómaeltérések alapján zajlott.¹⁰ Az NGS megjelenése azonban számos új mutációs célpontot azonosított a betegségben, melyek között számos fehérje célozható jelátviteli utak komponenseit képviseli. Az új genomikai felfedezések nagyban hozzájárultak az AML kezelésére alkalmas új terápiás megközelítések kidolgozásához, amit a betegség terápiájában alkalmazható számos új gátlószer (többek között FLT3-inhibitorok, IDH1/2 inhibitorok, különböző anti-test-toxin konjugátumok) megjelenése tükröz. Mára a korábban kizárólag hagyományos eljárások alkalmazá-



6. ábra. A Molekuláris Diagnosztika laboratóriummal együttműködő klinikai onkológiai centrumok a 2020-as évben.

sával diagnosztizált betegség korszerű, a nemzetközi standardoknak megfelelő diagnózisához, rizikóbecsléséhez és terápiás stratégiájának megtervezéséhez nélkülözhetetlen több gén mutációanalízise is (*CEBPA*, *NPM1*, *FLT3*, *IDH1/2*, *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1*), amelyek folyamatosan növekvő száma indokolja a multigén NGS alapú eljárások alkalmazását, szemben a hagyományos szekvenálási eljárásokkal kivitelezett ún. monogén teszteléssel.¹¹ Intézetünk Molekuláris Onkohematológiai kutatócsoportja kifejlesztett egy 54 génes NGS-alapú vizsgálati eljárást, amely alkalmas a felnőtt és gyermekkori AML komplex molekuláris profiljának meghatározására. A vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozással érhető el.

mányos szekvenálási eljárásokkal kivitelezett ún. monogén teszteléssel.¹¹ Intézetünk Molekuláris Onkohematológiai kutatócsoportja kifejlesztett egy 54 génes NGS-alapú vizsgálati eljárást, amely alkalmas a felnőtt és gyermekkori AML komplex molekuláris profiljának meghatározására. A vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozással érhető el.



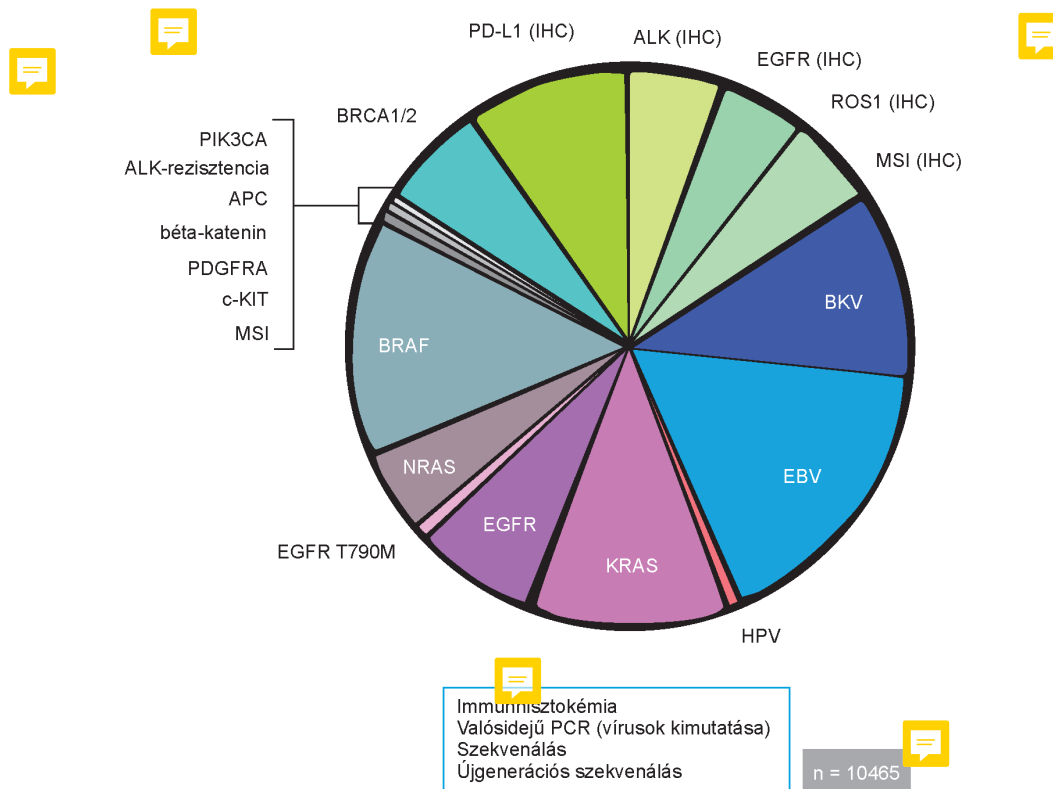
7. ábra. A Molekuláris Diagnosztika laboratórium által molekuláris szinten vizsgált különböző daganattípusok megoszlása 2020-ban.

