

A krónikus lymphocytás leukaemia genetikai háttere és személyre szabott terápiája

Genetic landscape and targeted therapy of chronic lymphocytic leukemia

Kotmayer Lili¹, Balogh Alexandra², Gróf Stefánia¹, Gángó Ambrus¹, Bödör Csaba¹
¹ HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest
² Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Semmelweis Egyetem, Budapest
E-levél: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) terápiája az onkohematológia dinamikus fejlődésének köszönhetően az elmúlt években jelentős változásokon ment keresztül. A citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálati módszerek fejlesztéseivel párhuzamosan számos olyan genetikai eltérést ismerhettünk meg, melyek fontos szerepet töltenek be a kórkép patogenezisében, valamint prognosztikai és prediktív markerként közvetlenül befolyásolják a CLL kórlefolyását és kezelését. A kedvezőtlen prognózissal társuló genetikai eltérések, mint a 17p kromoszómarégió deléciója, a *TP53* gén mutációi, valamint a mutációt nem hordozó *IGHV* gén rutinszerű vizsgálata összetett rizikóbesorolások megjelenését eredményezte CLL-ben, melyek a prognosztikai jelentőség mellett alapjaiban rajzolták át a kórkép terápiáját. Az általuk azonosítható magas rizikójú betegek számára a hagyományos kemoterápiás és kemoimmunoterápiás kezelések mellett napjainkban olyan célzott terápiás gyógyszerek váltak hozzáférhetővé, mint a BTK-gátló ibrutinib és a BCL2-inhibitor venetoclax, melyekkel a korábban kedvezőtlen prognózisú betegcsoportokban is átütő eredmények érhetők el. A genetikai defektusok azonosítására alkalmas vizsgálati módszerek mindemellett jelenleg már a terápiarezisztenciáért felelős mutációk detektálásában és monitorozásában is fontos szerepet töltenek be, így a CLL genetikai hátterének komplex feltérképezése a kórkép modern diagnosztikája és kezelése során egyaránt elengedhetetlen.

KULCSSZAVAK krónikus lymphocytás leukaemia, célzott terápia, prognosztikai markerek

SUMMARY Dynamic evolution of today's oncohematology has revolutionized the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). In line with the recent development of cytogenetic and molecular methods, several distinct genetic alterations were found to be associated with adverse disease prognosis with many of them directly affecting the therapeutic choices for CLL. Screening for genetic abnormalities conferring adverse prognosis, such as the deletion of chromosomal region 17p, *TP53* mutations and unmutated *IGHV* status led to the development of risk stratification models changing the fundamental principles of CLL therapy. Patients harboring adverse prognostic genetic alterations defined by these algorithms fail to respond to standard chemotherapeutic and chemoimmunotherapeutic regimes but novel targeted therapies such as the BTK inhibitor ibrutinib and BCL2 inhibitor venetoclax have achieved remarkable results in these high-risk patient groups. Besides of their important role in risk stratification models and therapeutic decisions, ultra-sensitive molecular methods can now also be used for monitoring the efficacy of targeted therapies as well as to timely detect the emergence of distinct gene mutations associated with therapy resistance in CLL. These cytogenetic and novel molecular methods contribute greatly to our understanding of CLL's genetic background and are now essential to the modern diagnostics and therapy of this disease.

KEY WORDS chronic lymphocytic leukemia, targeted therapy, prognostic markers

Az elmúlt évtizedben robbanásszerű fejlődés ment végbe a hematológiai malignitások genetikai hátterének megismerésében, amely a diagnosztikai, prognosztikai és terápiás eszköztár bővülését hozta magával. Kiemelten igaz ez a krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) genetikai hátterének megismerésére, melyben bár egyes napjainkban is vizsgált citogenetikai eltérések progresszióra és túlélésre gyakorolt jelentősége már

Rövidítések

<i>BCL2</i>	<i>B-sejtes lymphoma 2 protein</i>	<i>MLPA</i>	<i>multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció</i>
<i>BCR</i>	<i>B-sejt receptor</i>	<i>NGS</i>	<i>újgenerációs szekvenálás</i>
<i>BTK</i>	<i>Bruton-féle tirozin-kináz</i>	<i>RFC</i>	<i>rituximab-fludarabin-cyclophosphamid</i>
<i>CLL</i>	<i>krónikus lymphocytás leukaemia</i>	<i>R/R CLL</i>	<i>relabáló/refrakter CLL</i>
<i>ddPCR</i>	<i>digitális droplet PCR</i>	<i>SMH</i>	<i>szomatikus hipermutáció</i>
<i>ERIC</i>	<i>European Research Initiative on CLL</i>	<i>TP53</i>	<i>tumor protein 53</i>
<i>FC</i>	<i>fludarabin-cyclophosphamid</i>	<i>VAF</i>	<i>variáns allélfrekvencia</i>
<i>FDA</i>	<i>Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerügynökség</i>	<i>WES</i>	<i>teljes exomszekvenálás</i>
<i>FISH</i>	<i>fluoreszcens in situ hibridizáció</i>	<i>WGS</i>	<i>teljes genomsekválás</i>
<i>IGHV</i>	<i>immunglobulin gén</i>		

régóta ismert, az azonosított genetikai variánsok a terápiás döntéshozatalban egészen a közelmúltig nem játszottak fontos szerepet. Az elmúlt évek újgenerációs tanulmányainak köszönhetően azonban feltárult előtünk a CLL genomja és a változatos hatásmechanizmusú célzott gyógyszerek kifejlesztése napjainkban már a CLL-es betegcsoport jelentős részében lehetővé teszi a személyre szabott kezelés alkalmazását.¹⁻⁴ Összefoglaló közleményünkben röviden áttekintjük a CLL diagnosztikáját, a hagyományosan alkalmazható kemoimmunoterápiás modalitásokat, valamint részletesebben ismertetjük a prognosztikai és prediktív szempontból jelentős genetikai markereket és a CLL molekuláris célzott terápiájának fegyvertárát.

A CLL klinikai megjelenése és diagnosztikája

A CLL a leggyakrabban előforduló felnőttkori leukaemia a fejlett országokban, Magyarországon évente mintegy 300–500 új esettel. A CLL az érett B-lymphocytákat érintő malignitás, melyben a korlátlan proliferációs képességüknek köszönhetően CD5 és CD19 sejtfelszíni markereket hordozó klonális B-sejtek szaporodnak fel a perifériás vérben, a csontvelőben és a nyirokszervekben. A kórkép jellemzően az idősebb korosztályt érinti, a betegek medián diagnóziskori életkora 72 év, amely kifejezett férfi dominanciával társul, és az esetek túlnyomó részében sporadikusan jelenik meg, családi halmozódást ritkán mutat.⁵⁻⁷

A CLL klinikai megjelenése nagyon változatos, a betegek jelentős részében a perifériás vérben mérhető lymphocytosistól eltekintve a betegség akár évekig tünetmentes maradhat, míg másoknál már a diagnózis időpontjában megfigyelhetők a szerteágazó klinikai tünetek. A klinikai manifesztációval járó esetekben az emelkedett fehérvérsejtszám mellett gyakori tünet a nyirokcsomó-megnagyobbodás, amely jellemzően már a kórkép kezdeti stádiumában jelen van, és amely több klinikai rizikóbecslő algoritmus részét képezi (Rai- és Binet-féle osztályozások).⁷⁻⁹ A betegség progressziójával párhuzamosan lép- és májmegnagyobbodás, valamint a jellegzetes B-tünetek (láz, éjszakai verejtékezés, fogyás) is jelentkezhetnek. A nem megfelelően funkcionáló daganatos B-sejtek gátolják az immunrendszer egészséges működését, ezáltal a CLL-es betegeknél gyakoribbak az elhúzódó, gyakran atípusos fertőzések, valamint egyes autoimmun folyamatok is (autoimmun anaemia, thrombocytopenia), melyek sok esetben a betegség első alarmírozó tünetei lehetnek. Mindemellét

a gyorsan osztódó tumorsejtek miatt az egészséges vérképzés kiszorulhat a csontvelőből, melynek következtében a betegség későbbi stádiumaiban több sejtvonalat érintő eltérések, leggyakrabban anaemia és thrombocytopenia alakulhat ki, tovább súlyosbítva a klinikai képet.