Szolid tumorok molekuláris diagnosztikája

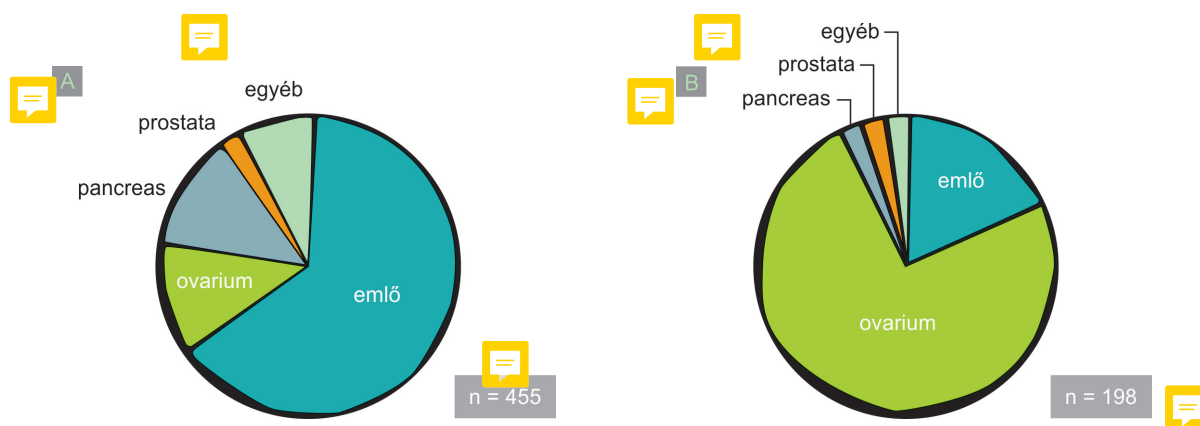
A molekuláris diagnosztika eszköztárának fejlődése az onkohematológiai kórképekhez hasonlóan a szolid daganatok genetikai hátterének vizsgálatában is jelentős áttöréseket hozott az elmúlt évtizedben. Számos daganattípus diagnózisának és klasszifikációjának elengedhetetlen része lett bizonyos molekuláris eltérések kimutatása, és az új kezelési lehetőségek megjelenésével a prediktív biomarkerek nagy érzékenységgű kimutatása a célzott- és immunterápiák sikeres alkalmazásának feltételévé vált. Az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriuma hazánk egyik vezető molekuláris patológiai centrumaként mintegy harminc klinikai onkológiai centrum számára végez komplex molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat (6. ábra). Évente több mint 2000 beteg esetében végzünk molekuláris vizsgálatokat, amelyek többségét tüdő-, vastagbél-, ovarium- és emlődaganatok teszik ki, de melanoma és pancreastumorok is szerepelnek a vizsgált entitások között (7. ábra). A szolid tumorok molekuláris diagnosztikájában a prediktív biomarkerek úgynevezett monogénes tesztelése vált a mindennapi gyakorlattá az elmúlt években, amely során az egyes molekuláris eltérések vizsgálata egyenként történik, gyakran eltérő technológiát/vizsgáló-

módszert alkalmazva. A prediktív biomarkerek vizsgálatának módszertani palettáján napjainkban a FISH és a PCR alapú hagyományos szekvenálási eljárások mellett bizonyos biomarkerek (PD-L1, ALK, ROS1) fehérjeszintű immunhisztokémiai kimutatásai is jelentős szereppel bír. Intézetünkben a 2020-as évben 10000 feletti monogénes molekuláris vizsgálatot végeztünk, melyek részét képezik a transzplantáció kapcsán vizsgált víruskimutatások is (8. ábra).

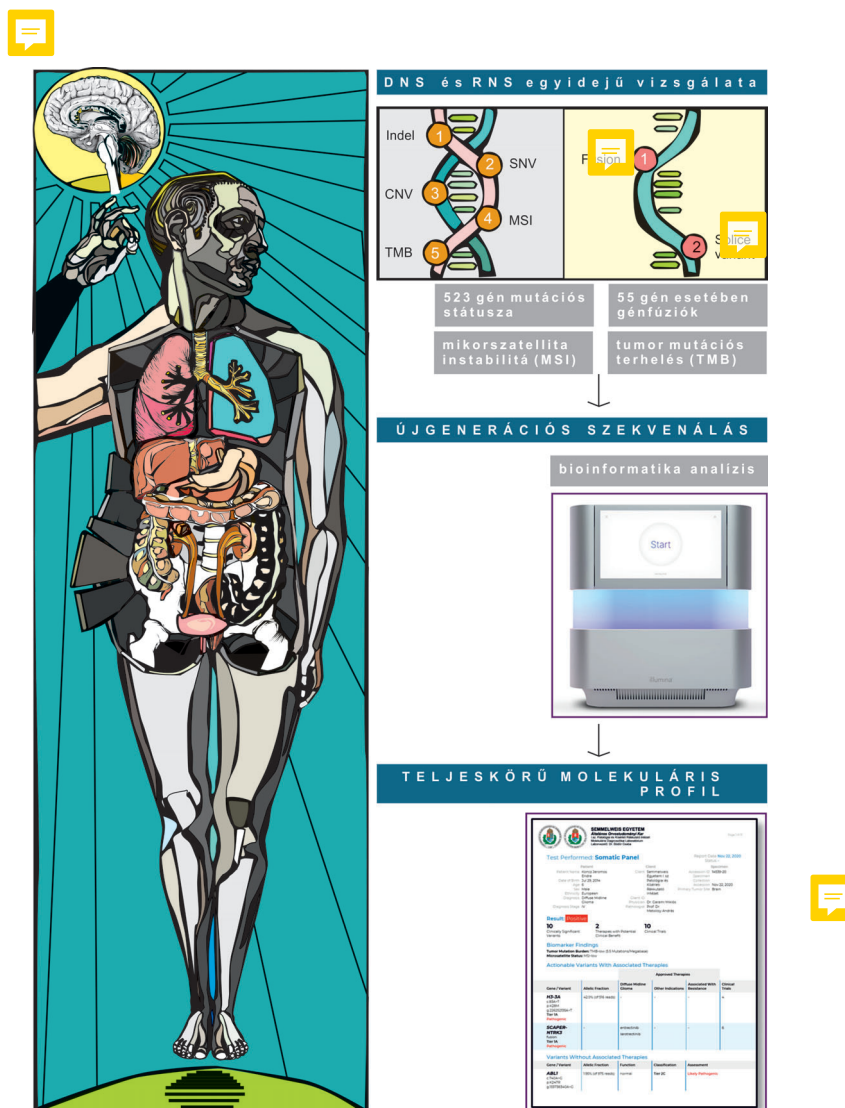
A szolid tumorok genetikai hátterének egyre pontosabb megismerésével és az új terápiás lehetőségek megjelenésével párhuzamosan emelkedik a vizsgálandó biomarkerek száma, ami jelentős terhet ró a molekuláris diagnosztikát végző laboratóriumokra. Mára egyértelművé vált, hogy a bővülő klinikai igényeknek az új, nagyobb áteresztőképességű, a genetikai eltéréseket szimultán módon vizsgálni képes technológiák bevonásával lehet megfelelni.¹² Ennek megtestesítője az újgenerációs szekvenálás, melynek jelentős térhódítása figyelhető meg napjainkban. A multigénes tesztelés költséghatékony lehetősége mellett az NGS nagyméretű gének gyors és érzékeny mutációanalízisére is kiválóan alkalmazható, amire remek példát szolgáltatnak a *BRCA1* és *BRCA2* gének, melyek vizsgálata nagy méretűből kifolyólag csak NGS alkalmazásával életszerű.¹³ Intézetünkben évek óta zajlik a **BRCA1/2** gének NGS-