A heterogén klinikai megjelenés miatt a CLL diagnózisa a szakmai irányelvek alapján a perifériás vérben mérhető $5 \times 10^9/l$ -t meghaladó keringő lymphocytaszám, valamint az áramlási citometriával igazolt klonalitás jelenlétén alapszik, a klinikai tünetek nem szerepelnek a diagnosztikus kritériumok között.^{10, 11} A csontvelőmintából vagy nyirokcsomó-biopsziából végzett patológiai vizsgálatok segíthetik a diagnózist, ezért a rutin diagnosztikai panelben alkalmazott perifériás vérkenet és a perifériás vérből végzett áramlási citometriás mérések mellett egyes esetekben szintén az elvégzendő vizsgálatok közé tartoznak. A nyirokcsomóból származó core-biopszia a CLL mellett a kis lymphocytás lymphoma (SLL) differenciáldiagnózisa során is hasznos kiegészítő vizsgálatként szolgálhat, hiszen utóbbi entitás egyedül perifériás vér érintettségében tér el a CLL-től.⁷ A laboratóriumi paraméterekben tapasztalható eltérések közül kiemelendő az LDH szérumszint-emelkedés, valamint a megnövekedett $\beta 2$ -mikroglobulin szérumszint, mely utóbbi paraméter a CLL-IPI rizikóbecslő algoritmusban is (CLL-IPI) vizsgálható eltérés.¹² Az emelkedett szérum $\beta 2$ -mikroglobulin- és LDH-szint nem minden beteg esetében azonosítható eltérések, jelenlétük agresszívebb kórlefolásra és kedvezőtlenebb prognózisra utal, ezért első sorban a betegség előrehaladott stádiumaiban figyelhetők meg.

Kemoterápia és kemoimmunoterápia CLL-ben

A CLL szerteágazó klinikai megjelenését jól szemlélteti, hogy a betegek jelentős hányadában a kórkép indolens lefolyású és az esetek mintegy harmadában évekig nem igényel terápiát („watch and wait” stratégia), azonban a betegek egy további részének agresszív betegséggel kell szembenéznie. A gyors progresszióval és gyakori relapsusokkal társuló relabáló/refrakter CLL (R/R CLL), valamint az igen kedvezőtlen prognózisú Richter-transzformáció azonnali terápiás beavatkozást igényel, de egy éveken keresztül stabil betegség újonnan induló, lassú progressziója esetén is szükségessé válhat a betegség kezelése.¹³ A kezelést igénylő esetekben az újonnan megjelenő markáns klinikai tünetek és

az állapotromlás jelentik a legfontosabb terápiás indikációt. A CLL korábban ismertetett klinikai manifesztációi közül a hematológiai eltérések (súlyos, csontvelő-infiltráció okozta anaemia, thrombocytopenia, szteroidrefrakter immuncytopenia) mellett a leggyakrabban a gyorsan növekedő nyirokcsomók, máj- és lép-megnagyobbodás, rapidan emelkedő lymphocytaszám, valamint a betegség aktivitására utaló B-tünetek indokolhatják a kezelés megkezdését, illetve korábban kezelésben részesülő beteg esetén a terápiaváltást.

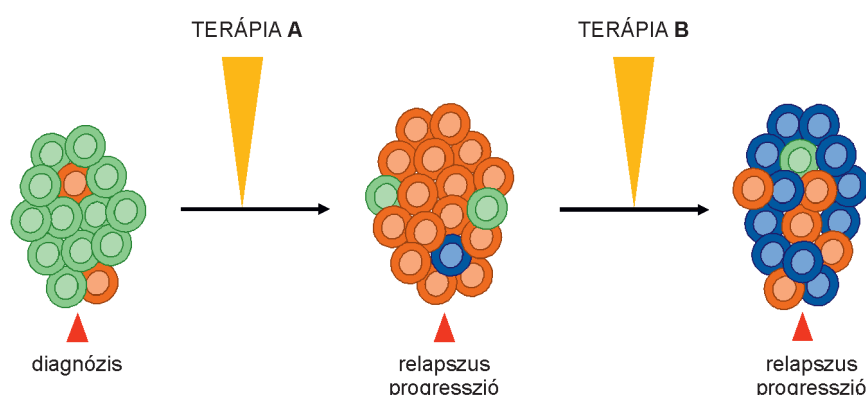
A CLL terápiája során a jó állapotú, fiatal és kedvezőtlen genetikai eltérést nem hordozó betegek esetében a kemo-, illetve kemoimmunoterápiás szerek szerepelnek elsővonalban választandó modalitásként. A kórkép első szisztémás kezelését az 1950-es években bevezetett alkiláló ágensek (chlorambucil, cyclophosphamid) és a szteroidok jelentették, melyek antimetabolitokkal (fludarabin) együtt, kombinált terápiaként alkalmazva kerültek be a terápiás protokollokba. A számos hatóanyag és kombináció közül a fludarabin–cyclophosphamid (FC) kombinált terápia a két szer szinergista hatásának köszönhetően olyannyira felülmúlta a korábban elérhető kemoterápiák hatékonyságát, hogy az FC kombináció napjainkban is a CLL kemoterápiájának alapját képezi.¹⁴

A következő áttörést az immunterápia megjelenése jelentette a CLL kezelése során. Az anti-CD20 monoklonális antitest rituximab és a korábban is alkalmazott FC kombinációja (RFC) a teljes túlélés tekintetében meghaladta az FC kombináció hatékonyságát, valamint alkalmazásával elsőként elérhetővé vált a tartós teljes remisszió is.¹⁵ A rituximab, amely az első B-lymphocyták CD20 sejtfelszíni markere ellen kifejlesztett hu-

manizált antitest, direkt és immunmediált módon is akadályozza a CD20 antigént expresszáló sejtek túlélését, nagyban hozzájárulva ezzel az RFC erős daganatellenes hatásához, melynek köszönhetően a kombináció 2009 óta a fiatal, jó állapotú CLL-es betegek elsővonalbeli kezelési módjává vált.

A jelenleg is alkalmazott RFC mellett az elmúlt időszakban további kemo- és immunterápiás szerek (bendamustin, alemtuzumab) jelentek meg a CLL kezelésében, alternatívát nyújtva ezzel az agresszívebb RFC kombinációt rosszul toleráló betegcsoportok számára. Mindemellett a rituximab sikerét követően napjainkban már másod- és harmadvonalbeli anti-CD20 antitestek (ofatumumab, obinutuzumab) is elérhetővé váltak, melyek kedvezőbb mellékhatásprofiljuknak és nagyobb specificitásuknak köszönhetően jelentősen hozzájárulnak a rosszabb állapotú, úgynevezett „slow-go” betegek redukált intenzitású kemoimmunoterápiájának sikeréhez.¹⁶

Bár a CLL-ben alkalmazott kemoimmunoterápia a betegek többségénél hatékony kezelési módot jelent, az esetek egy kis hányadában az adekvát terápia ellenére is progresszió figyelhető meg, melynek pontos mechanizmusát a CLL genetikai hátterének feltérképezésével ismerhettük meg. A kemoterápiás szerek által a tumorsejt-populációra gyakorolt pozitív szelekciós hatás a rátermettebb, túlélést elősegítő genetikai eltéréseket hordozó sejtek számára szelekciós előnyt jelent, melyek ennek köszönhetően dominánssá válnak és kemo-rezisztens betegség kialakulásához vezetnek (1. ábra).¹⁷ A terápia indukálta klonális evolúció és a hatására létrejövő terápiaerezisztencia sokáig kedvezőtlen prognózissal társult, azonban a későbbiekben ismerte-



1. ábra: A terápia indukálta klonális evolúció folyamata CLL-ben. A különböző kemoimmunoterápiás kezelési vonalak által kifejtett pozitív szelekciós nyomás hatására a kiindulási tumorsejtpopulációban kis arányban jelen lévő, szubklonális genetikai eltéréseket hordozó CLL-es sejtek aránya a szelekciós előnynek köszönhetően megnő. A szubklón expanzióját követően a CLL az eredetitől eltérő genetikai profillal jellemezhető. [Kotmayer Lili, Rektori pályázat (2019) alapján módosítva]

tett molekuláris célzott terápiák megjelenése átütő eredményeket hozott ezen korábban nehezen kezelhető esetekben is.

Prognosztikai és prediktív markerek CLL-ben

Citogenetikai eltérések

A CLL patogenezisében fontos szerepet betöltő citogenetikai eltérések prognosztikai jelentősége a célzott terápiák térnyerésének köszönhetően egyre inkább előtérbe kerül. A citogenetikai vizsgálati módszerekkel, kariotipizálással és fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) azonosítható aberrációk, melyek az összes megbetegedés mintegy 80%-ában detektálhatók, a klinikai paraméterek mellett szintén fontos információt szolgáltatnak a CLL várható kórlefolyásáról. *Döhner és mtsai* 2000-ben egy olyan prognosztikai modellt írtak le, melyben a betegek az egyes citogenetikai eltérések hordozása alapján egymástól jól elkülönülő prognosztikai alcsoportokba sorolhatók.¹³ Az általuk definiált betegcsoportokban a progresszió és a teljes túlélés időtartama négy független citogenetikai eltérés jelenlétével mutat szoros összefüggést, melyek a 11q, 13q és 17p kromoszómarégiók deléciója, valamint a 12-es kromoszóma triszómiája.

A citogenetikai prognosztikus markerek közül egyedülként a 13q deléció bizonyult a léziót nem hordozó normál kariotípusnál kedvezőbb eltérésnek, míg a 12-es kromoszóma triszómiája intermedier prognózist jelent. Az algoritmus alapján a 11q és 17p régiók vesztesége társulnak a legrövidebb teljes túléléssel, mivel az ezen a kromoszómakarokon elhelyezkedő *BIRC3*, *ATM* és *TP53* tumorszupresszor gének deléciói az apoptózis elmaradásához és a tumorsejtek fokozott túléléséhez vezetnek.³ A kedvezőtlen prognózisú eltérések közül jelentőségét tekintve kiemelendő a 17p kromoszómarégió deléciója, amely a *TP53* diszfunkciók csoportjába tartozik, és amely a gyors progresszió mellett a terápia indukálta klonális evolúció miatt rövid időn belül kemorezisztens CLL kialakulásához vezet.

Az egyes citogenetikai léziók prognosztikai jelentősége mellett az eltérések együttes előfordulása is független prognosztikai marker CLL-ben, a 3 vagy több citogenetikai abnormalitás jelenléte kedvezőtlen prognózissal társul. Az úgynevezett komplex kariotípus esetén a teljes túlélés időtartamát a FISH-sel azonosított eltérések száma is befolyásolja, így a több lézió hordozása rövidebb túléléshez és gyors progresszióhoz ve-

zet.¹⁸ Bár a komplex kariotípus független kedvezőtlen prognosztikai marker, vizsgálata jelenleg nem része a rutin diagnosztikai paneleknek, mivel a FISH próbákkal egyszerre csak limitált számú eltérés detektálható, azonban a CLL kutatásában elterjedt a vizsgálata.

A CLL genetikai hátterének feltérképezésével a citogenetikai léziók mellett számos további molekuláris eltérést ismerhettünk meg, melyek hordozása szintén módosítja a betegség prognózisát és amelyek szintén hozzájárulnak a CLL-ben megfigyelhető rendkívül heterogén klinikai lefolyás létrejöttéhez. Ezeket a genetikai eltéréseket a napjainkban alkalmazott integrált prognosztikai modell foglalja magába és a továbbiakban részletesen is bemutatásra kerülnek.¹⁹

IGHV mutációs státusz

A kórlefolyást befolyásoló és prediktáló faktorok közül kiemelendő az immunglobulin gén (*IGHV*) mutációs státusza, amely az egyik legfontosabb prognosztikai marker. A B-sejtek érési folyamatának utolsó lépéseként az *IGHV* gén nukleotidsorrendje a folliculusok csíracentrumában lejátszódó szomatikus hipermutáció (SMH) során számos ponton megváltozik, módosítva ezzel a keletkező fehérje térszerkezetét. A fiziológiásan is végbemenő SMH-nak köszönhetően a módosult IGHV lehetővé teszi a specifikusabb antigénfelismerést, valamint nagyságrendekkel növeli a felismert antigének számát.²⁰

CLL-ben a többi érett B-sejtes malignitástól eltérően a folyamat az esetek mintegy 50%-ában nem megy végbe és az *IGHV* gén szekvenciája a CLL-es tumorsejtekben megegyezik a csíravonalbeli DNS nukleotidsorrendjével. Amennyiben az *IGHV* az SMH elmaradása miatt minimum 98%-os csíravonali homológiát mutat, mutációt nem hordozó IGHV-ról (unmutated IGHV, IGHV-U) beszélünk, amely polireaktív B-sejt-receptor és túlaktivált jelátviteli út vonal létrejöttéhez vezet, fokozva ezzel a CLL sejtek proliferációs készségét. 97% alatti csíravonali homológia mutált IGHV-t (IGHV-M) jelent, melynek hordozása a kedvezőtlen prognózisú IGHV-U jelenlététől eltérően a kedvezőbb kórlefolyású csoportba sorolja a betegeket. A 97–98% közötti átmeneti zóna az úgynevezett borderline IGHV (IGHV-B), amely intermedier prognózissal társul.²⁰

Az eltérő IGHV mutációs státuszok a kórlefolyás módosítása mellett közvetlenül is befolyásolják a terápiás döntéseket. Az IGHV-M gént hordozó betegek kiűnően reagálnak a korábban ismertetett kemoimmunoterápiás rezsimekre, melyekkel ebben a beteg-

populációban akár mérhető reziduális betegség (measurable residual disease, MRD) nélküli remisszió is elérhető.^{21, 22} Ezzel szemben a kedvezőtlen prognózisú IGHV-U betegcsoportban gyakori az R/R CLL előfordulása, amely a hagyományos kezelési modalitások mellett rövidebb teljes túlélést eredményez. Az IGHV-U betegek számára napjainkban már elérhető célzott terápia, mely az elmúlt években alapjaiban rajzolta át a kedvezőtlen prognózisú betegcsoportok kezelését és amelyet a későbbiekben részletesen is bemutatunk.

Mivel az IGHV mutációs státusz közvetlenül befolyásolhatja a terápiás döntéseket, meghatározása jelenleg már a CLL modern kezelésének elengedhetetlen része. A monoklonális csíravonali homológia a betegség lefolyása alatt állandó, mértéke nem változik, ezért a mutációs státuszt a terápia során a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) nemzetközi ajánlásainak megfelelően elegendő egyszer meghatározni.²⁰ Intézetünkben az IGHV mutációs státusz meghatározása 2017 óta elérhető, melynek köszönhetően az elmúlt 4 évben 28 magyarországi onkohematológiai centrumból származó összesen 1298 beteg mintáján végeztük el a vizsgálatot. A nemzetközi viszonylatban is jelentős mintaszám 53%-ában IGHV-U, 42%-ában IGHV-M immunoglobulint azonosítottunk, az esetek fennmaradó részében pedig az IGHV-B alcsoportba tartozó szekvenációt detektáltuk Sanger-szekvenálással, az ERIC nemzetközi ajánlásnak megfelelően (2A ábra).

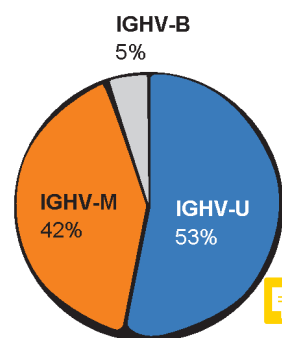
A CLL molekuláris háttere

A citogenetikai léziók és az IGHV mutációs státusz mellett olyan molekuláris eltérések is ismertek, melyek CLL-ben további prognosztikai és prediktív markereként alkalmazhatók. Az elmúlt évtizedben a teljes genom- és exomszekvenálást (whole genome sequencing, WGS és whole exome sequencing, WES)

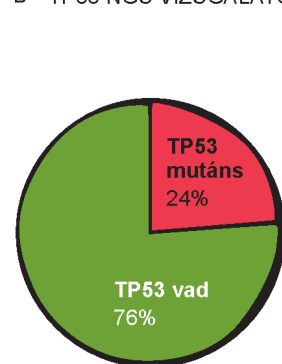
alkalmazó tanulmányoknak köszönhetően megismerhettük a CLL genetikai hátterét, melynek komplexitása elmarad a szolid tumorokban és más hematológiai entitásokban tapasztaltaktól.^{1, 3, 4, 23} A leggyakoribb betegség-asszociált visszatérő mutációk CLL-ben a *NOTCH1*, *ATM*, *SF3B1*, valamint a *TP53* géneket érintő eltérések.^{3, 23} Ezen driver mutációk közül a legkorábban azonosított genetikai léziók a *NOTCH1* gén mutációi voltak, melyek az esetek mintegy 10%-ában detektálhatók.⁴ A *NOTCH1* egy transzkripciósfaktort kódol, amely a sejtproliferáció jelátviteli útvonalának szabályozásáért felelős. A gén 34-es exonját érintő frameshift mutációk megakadályozzák a keletkező fehérje ubiquitinmediált degradációját, amely a *NOTCH1* intracelluláris felhalmozódásához vezet.²⁴ A *NOTCH1* eltérései kedvezőtlen prognózissal társulnak, valamint egyes specifikus IGHV alcsoportokhoz hasonlóan (subset CLL#8 IGHV) fokozzák a Richter-transzformációra való hajlamot.²⁴⁻²⁶