8. ábra. Monogénes molekuláris patológiai vizsgálatok típusai az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában 2020-ban.



9. ábra. Újgenerációs szekvenálással végzett BRCA1- és BRCA2-vizsgálatok száma és vizsgált daganattípusok az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában 2020-ban. A: Csírvonalbeli BRCA1/2 mutációanalízisek megoszlása, B: szomatikus BRCA1/2 mutációanalízisek megoszlása



10. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében kidolgozott komprehenzív genomikus profilozási eljárás áttekintő összefoglalása.

alapú analízise szomatikus (szövetmintából) és csírvonalbeli (perifériás vérből) mutációk meghatározásának céljából ovarium- és emlődaganatok, valamint a legutóbbi időszakban pancreas és prosztata tumorok esetében is, évente közel 700 esetet vizsgálva (9. ábra). A leggyakoribb daganattípusok molekuláris hátterének ismertetésére jelen tematikus szám további közleményekben kerül sor, így az alábbiakban az elmúlt év jelentős NGS fejlesztésének, a komprehenzív genomikus profilozás bevezetésének ismertetésére szorítkozunk.



Multigén NGS vizsgálatok, komprehenzív genomikus profilozás

Az NGS nyújtotta legjelentősebb előrelépés a multigén tesztelés lehetősége, amely során DNS és RNS egyidejű vizsgálatával nagyszámú (akár több száz) gén vizsgálatára nyílik lehetőség. Az NGS alapú, ún. génpanelvizsgálatok elterjedése figyelhető meg napjainkban a szolid tumorok molekuláris diagnosztikájában, amelyek alkalmazásával a megfelelő célzott terápia kiválasztásához szükséges prediktív biomarkerek azonosíthatók a legkülönbözőbb daganattípusokban. Az NGS tesztek pontos indikációs területe, alkalmazá-

suk időzítése, az alkalmazandó génpanel mérete, valamint az eredmények interpretációja a molekuláris diagnosztika forrongó területe. Az ilyen típusú vizsgálatok alkalmazása kapcsán az első szakmai állásfoglalás 2020 nyarán közzétét az Európai Klinikai Onkológiai Társaság (ESMO) szakértői, amelyet jelen tematikus szám következő közleményében tekintünk át.¹⁴

Az NGS metodikák legkorszerűbb, legszélesebb körű analízist biztosító képviselője az ún. **komprehenzív genomikus profilozás** (CPG: „comprehensive molecular profiling”), amely jellemzően több száz gén (300–600) egyidejű vizsgálata során képes pontmutációk, kópiaszámeltérések, génfüziók (füziós transzkriptumok), valamint a **mikroszatellit** instabilitás (MSI), tumor mutációs terhelés (TMB) meghatározása és egyéb tumoragnosztikus biomarkerek azonosítására.^{15, 16} A 2020-as évben az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben kidolgoztunk egy CPG eljárást, amely a legkorszerűbb szekvenálási technológiákon (*NextSeq200*, *Illumina*) és bioinformatikai értékelő és klinikai interpretáló rendszereken (*Clinical Insight*, *Qiagen*; *PierianDx*) alapul (10. ábra). Az ún. *TSO500* panelen **alapuló** eljárással 523 gén esetében van lehetőség pontmutációk, kópiaszámeltérések és génfüziók