A *TP53* gén mutációi a legtöbb szolid és hematológiai malignitáshoz hasonlóan CLL-ben is előfordulnak, hordozásuk igen kedvezőtlen prognózissal társul. A „genom őrzőjének” is nevezett *TP53* kiemelt szerepet játszik a DNS-károsodás által indukált apoptózis létrehozásában és szabályozásában, ezáltal az egyik legfontosabb tumorsuppresszorunk. A gént érintő defektusok gátolják az átíró fehérje normális működését, amely DNS-károsodás esetén a sejtciklus felfüggesztésének elmaradásához vezet. A *TP53*-defektusok két csoportra oszthatók, melyek közül a gén lókuszt tartalmazó 17p kromoszómarégió delécióját a citogenetikai eltérések között már ismertettük. A *TP53*-diszfunkciók másik csoportját a gént érintő mutációk alkotják, melyek közül leggyakrabban aminosavcserével járó missense mutációk fordulnak elő, de frameshift, nonsense, valamint splice site mutációk is ismertek, melyek a gén valamennyi exonját érinthetik.²⁷⁻²⁹

A IGHV MUTÁCIÓS STÁTUSZ MEGHATÁROZÁS



B TP53 NGS VIZSGÁLATOK



2 ábra: A hazai CLL-es betegpopuláció mintáin végzett IGHV mutációs státusz meghatározások (A) és TP53 NGS vizsgálatok (B) száma a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Rákkutató Intézetben, 2017-2021 között.

CLL-ben a *TP53*-diszfunkciók erős prediktív faktorok, melyek vizsgálata a közvetlen terápiás relevancia miatt elengedhetetlen. Mivel a DNS-károsodásra adott válasz károsodik, a *TP53*-defektust hordozó betegek igen kedvezőtlenül reagálnak a konvencionális kemoterápiákra. Mindemellett a kemoterápia indukálta szelekciós nyomás hatására a *TP53*-defektust hordozó szubklónok szelekciós előnyhöz jutnak és ezáltal a kemorefrakter CLL sejtek aránya jelentősen megnő, amely korábban igen kedvezőtlen prognózist jelentett.²³ A *TP53*-defektust hordozó betegek terápiája az ismertett mechanizmusok miatt sokáig nagy kihívást jelentett, azonban a *TP53*-független célzott terápiák megjelenése ezekben az esetekben is hatalmas áttörést hozott.³⁰ A CLL-ben előforduló klonális és szubklonális *TP53* mutációk vizsgálatára ezen közvetlen terápiás jelentőség miatt kiemelten szükség van, detektálásukhoz jelenleg a nemzetközi ERIC ajánlásának megfelelően már hazánkban is az érzékeny új generációs szekvenálást (NGS) alkalmazzuk, mellyel a gén teljes kódoló régiójában előforduló eltérések azonosíthatók.^{31, 32} A *TP53*-at érintő mutációk NGS-vizsgálata jelenleg már az összes hazai CLL-es beteg számára elérhető. 2018-tól kezdve az ERIC nemzetközi ajánlásnak megfelelően NGS alkalmazásával végezzük a diagnosztikus méréseket a gén valamennyi exonjának célzott szekvenálásával, folyamatosan növekvő mintaszámmal. A cikk írásának időpontjában összesen 742 beteg esetében végeztük el a *TP53* szekvenálást, melyből az esetek 23,3%-ában azonosítottunk patogén variánst (2B ábra). Mivel a kemoterápia hatására a *TP53* defektust hordozó klónok aránya változik, a gén NGS-vizsgálatát valamennyi kezelési vonal előtt érdemes újból elvégezni.

A *NOTCH1* és *TP53* mutációk mellett CLL-ben a különböző jelátviteli útvonal tagjainak mutációi is gyakori driver eltéréseknek számítanak, melyek közül klinikai relevancia és gyakoriság alapján kiemelendők a *MYD88* és *BIRC3* géneket érintő eltérések. Mindkét gén az NF-κB jelátviteli útvonal regulálásában játszik szerepet. A *MYD88* által kódolt transzkripció faktor funkcionyerő mutációi, melyek kizárólag IGHV-M esetekben fordulnak elő, ligandkötés nélkül is folyamatos aktivációs szignált közvetítenek a downstream NF-κB jelátvitel tagjai felé, amely konstitutív NF-κB aktivitáshoz vezet.³ A *BIRC3* mutációk a jelátvitel negatív regulátoraként működő BIRC3 fehérje funkcióját károsítják, amely ezáltal szintén fokozott NF-κB működést eredményez.^{4, 23}

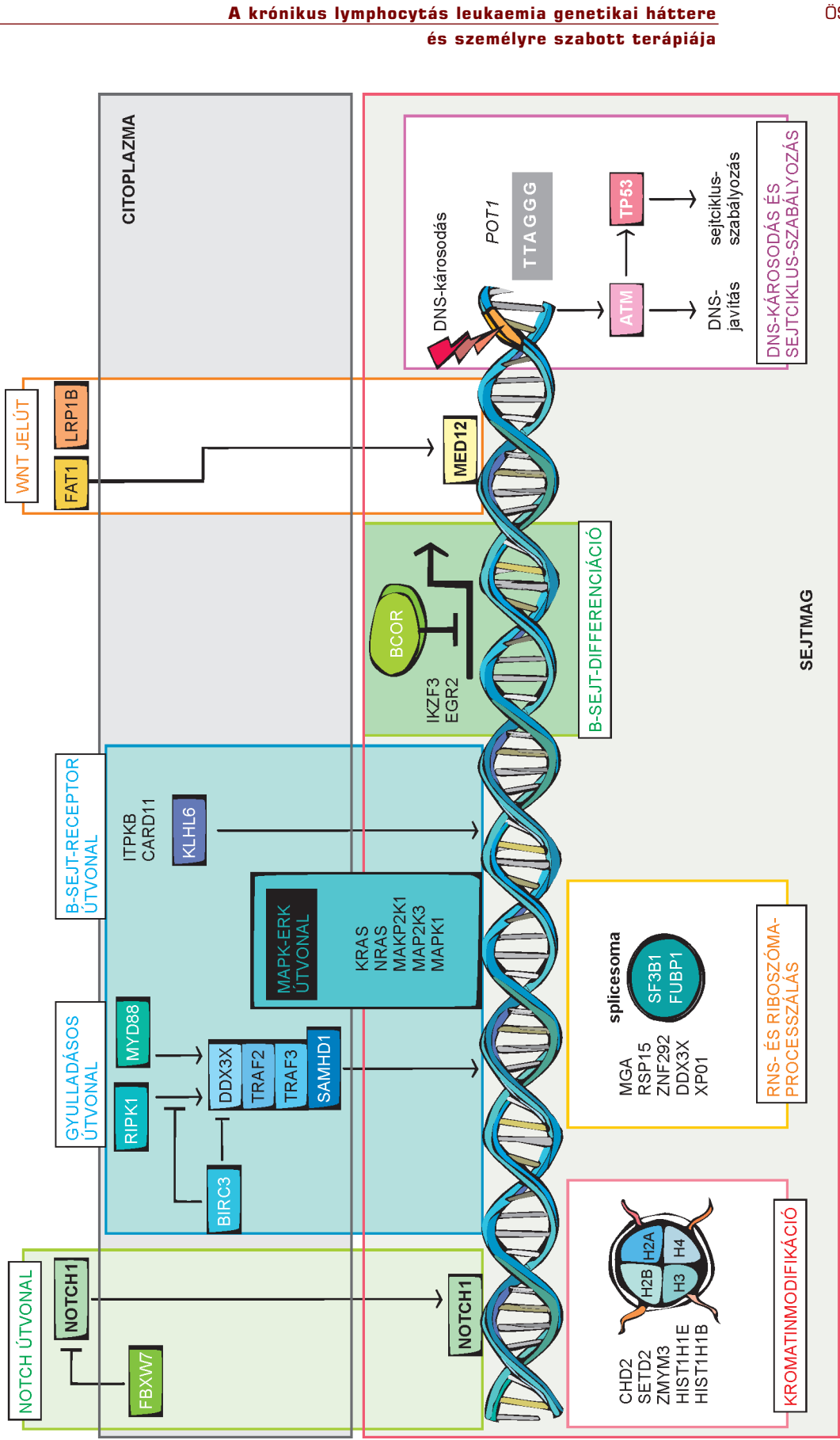
Az ismertett gének eltérései a CLL legfontosabb visszatérő driver mutációi, azonban érdekes módon