- ABL1 - ABL2 - ACVR1 - ACVR1B - ALOX12B - ANKRD11 - ANKRD26 - ARAF - ARFRP1 - ARID1B - ARID2 - ARID5B - ASXL1 - ASXL2 - ATRX - AURKA - AURKB - AXIN1 - AXIN2 - AXL - B2M - BBC3 - BCL10 - BCL2L1 - BCL2L11 - BCL2L2 - BCOR - BCORL1 - BCR - BRCA1 - BRCA2 - BRD4 - BTG1 - C11orf30 - CALR - CASP8 - CBFB - CBL - CD274 - CD276	- CD74 - CDC73 - CDK8 - CDKN1A - CDKN1B - CDKN2B - CDKN2C - CENPA - CHD2 - CHD4 - CIC - CKL - CRLF2 - CSF3R - CSNK1A1 - CTCF - CTLA4 - CTNNA1 - CUL3 - CUX1 - CXCR4 - CYLD - DAXX - DCUN1D1 - DDX41 - DHX15 - DICER1 - DIS3 - DNAJB1 - DNMT1 - DNMT3B - DOT1L - E2F3 - EED - EGFL7 - EIF1AX - EIF4A2 - EIF4E - EML4 - EPCAM - EPHA3 - EPHA5	- EPHA7 - EPHB1 - ERCC3 - ERCC4 - ERCC5 - ERRF1 - ETS1 - ETV1 - ETV4 - ETV5 - ETV6 - EWSR1 - FAM123B - FAM46C - FANCA - FANCC - FANCD2 - FANCE - FANCF - FANCG - FAS - FAT1 - FGF19 - FH - FLCN - FLI1 - FLT4 - FOXA1 - FOXO1 - FOXP1 - FRS2 - FUBP1 - FYN - GABRA6 - GATA1 - GATA2 - GATA3 - GATA4 - GATA6 - GID4 - GLI1 - GNA13	- GPR124 - GPS2 - GREM1 - GRIN2A - GRM3 - GSK3B - H3F3A - H3F3B - H3F3C - HGF - HIST1H1C - HIST1H2BD - HIST1H3A - HIST1H3B - HIST1H3C - HIST1H3D - HIST1H3E - HIST1H3F - HIST1H3G - HIST1H3H - HIST1H3I - HIST1H3J - HIST2H3A - HIST2H3B - HIST2H3C - HIST2H3D - HIST3H3 - HLA-A - HLA-B - HLA-C - HNRNP - HOXB13 - HSD3B1 - HSP90AA1 - ICOSLG - ID3 - IFNGR1 - IGF1 - IGF1R - IGF2 - IKBKE - IKZF1 - IL10	- IL7R - INHBA - INHBA - INPP4A - INSR - IRF2 - IRF4 - IRS1 - IRS2 - JAK1 - JUN - KAT6A - KDM5A - KDM5C - KDM6A - KEAP1 - KEL - KIF5B - KLF4 - KLHL6 - KMT2B - KMT2C - KMT2D - LAMP1 - LATS1 - LATS2 - LMO1 - LRP1B - LYN - LZTR1 - MAGI2 - MALT1 - MAP2K4 - MAP3K1 - MAP3K13 - MAP3K14 - MAP3K4 - MAPK1 - MAPK3 - MAX - MDC1 - MED12	- MEF2B - MEN1 - MGA - MITF - MST1 - MST1R - MYB - MYOD1 - NAB2 - NCOA3 - NCOR1 - NEGR1 - NF2 - NFE2L2 - NFKBIA - NKX2-1 - NKX3-1 - NOTCH4 - NSD1 - NTRK1 - NTRK2 - NTRK3 - NUP93 - NOTCH1 - PAK1 - PAK3 - PAK7 - PARK2 - PARP1 - PAX3 - PAX5 - PAX7 - PAX8 - PBRM1 - PDCD1 - PDCD1LG2 - PDK1 - PDPK1 - PGR - PHF6 - PHOX2B - PIK3C2B	- PIK3C2G - PIK3C3 - PIK3R2 - PIK3R3 - PIM1 - PLCG2 - PLK2 - PMAP1 - PMS1 - PNR1 - POLD1 - POLE - PPARG - PPM1D - PPP2R1A - PPP6C - PRDM1 - PREX2 - PRKAR1A - PRKCI - PRKDC - PRSS8 - PTPRD - PTPRS - PTPRT - QKI - RAB35 - RAC1 - RAD21 - RAD50 - RAD52 - RAF1 - RANBP2 - RARA - RASA1 - RBM10 - RECQL4 - REL - RFDW2 - RHEB - RHOA - RIT1	- RNF43 - RPS6KA4 - RPS6KB2 - RPTOR - RUNX1 - RUNX1T1 - RYBP - SDHA - SDHAF2 - SDHB - SDHC - SDHD - SETBP1 - SETD2 - SF3B1 - SH2B3 - SH2D1A - SHQ1 - SLIT2 - SMAD2 - SMAD3 - SMARCA4 - SMARCD1 - SMC1A - SMC3 - SNCAIP - SOC1 - SOX10 - SOX17 - SOX2 - SOX9 - SPEN - SPOP - SPTA1 - SRSF2 - STAG1 - STAG2 - STAT3 - STAT4 - STAT5A - STAT5B - STK40	- SUFU - SUZ12 - SYK - TAF1 - TBX3 - TCEB1 - TCF3 - TCF7L2 - TERC - TET1 - TFE3 - TFR3 - TGFB1 - TGFB2 - TMEM127 - TMPSR2 - TNFAIP3 - TNFRSF14 - TOP1 - TOP2A - TP63 - TRAF2 - TRAF7 - TSHR - U2AF1 - VEGFA - VTCN1 - WISP3 - WT1 - XIAP - XPO1 - YAP1 - YES1 - ZBTB2 - ZBTB7A - ZFH3 - ZNF217 - ZNF703 - ZRSR2	FUSIONS + SPLICING VARIANTS - ABL1 - AKT3 - ALK - AR - AXL - BCL2 - BRAF - BRCA1 - BRCA2 - CDK4 - CSF1R - EGFR - ETV4 - ETV5 - ERG - ESR1 - ETS1 - ETV1 - ETV4 - ETV5 - EWRS1 - FGFR1 - FGFR2 - FGFR3 - FGFR4 - FLI1 - FLT1 - FLT3 - JAK2 - KDR - KIF5B - KIT - KMT2A (MLL) - MET - MLL3 - MSH2 - MYC - NOTCH1 - NOTCH2 - NOTCH3 - NRG1 - NTRK1 - NTRK2 - NTRK3 - PAX3 - PAX7 - PDGFR - PDGFRB - PIK3CA - PPARG - RAF1 - RET - ROS1 - RPS6KB1 - TMPSR2
--	--	--	--	--	--	--	--	---	--