még ezen leggyakrabban azonosítható léziók gyakorisága sem haladja meg a 15%-ot a teljes CLL-es betegpopulációban.^{3, 4, 23} A heterogén genetikai háttér vizsgálatát célzó WES és WGS tanulmányok számos további, a CLL patogenezisében résztvevő gén és jelátviteli útvonal érintettségét írták le, melyek közül kiemelendők az *SF3B1*, *DDX3X* és *XPO1* gének mutációi, amelyek a spliceoszóma-működés és az RNS-processzálas fontos regulátorai.^{4, 23} A CLL-ben érintett intracelluláris jelátviteli útvonalakat és a résztvevő géneket a 3. ábra szemlélteti.

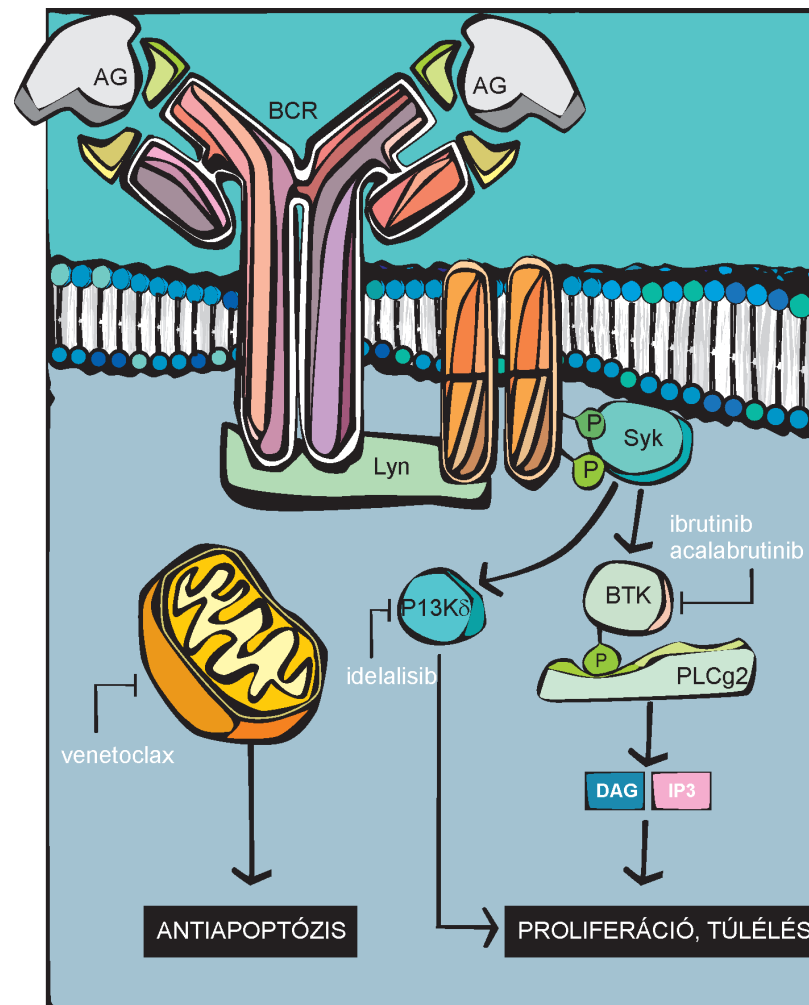
Bár az újonnan leírt nagyszámú mutáció CLL patogenezisében betöltött szerepe sok gén esetében ismert, klinikai jelentőségük sok esetben továbbra sem teljesen feltérképezett. Ennek ellenére napjainkban egyre több gén mutációs státusza kerül be a CLL-ben hagyományosan alkalmazott prognosztikai és prediktív faktorok közé, melyek közül számos eltérés már közvetlen terápiás relevanciával rendelkezik.^{19, 33, 34} Ezen mutációk vizsgálata különösen a célzott terápiák megjelenésének köszönhetően a molekuláris patológia egyik fontos területévé vált, hiszen a kedvezőtlen prognózisú eltérések detektálásával azonosítható az a magas rizikójú betegcsoport, akik a legtöbbet profitálnak a CLL-ben elérhető új, célzott terápiák alkalmazásából.

Célzott terápiás lehetőségek CLL-ben

A CLL genetikai hátterének megismerése az új, célzott terápiák fejlesztésében is hatalmas áttörést hozott, melynek köszönhetően a korábban csak prognosztikai és prediktív jelentőségű citogenetikai eltérések vizsgálata napjainkban már közvetlen klinikai relevanciával is rendelkezik. Az adekvát terápiaválasztáshoz jelenleg már elengedhetetlen egyes molekuláris eltérések vizsgálata, hiszen a korábban ismertett mutációk hordozása a citogenetikai léziók jelenlététől függetlenül a CLL-ben alkalmazható célzott terápiás gyógyszerek indikációit képezi. A CLL kezelésében elérhető kis molekulású gátlószerek között hatásmechanizmusuk alapján két nagy csoportot különíthetünk el, melyek a B-sejt-receptor (BCR) jelátviteli útvonal gátlószerei (Bruton-féle tirozin-kináz-inhibitorok, foszfatidilinozitol-3-kináz-δ-inhibitorok, Syk-inhibitorok), valamint az antiapoptotikus B-sejtes lymphoma 2 (BCL2) fehérje inhibitorai. Ezen készítmények, melyek forradalmasították a korábban nehezen kezelhető, kemorefrakter R/R CLL terápiáját, a magas rizikójú genetikai eltérés típusától függetlenül rendkívül hatásosnak bizonyultak a kedvezőtlen prognózisú betegcsoportokban és a ko-



3. ábra: A teljes genom- és exom szekvenálással végzett tanulmányok során azonosított visszatérő mutációt hordozó gének CLL-ben. Az ábrán a körképben leggyakrabban érintett gének funkciójuk és intracelluláris lokalizációjuknak megfelelően csoportosítva láthatók. [Marosvári és mtsai. Hematológia-Transzfuziológia (2016) alapján módosítva]



4. ábra: A CLL kezelésében jelenleg alkalmazott célzott terápiás készítmények és molekuláris célpontjaik. A B-sejt receptor (BCR) jelátviteli útvonalon ható szerek közül kiemelendő az irreverzibilis BTK-gátló ibrutinib, valamint a PI3Kδ-inhibitor idelalisib, amely az ibrutinibrezisztenciát mutató betegek esetében fontos terápia alternatívát jelenthet a közeljövőben. A venetoclax az antiapoptotikus BCL2 gátlószereként a BCR útvonaltól független hatásmechanizmussal fokozza a CLL-es sejtek apoptózisát. AG: antigén; BCR: B-sejt-receptor

rábban ismertetett terápia indukálta klonális evolúció leküzdésében. A CLL terápiájában jelenleg elérhető célzott terápiás készítményeket és azok molekuláris célpontjait a 4. ábra szemlélteti.

BTK-inhibitorok

A BCR jelátviteli útvonal tagjai közül kiemelendő a Bruton-féle tirozin-kináz (BTK), amely fontos szerepet tölt be mind a B-sejt-érés folyamatában, mind az antigénstimulációra adott proliferációs válasz koordinálásában és melynek CLL sejtekben mérhető magas expressziója ideális gyógyszer-célponttá teszi a fehérjét. Mindennek köszönhetően az első sikeres célzott terápiát CLL-ben a BTK-inhibitor ibrutinib jelentette, amely hazánkban már 2014 óta elérhető.³⁵⁻³⁷ Az ibrutinib mellett a közelmúltban egy új BCR jelátviteli útvonalon ható szer is engedélyeztetésre került: a BTK-inhibitor acalabrutinibet az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer-

ügynökség (U.S. Food and Drug Administration, FDA) után 2020 júliusában az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) is törzskönyvezte R/R CLL kezelésében.^{38, 39}

Az ibrutinib kovalens kötéssel kapcsolódik a BTK fehérje aktív centrumában elhelyezkedő 481-es ciszte-inhez (C481), melynek következtében irreverzibilisen gátolja az enzim foszforilációját és ezáltal a további downstream jelátvitelt.¹⁷ A BTK-gátlás következményeképpen a mintegy túlélési szignálként funkcionáló BCR jelátviteli út blokkolódik, amely apoptózist indukál a gátolt sejtekben. A direkt hatás mellett az ibrutinibterápiának számos további, „off-target” következménye ismert, így például a gyógyszer hatására a CLL-es sejtek migrációs és adhézis képessége is szignifikánsan csökken.^{40, 41} Az ibrutinib közvetett módon gátolja továbbá a PI3K/PKB és NF-κB útvonalakat is, melyek következtében a MAPK kaskád aktivitása csökken, tovább gátolva ezzel a CLL-es sejtek aktiváció-

1. táblázat: A CLL diagnosztikája során vizsgált független prognosztikai markerek és az egyes eltérések vizsgálatának indikációi [Kotmayer Lili, Rektori pályázat (2019) alapján módosítva]

GENETIKAI LÉZIÓ	JELENTŐSÉG	MÓDSZER	VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉNEK INDIKÁCIÓJA
IGHV mutációs státusz	mutált IGHV: jó prognózis	Sanger-szekvenálás	első kezelési vonal előtt/progresszió esetén
TP53 pontmutációk	kedvezőtlen prognózis	NGS	első kezelési vonal előtt/progresszió esetén
del(11)q	kedvezőtlen prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(13q)	jó prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
del(17p)	kedvezőtlen prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
+12	intermedier prognózis	FISH	minden kezelési vonal előtt
komplex kariotípus	kedvezőtlen prognózis	G-sávós kariotipizálás/MLPA	klinikai tanulmányokban

+12: 12-es kromoszóma triszómiája; del: delécia; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; IGHV: immunglobulin nehéz lánc variábilis régió gén; MLPA: multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció; NGS: új generációs szekvenálás; TP53: tumorsuppresszor protein 53 gén

ját és proliferációs készségét *in vitro* és *in vivo* egyaránt.^{42, 43} A CLL sejtekre gyakorolt közvetlen hatása mellett az ibrutinib azok mikrokörnyezetében, valamint az immunsejteken indukált válaszreakciókkal is hozzájárul a CLL-es sejtszám csökkenéséhez.⁴⁴ Érdekes jelenség az ibrutinibterápia első hónapjaiban a perifériás vérben észlelhető átmeneti lymphocytosis, amely a lymphocyták „homing” folyamatában részt vevő kemo-
kinek felszabadulásának gátlása miatt jön létre.⁴⁴

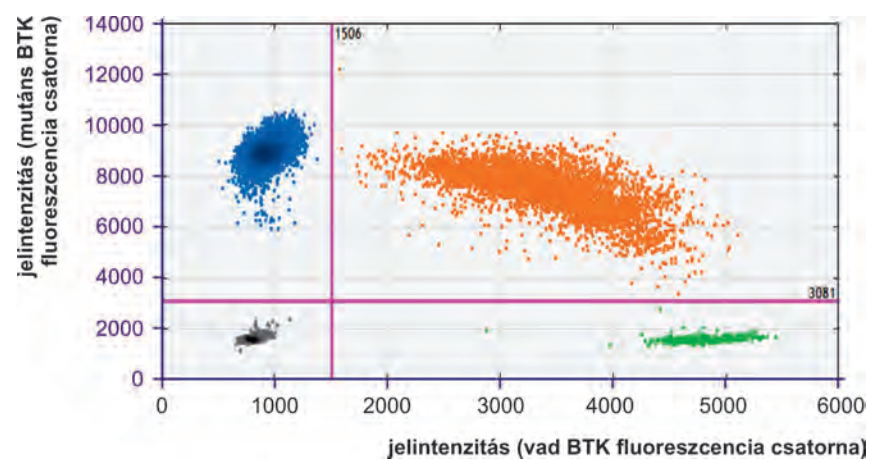
Az orálisan adagolható ibrutinib a korábban nem látott eredményeknek és a kedvező mellékhatásprofilnak köszönhetően forradalmasította a kedvezőtlen prognózisú genetikai eltéréseket hordozó, R/R CLL terápiáját, azonban a látványos sikerek ellenére a betegek egy részénél rezisztencia alakul ki. Az ibrutinib-rezisztencia hátterében rendszerint a *BTK* és az attól downstream elhelyezkedő *PLCG2* gének eltérései azonosíthatók, melyek a BCR jelátviteli út vonal reaktivációjához vezetnek.^{45, 46} A BTK mutáció közül kiemelendők a C481-es kodon báziscseréi, melyek között a leggyakoribb C481S aminosavcserén kívül a C481R, C481F, C481Y és C481T mutációk is előfordulnak, amelyek mind az ibrutinib és a BTK közötti kovalens kötés létrejöttét akadályozzák. Az aktív centrumon kívül eső mutációk az ibrutinib BTK iránti affinitását csökkentik, melyek indirekt módon szintén rezisztencia kialakulását eredményezik.^{37, 45}

Bár a rezisztens esetek száma lassan növekszik, jelenleg már az ibrutinib mellett progrediáló CLL-es betegek számára is van elérhető terápia. A második generációs irreverzibilis BTK-inhibitor acalabrutinib, amely az ibrutinibnél aktívabb és szelektívebb BTK-gátlást

tesz lehetővé, szintén az aktív centrumban elhelyezkedő C481 aminosavhoz kötődik, ezért az ibrutinib terápiát követő rezisztencia kezelésére nem alkalmas, azonban egyes új fejlesztésű nonkovalens BTK-inhibitorokkal ígéretes eredményeket értek el ibrutinib-rezisztens CLL kezelésében.⁴⁷ A rezisztencia leküzdésére további lehetséges megoldást jelenthet a jelátviteli útvonalban a BTK-től downstream elhelyezkedő enzimek gátlása, amely a Lyn és Syk inhibitoraival (dasatinib, fostamatinib, cerdulatinib) együtt a PLCG2 BTK-független aktiválását is akadályozza.⁴⁷ A számos potenciális target és gátlószer ellenére a BCR jelátviteli úton ható célzott terápiák helyett a klinikai gyakorlatban az ibrutinibrezisztens esetek kezelésére egy eltérő hatásmechanizmusú készítmény, a venetoclax terjedt el, amely az apoptózis facilitálásával segíti a CLL-es sejtek eliminációját.

BCL2-gátlás

Az apoptózis alapvető élettani jelenséggént a sürgős sejtek eliminációját szolgáló folyamat, amely azonban a daganatos megbetegedésekben igen gyakran károsodást szenved, melynek következtében a hibás genetikai információt hordozó tumorsejtek kontrollálatlan proliferációba kezdenek.⁴⁸ Az anti- és proapoptotikus szingálok érzékeny intracelluláris egyensúlyának fenntartói a kaspázok, melyek az apoptózis szabályozó kaszkádjaként a halálreceptorok (extrinsic út) és a celluláris stress (intrinsic út) által közvetített szignálok hatására is aktiválódhatnak. Mindkét útvonalban fontos szerepet játszanak a BCL2 fehérjecsald



5. ábra: Az ábrán a digitális droplet PCR (ddPCR) kiértékelést követő eredményei láthatók, „dot plot” megjelenítésben. Az x tengelyen a vad típusú BTK génhez tartozó fluoreszcens jel intenzitása, az y tengelyen pedig a BTK C481S mutációhoz rendelt fluoreszcens jelintenzitás ábrázolódik. A csak vad BTK-t tartalmazó dropleteket zöld, a mutáns BTK-t tartalmazó dropleteket kék színnel jelöltük. A két csoport arányából meghatározható a mutáció variáns allélfrekvenciája, melyből következtethetünk az eltérést hordozó sejtek arányára a vizsgálati mintában.