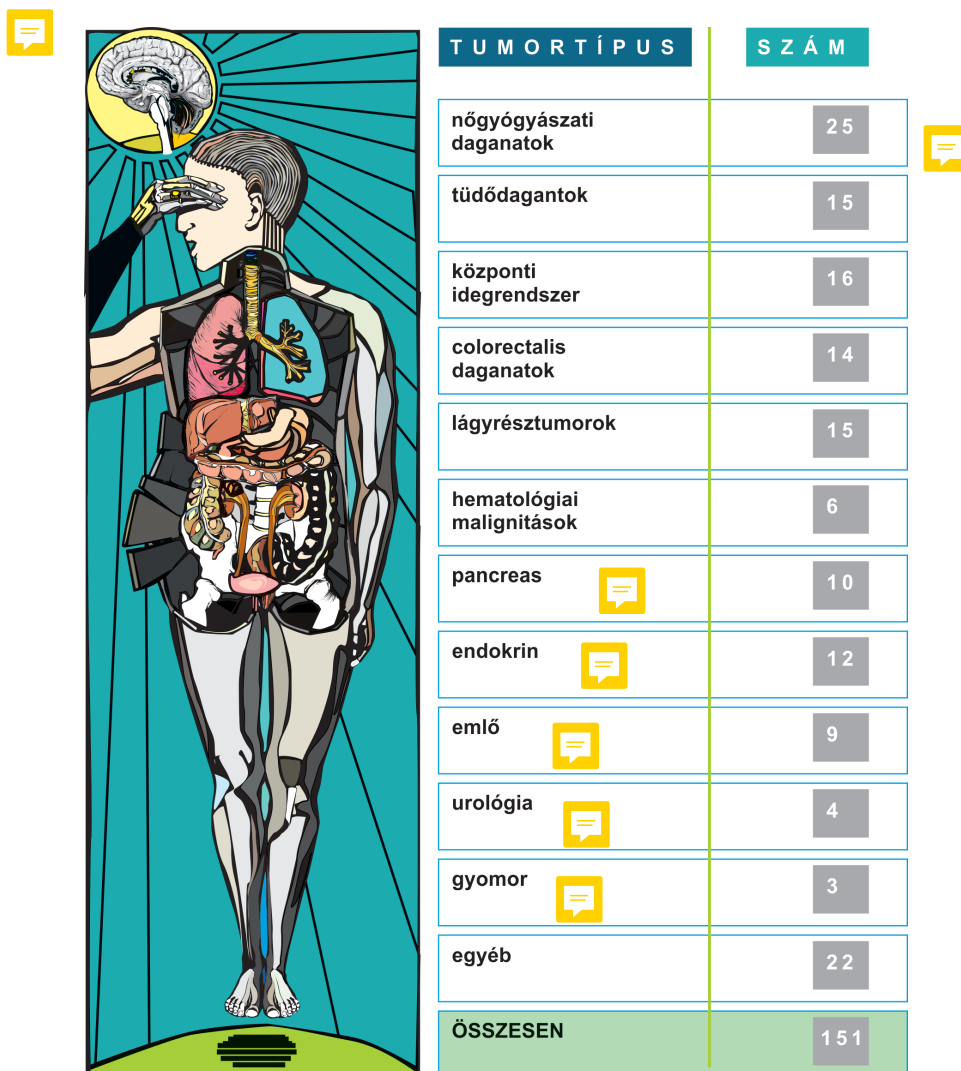
11. ábra. A Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében kidolgozott komprehenzív genomikus profilozási eljárás által vizsgált gének listája.

azonosítására (11. ábra). Az alkalmazott bioinformatikai szoftverek pedig a már engedélyezett terápiák mellett valamennyi klinikai tanulmány azonosítására is képesek a meghatározott genetikai eltérések alapján. A vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozás keretében érhető el Intézetünkben.

A vizsgálatot eddig 151 beteg esetében végeztük el, a legkülönbözőbb daganattípusok esetében (12. ábra). A szekvenálási eredmények részletes bemutatása külön közlemény tárgyát képezi a közeljövőben, azonban kiemelendő, hogy az eljárással számos beteg esetében azonosítottunk célozható genetikai eltéréseket. A jól ismert és monogén eljárással is vizsgált gének (*ALK*, *ROS1* fúziók, *EGFR*, *BRAF*, *BRCA1/2* mutációk és kópiaszámeltérések eltérésein túl, a teljesség igénye

nélkül, több esetben azonosítottunk terápiás jelentőséggel bíró *NTRK1-3* fúziókat, *RET* mutációkat, a homológ rekombinációs „repair” rendszer komponenseinek (*ATM*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*) mutációit, *PIK3CA* mutációkat, *IDH1/2* mutációkat, valamint új hiszton metiltranszferázokkal célozható *EZH2*, *SMARCB1* és *SMARCA4* mutációkat. (ábra?)