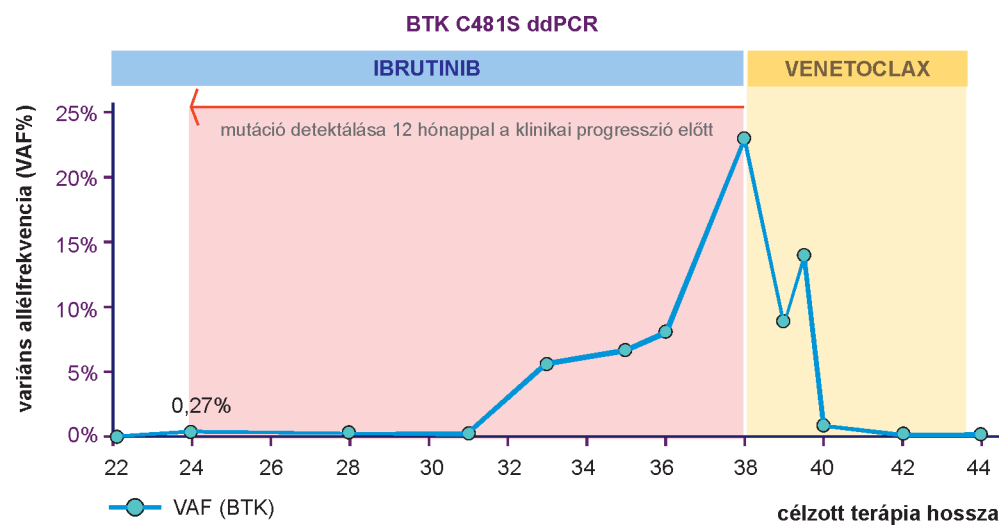
tagjai, melyek a mitokondrium külső membrán integrálásának szabályozását végzik. A fehérjecsatlád legfontosabb tagja az antiapoptotikus BCL2, amely CLL-ben gyakran overexpressziót mutat és amely onkogenikus hatását az apoptotikus útvonal gátlásán keresztül fejti ki.⁴⁹ A BCL2 a fehérjecsatlád proapoptotikus effektor tagjai, a BAX és BAK fehérjék homo-oligomerizációját gátolva felfüggeszti azok külső mitokondriális membrán perforáló hatását. Az effektor fehérjék mellett a BCL2 az úgynevezett „csak BH3 homológ” doménnel rendelkező fehérjéket is gátolja, melyek a BAX/BAK aktivációjáért és az antiapoptotikus proteinek direkt gátlásáért felelősek. A BCL2 a további antiapoptotikus fehérjékkel (BCL-XL, MCL-1, BCL-W) együtt a proapoptotikus fehérjék szekvesztrációjával gátolják azok apoptózist kiváltó hatásait, melynek következtében a BCL2 overexpressziót mutató tumorsejtek érzéketlennek válnak az őket érő apoptotikus szignálokra.^{13, 49}

A CLL-es sejtekben kóros overexpressziót mutató BCL2 gátlása az apoptózis folyamatának helyreállításával a leukaemiás sejtek számának gyors csökkenését idézi elő, melynek köszönhetően a BCL2-inhibitor venetoclax rövid időn belül az R/R CLL kezelésének ígéretes lehetőségévé vált. Az FDA által 2019 nyarán törzskönyvezett venetoclax a BCL2 szelektív gátlószerre, amely a BH3-mimetikumok csoportjába tartozik.^{50, 51} A BH3-mimetikumok az antiapoptotikus fehérjék, így a BCL2 hidrofób, BH3 domént kötő árkához kapcsolódva gátolja azok proapoptotikus fehérjékre gyakorolt szekvesztráló hatását. Az apoptózis indukciója mellett a venetoclaxnak több, a BCL2-gátlástól független

off-target hatása is ismert, melyek közül kiemelendő a mitokondriális oxidatív foszforiláció (OXPHOS) és a citrátkör gátlása, amely metabolikus újraprogramozás hátterében az integrált stresszválasz, valamint egyes transzkripciós faktorok szerepe igazolódott.⁵²

A venetoclax a szerteágazó proapoptotikus hatásainak, valamint kedvező mellékhatásprofiljának köszönhetően az ibrutinibhez hasonlóan nagy előrelépést jelentett az R/R CLL betegcsoport terápiájában. A BCL2-inhibitor venetoclax 2019 óta már hazánkban is elérhető, R/R CLL-ben rituximabbal, elsővonalbeli terápiaként obinutuzumabbal való kombinációban.^{53, 54} A venetoclax terápia előnye a kemoterapeutikumok nélkül is elérhető MRD-negativitás, amely megteremti a fix időtartamú terápia lehetőségét, és melynek monitorozásához szükséges laboratóriumi háttér, az NGS és áramlási citometriai vizsgálatok Intézetünkben rendelkezésünkre állnak.

A kedvezőtlen prognosztikai eltérések jelenlététől függetlenül alkalmazható szer a korábban ismertetett ibrutinibrezisztens esetek terápiája mellett első választandó célzott terápiaként is elérhető, azonban a venetoclax bevezetése óta eltelt rövid idő alatt egyes betegeknél már megfigyelhető a gyógyszerrel szembeni rezisztencia.⁵⁵ Bár a pontos mechanizmus a venetoclaxrezisztens esetek kis száma miatt még nem teljesen feltérképezett, a folyamat hátterében gyakran azonosíthatók a *BCL2* mutációi, melyek közül gyakoriság szempontjából kiemelendők a fehérje 101-es glicin aminosavának valinra történő cseréjével járó pontmutációk.⁵⁶ A további, *BCL2* gént érintő báziscserék mellett ritkán a



6. ábra: Az ábrán a BTK C481S mutáció variáns allélfrekvenciájának (VAF) változása látható ibrutinib- és venetoclaxterápia mellett egy beteg követéses mintáiban. Az x tengelyen a célzott terápia hossza látható, hónapokban kifejezve. Az y tengelyen az egyes időpontokból származó mintákban mért BTK C481S VAF-értékeket ábrázoltuk. A mintákban a BTK mutáció már 12 hónappal a klinikai progressziót megelőzően detektálható volt. A betegnél a klinikai progresszió miatt venetoclax-kezelésre tértek át, melynek hatására a BTK C481S mutáció VAF-értéke drasztikusan lecsökkent.

proapoptotikus BCL-XL overexpressziója is detektálható, amely a szintén ritkán előforduló MCL-1 amplifikációkkal együtt a gátolt *BCL2*-t megkerülve vezetnek az apoptózis felfüggesztéséhez.^{57, 58}

A CLL molekuláris genetikai hátterének korszerű vizsgálata

A CLL genetikai hátterének vizsgálata, amely a betegség modern diagnosztikája és a betegkövetés során is nagy jelentőséggel bír, a molekuláris vizsgálati módszerek dinamikus fejlődésének köszönhetően az elmúlt években jelentős változásokon ment keresztül. Az alkalmazott módszerek szenzitivitásának növekedésével a korábban is vizsgált prognosztikai markerek mellett jelenleg már a célzott terápiákkal szembeni rezisztenciamutációk is nagy érzékenységgel detektálhatók, segítve ezzel a kezelések hatékonyságának monitorozását.

Bár a kutatásban elterjedt WES és WGS jelentős mértékben hozzájárult a CLL genetikai hátterének megismeréséhez, alkalmazásuk elsősorban magas költségük és időigényük miatt még nem került be a mindennapi diagnosztikai algoritmusokba. További érdekes és a genetikai háttér vizsgálata során egyre nagyobb teret nyerő eljárás a multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció (MLPA), amely a CLL-ben előforduló kiegyensúlyozatlan kópiaszám-eltérések detektálására alkalmas módszer. Az MLPA a WES és WGS vizsgálatokhoz

hasonlóan elsősorban a kutatásban terjedt el, ahol a komplex kariotípus meghatározására használható. A CLL diagnosztikájában történő alkalmazását elsősorban az eredmények bizonytalan interpretációja akadályozza, azonban az egyre több kópiaszám-eltérés klinikai relevanciájának megismerésével a módszer feltehetőleg a kutatás mellett a diagnosztikában is egyre jobban előtérbe kerül majd.⁵⁹

A nehézségek ellenére a molekuláris patológia számos módszert átemelt a kutatási területről a rutin diagnosztikába, így például a CLL-ben prognosztikai jelentőséggel bíró citogenetikai eltérések vizsgálatára során hagyományosan alkalmazott FISH és az IGHV mutációs státusz meghatározása során használt Sanger-szekvenálás mellett a legújabb ajánlások alapján a *TP53* gén mutációinak azonosítására jelenleg már NGS eljárásokat (célzott szekvenálás) alkalmazunk.³² Az NGS-sel történő vizsgálat a *TP53* mutációk detektálása során kiemelt jelentőségű, hiszen a korábban Sanger-szekvenálással végzett vizsgálatok során a szubklonális *TP53*-eltérések nem kerültek felismerésre, pedig a nagyszámú betegmintán végzett tanulmányok alapján a kis variáns allélfrekvenciával (VAF) azonosítható mutációk a klonális eltérésekkel egyenértékűek, hordozásuk kedvezőtlen prediktív marker.²³

Az NGS alkalmazása mellett a CLL vizsgálata során hazánkban is egyre inkább előtérbe kerül a digitális droplet PCR (ddPCR) használata, mellyel a kórképben előforduló rezisztenciamutációk vizsgálhatók.