Fontos kiemelni, hogy a korszerű multigén NGS vizsgálatok esetében is kiemelt jelentőséggel bír a megfelelő minőségű és mennyiségű vizsgálati minta. Az NGS-vizsgálatok a szövettani minták mellett általában citológiai mintákból is elvégezhetőek, azonban 20% alatti tumorsejtarány esetében a vizsgálat elvégzése nem javasolt.



12. ábra. Komprehenzív genomikus profilozással vizsgált esetek megoszlása az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában.

Összefoglalás

A daganatok genetikai hátterének alapos feltérképezésével párhuzamosan számos új molekuláris és immunológiai támadáspontú kezelés került bevezetésre az onkológiában, ami új távlatokat nyitott a legtöbb daganattípus kezelésében, hozzájárulva a betegek hosszabb várható túléléséhez. Az így kialakult precíziós medicina egyik alappilléret nyújtja a molekuláris patológia/diagnosztika, melynek feladata az új kezelési lehetőségek sikeres alkalmazásához szükséges prediktív biomarkerek korszerű módszerekkel való érzékeny kimutatása. Mára a molekuláris patológia multidiszciplináris területté vált, ahol a klinikus és a beteg számára hasznosítható eredmények szolgáltatásához a korszerű technológiák alkalmazása mellett patológusok, molekuláris diagnoszták és bioinformatikusok szoros együttműködése szükséges.

Az elmúlt években e fejlődési folyamat magával hozta az újgenerációs szekvenálási technológiák meghonosítását a mindennapi diagnosztikában. Figyelembe véve a tényt, hogy a korszerű NGS vizsgálatok költsége ma már nem haladja meg a szekvenciálisan végzett monogén vizsgálatok költségét, a technológia további térnyerésére lehet számítani a közeljövőben. Ugyanakkor a vizsgálatokat végző laboratóriumok és az új technológiák akkreditációja, valamint a megfelelő minőségbiztosítás kidolgozása terén még számos teendő áll a szakma képviselői előtt.

Irodalom

1. Kiraly AP, Alpar D, Fesus V, Marosvari D, Matolcsy A, Boder C. [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology]. *Magy Onkol* 2016; 60:88-98.
2. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:513-26.
3. Kiss R, Kiraly AP, Gaal-Weisinger J, Marosvari D, Gango PA, Demeter J, et al. [Molecular monitoring of myeloid leukemia]. *Magy Onkol* 2017; 61:57-66.
4. Krahling T, Balassa K, Meggyesi N, Bors A, Csomor J, Batai A, et al. [Complex molecular genetic algorithm in the diagnosis of myeloproliferative neoplasms]. *Orv Hetil* 2014; 155:2074-81.
5. Gango A, Mozes R, Boha Z, Kajtar B, Timar B, Kiraly PA, et al. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* 2018; 65:42-8.
6. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; 131:2745-60.
7. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018; 32:1070-80.
8. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia* 2017; 31:1477-81.
9. Aczél D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, Illés S, Boder C, et al. [Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia]. *Hematológia-Transzfuziológia* 2019; 52:136-48.
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127:2391-405.
11. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129:424-47.
12. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, Alfranca A, Sanchez-Madrid F, Quintela-Fandino M. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? *EClinicalMedicine* 2020; 25:100487
13. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer* 2020; [????????????](#)
14. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2020; 31:1491-505.
15. Chakravarty D and Solit DB. Clinical cancer genomic profiling. *Nat Rev Genet* 2021; [????](#)
16. Pestinger V, Smith M, Sillo T, Findlay JM, Laes JF, Martin G, et al. Use of an Integrated Pan-Cancer Oncology Enrichment Next-Generation Sequencing Assay to Measure Tumour Mutational Burden and Detect Clinically Actionable Variants. *Mol Diagn Ther* 2020; 24:339-49.