A ddPCR kiértékelését követő dot plot-ot az 5. ábra szemlélteti. ddPCR alkalmazásával a korábban ismertett célzott terápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztencia háttérben álló mutációk akár 0,001%-os szenzitivitással detektálhatók, amely lehetővé teszi az ibrutinib/venetoclax rezisztens CLL szubklónok azonosítását akár több hónappal a klinikai progressziót megelőzően. Mindemellett a mutációk VAF-jának monitorozásával a kezelés hatékonysága és a terápiaváltás hatására bekövetkező változások is nyomon követhetők (6. ábra).

Intézetünkben a rezisztenciamutációk vizsgálatát jelenleg ddPCR alkalmazásával végezzük, melynek köszönhetően a nagyszámú vizsgált betegminta közül eddig összesen 40 esetben azonosítottuk az ibrutinib-rezisztenciához vezető *BTK* C481S mutációt. Bár a mutáció detektálása esetén a perifériás vérből izolált mintákban a nemzetközi és hazai adatok alapján nem indokolt az ibrutinibterápia felfüggesztése, az eltérés megjelenése felhívhatja a figyelmet egy esetlegesen bekövetkező relapszus létrejöttére, amely szükségessé teheti a betegek gyakori utánkövetését. Bár a mutáció rendszeres monitorozására jelenleg még nincs nemzetközileg elfogadott ajánlás, a kutatócsoportunk előzetes adatai alapján az eltérést hordozó betegek közel 80%-ában várható a manifeszt ibrutinibrezisztencia klinikai megjelenése. A venetoclaxrezisztens esetek túlnyomó részéért felelős *BCL2* G101V aminosavcserét eddig egy esetben, a második leggyakoribb *BCL2* D103Y cserét pedig további 4 beteg esetében azonosítottuk, ami a venetoclaxrezisztens betegek kis száma miatt nemzetközileg is figyelemreméltó eredménynek mondható.

A CLL-ben prognosztikai és prediktív biomarkerek, valamint a célzott terápiák hatékonyságának monitorozására alkalmas eltérések vizsgálata több molekuláris módszer egyidejű alkalmazásával lehetséges. Intézetünkben, amely a cikk írásakor az egyetlen ERIC által akkreditált laboratórium hazánkban, jelenleg már valamennyi bemutatott vizsgálat rendelkezésünkre áll, mellyel a hazai CLL-es betegek jelentős részének modern, szakszerű ellátása biztosítható.

A vizsgálatok rövid ismertetéséből az is jól látható, hogy a CLL modern diagnosztikája a hagyományos vizsgálati modalitások mellett napjainkban már a nagy áteresztőképességű és szenzitív molekuláris genetikai módszerek alkalmazására épül, melyek segítségével nem csak a közvetlen klinikai relevanciával bíró prognosztikai és prediktív markerek detektálhatók, hanem a célzott terápiák hatékonysága is megbízhatóan monitorozható. Mindez a folyamatos gyógyszerfejlesztések-

kel és az új célzott terápiákkal együtt alapjaiban rajzolta át a korábban nehezen kezelhető R/R CLL betegek terápiáját, melynek köszönhetően ezen betegcsoport számára olyan kezelési lehetőségek váltak széleskörben elérhetővé, melyek minden eddiginél hosszabb túlélést és jobb életminőséget eredményeznek.

Irodalom

1. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013; 152:714-26.
2. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; 526:525-30.
3. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475:101-5.
4. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2011; 365:2497-506.
5. Hallek M, Shanafelt TD and Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2018; 391:1524-37.
6. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Hematológiai betegségek atlasza. In: (editors). Budapest, Medicina Könyvkiadó Rt., 2006.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: (editors). Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2017; 587.
8. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN and Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-34.
9. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48:198-206.
10. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015; 90:446-60.
11. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 Suppl 5:v78-84.
12. International CLLIPIwg. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; 17:779-90.
13. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910-6.
14. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclo-

- phosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107:885-91.
15. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2019; 94:1266-87.
16. Robak T, Robak E. New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *BioDrugs* 2011; 25:13-25.
17. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; 29:877-85.
18. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood* 2019; 133:1205-16.
19. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121:1403-12.
20. 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.
21. Condoluci A, Rossi D. Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment. *Expert Rev Hematol* 2019; 12:89-98.
22. Takács F, Kardos I, Czeti Á, Aczél D, Illés S, Balogh A, et al. [The role of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia]. *Hematológia-Transzfuziológia* 2020; 53:17-22.
23. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127:2122-30.
24. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208:1389-401.
25. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119:521-9.
26. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014; 123:3247-54.
27. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice. *Cancer Res* 2017; 77:1250-60.
28. Blagosklonny MV. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J* 2000; 14:1901-7.
29. Muller PA and Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 2013; 15:2-8.
30. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jager U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica* 2018; 103:1956-68.
31. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26:1458-61.
32. 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.
33. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, Smedby KE, Tjonnfjord E, Hjalgrim H, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013; 27:512-4.
34. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood* 2013; 122:1266-70.
35. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007; 2:58-61.
36. Maddocks K, Jones JA. Bruton tyrosine kinase inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2016; 43:251-9.
37. Aczél D, Mátrai Z, Kiss R, Balogh A, Illés S, Bodor C, et al. [Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia]. *Hematológia-Transzfuziológia* 2019; 52:136-48.
38. Sharman JP, Egved M, Jurczak W, Skarbnik A, Pagel JM, Flinn IW, et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naïve chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2020; 395:1278-91.
39. Ghia P, Pluta A, Wach M, Lysak D, Kozak T, Simkovic M, et al. ASCEND: Phase III, Randomized Trial of Acalabrutinib Versus Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2020; 38:2849-61.
40. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia* 2014; 28:649-57.
41. Seiler T, Dreyling M. Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* 2017; 26:909-15.
42. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; 117:6287-96.
43. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood* 2014; 123:3286-95.
44. Niemann CU, Herman SE, Maric I, Gomez-Rodriguez J, Biancotto A, Chang BY, et al. Disruption of in vivo

- Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor-Microenvironment Interactions by Ibrutinib—Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. Clin Cancer Res 2016; 22:1572-82.
45. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. N Engl J Med 2014; 370:2286-94.
46. Liu TM, Woyach JA, Zhong Y, Lozanski A, Lozanski G, Dong S, et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C, gamma2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. Blood 2015; 126:61-8.
47. Liu L, Shi B, Wang X, Xiang H. Strategies to overcome resistance mutations of Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. Future Med Chem 2018; 10:343-56.
48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144:646-74.
49. Lampson BL, Davids MS. The Development and Current Use of BCL-2 Inhibitors for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2017; 12:11-9.
50. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. N Engl J Med 2019; 380:2225-36.
51. Yalniz FF and Wierda WG. Targeting BCL2 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other Hematologic Malignancies. Drugs 2019; 79:1287-304.
52. Roca-Portoles A, Rodriguez-Blanco G, Sumpton D, Cloix C, Mullin M, Mackay GM, et al. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition. Cell Death Dis 2020; 11:616.
53. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med 2018; 378:1107-20.
54. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M, Sinha A, Fink AM, Robrecht S, et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2020; 21:1188-200.
55. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Hillmen P, Seymour JF, Coutre S, et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. J Clin Oncol 2018; 36:1973-80.
56. Blombery P, Anderson MA, Gong JN, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancer Discov 2019; 9:342-53.
57. Lucas F, Larkin K, Gregory CT, Orwick S, Doong TJ, Lozanski A, et al. Novel BCL2 mutations in venetoclax-resistant, ibrutinib-resistant CLL patients with BTK/PLCG2 mutations. Blood 2020; 135:2192-5.
58. Blombery P. Mechanisms of intrinsic and acquired resistance to venetoclax in B-cell lymphoproliferative disease. Leuk Lymphoma 2020; 61:257-262
59. Kiss R, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, et al. [Screening for genomic copy number alterations in chronic lymphocytic leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification]. Hematológia-Transzfuziológia 2018; 51:31-40.