

Ibrutinib-indukált klonális evolúció és Richter-transzformáció vizsgálata krónikus limfocitás leukémiában

Doktori értekezés

Dr. Gángó Ambrus Péter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bödör Csaba, MTA Doktora, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Bodó Imre, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Jóna Ádám, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kiss András, MTA Doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
I. IRODALMI HÁTTÉR	10
I.1. Bevezetés.....	10
I.2. A vérképzés és a vérképzőszervi daganatok kialakulása	10
I.3. A normál B-sejtek fejlődése és a limfoid daganatok eredete, osztályozása.....	11
I.3.1. A normál B-sejtek fejlődése	11
I.3.2. A limfoid daganatok eredete, osztályozása	13
I.4. A CLL epidemiológiája.....	14
I.5. A CLL diagnosztikája	14
I.6. A CLL patogenezise.....	16
I.7. A CLL genetikai háttere és prognosztikai markerei.....	18
I.7.1. A B-sejt-jelátvitel szerepe CLL-ben	18
I.7.2. A CLL genetikai háttere, prognosztikus és prediktív markerek.....	19
I.7.2.1. Citogenetikai aberrációk	19
I.7.2.2. Az <i>IGHV</i> mutációs státusz szerepe CLL-ben.....	21
I.7.2.3. Visszatérő genetikai eltérések CLL-ben	22
I.7.2.4. Prognosztikai tényezők CLL-ben.....	25
I.8. A CLL terápiája.....	26
I.8.1. Kemo(immuno)terápia CLL-ben.....	26
I.8.2. Célzott terápia CLL-ben.....	27
I.8.2.1. BTK-gátlás CLL-ben.....	27
I.8.2.1.1. Az ibrutinib	28
I.8.2.1.1.1. A BTK gátlókkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere	30
I.8.2.2. BCL2-gátlás CLL-ben.....	32
I.8.2.2.1. A venetoclax.....	32
I.8.2.2.1.1. A BCL2 gátlókkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere.....	34
I.9. Richter-transzformáció (RT) CLL-ben	35
I.9.1. A RT morfológiai sajátosságai	35
I.9.2. A RT genetikai háttere	38
I.9.3. A RT klinikai jellegzetességei és terápiája	39
I.9.4. A célzott terápiák talaján kialakuló RT.....	42
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	44

III. MÓDSZEREK.....	45
III.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata	45
III.1.1. Beteganyag	45
III.1.2. Új generációs szekvenálás	47
III.1.3. Bioinformatikai analízis	48
III.1.4. Az azonosított szomatikus mutációk validálása	49
III.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata	53
III.2.1. Beteganyag	53
III.2.2. Módszerek	56
IV. EREDMÉNYEK	59
IV.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata	59
IV.1.1. Mutációs összetétel.....	59
IV.1.2. A mutációs összetétel időbeli megoszlása.....	62
IV.1.3. A <i>TP53</i> , <i>BTK</i> és <i>PLCG2</i> mutációk szubklonális dinamikája.....	63
IV.1.4. A betegcsoport követése és kórlefordulása.....	67
IV.1.5. A <i>BTK</i> C481S és <i>PLCG2</i> D993H rezisztenciamutációk droplet digitális PCR alapú követése.....	68
IV.1.6. Térbeli heterogenitás szerepének vizsgálata ibrutinibkezelt CLL progressziójában	71
IV.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata	73
IV.2.1. A transzformáció immunmorfológiai jellemzői.....	73
IV.2.2. A transzformáció genetikai háttere	77
IV.2.2.1. A klonális kapcsoltság meghatározása	77
IV.2.2.2. 17p deléciók és <i>TP53</i> mutációk	79
IV.2.2.3. További genetikai eltérések és klinikai asszociációk.....	82
IV.2.2.4. Ibrutinib/venetoclax-indukált rezisztenciamutációk	83
V. ÚJ MEGFIGYELÉSEK.....	84
VI. MEGBESZÉLÉS.....	85
VI.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata	85
VI.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata	88
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	91
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	92
IX. SUMMARY	93

X. IRODALOMJEGYZÉK	94
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	118
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABV – adriamycin-bleomycin-vinblastin
ABVD – adriamycin-bleomycin–vinblastin-dacarbazin
alem – alemtuzumab
allo-SCT – „allogeneic stem cell transplantation” (allogén őssejt-átültetés)
ATM – „Ataxia-Teleangiectasia Mutated”
B - bendamustin
BCL2 – „B-cell lymphoma 2”
BCR – B-sejt receptor
BL – Burkitt-limfóma
BTK – Bruton-féle tirozin-kináz
ccfDNS – „circulating cell-free” (keringő sejtmentes) DNS
CD – „cluster of differentiation”
CDR3 – „complementarity determining region 3”
CFU – „colony forming unit” (kolóniaképző egység)
cHL – klasszikus Hodgkin-limfóma
Chl – chlorambucil
CHOP – ciklofoszfamid-hidroxi-daunorubicin-Oncovin-prednizon
CLL – krónikus limfocitás leukémia
CME – konvergens mutációevolúció
COPP – ciklofoszfamid-Oncovin-procarbazin-prednizon
COSMIC – „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer”
CR – komplett remisszió
CVP – ciklofoszfamid-vincristin-prednizon
Cyc - ciklofoszfamid
D – diverzitás régió
DAG – diacil-glicerol
DC – „dendritic cell” (dendritikus sejt)
ddPCR – droplet digitális polimeráz láncreakció
del – deléción
DLBCL – diffúz nagy B-sejtes limfóma
DNS – dezoxiribonukleinsav
dNTP – dezoxi-nukleotid-trifoszfát
dup – duplikáció

duve - duvelisib

EBV – Epstein-Barr-vírus

ECOG – „Eastern Cooperative Oncology Group”

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

EMA – „European Medicines Agency” (Európai Gyógyszerügynökség)

ERIC – „European Research Initiative on CLL”

ESMO – „European Society for Medical Oncology”

F – férfi

FA – frakcionális abundancia

FC – fludarabin-ciklofoszfamid

FDA – „Food and Drug Administration” (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-felügyelet)

FL – folliculáris limfóma

Flu – fludarabin

fs – „frameshift” (kereteltolódás)

GC – „germinal center” (centrum germinativum, csíracentrum)

HDMP – „high-dose methylprednisolone” (magas dózisú metilprednizolon)

HE – hematoxin-eozin

HEAT – „Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1”

HL – Hodgkin-limfóma

HMB45 – „Human Melanoma Black 45”

HSC – „hematopoetic stem cell” (vérképző őssejt)

HSCT - „hematopoetic stem cell transplantation” (vérképző őssejt-átültetés)

IBR - ibrutinib

iFISH – interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Ig – immunglobulin

IGH – immunglobulin nehézlánc

IGHV – immunglobulin nehézlánc variábilis régió

IGK – immunglobulin kappa lánc

IGL – immunglobulin lambda lánc

ins – inszerció

IP3 – inozitol-trifoszfát

IPI – „International Prognostic Index” (CLL nemzetközi prognosztikai index)

ITAM – „immunoreceptor tyrosine-based activation motif”

iwCLL – „International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia”

J – „joining” (kapcsoló) régió

LCA – „leukocyte common antigen”

LDH – laktát-dehidrogenáz

M – mutált

MAPK – mitogén-aktivált protein-kináz

MBL – monoklonális B-sejtes limfocitózis

MgCl₂ – magnézium-klorid

miRNS – mikroRNS

MLPA – „multiple ligation-dependent probe amplification” (multiplex ligációfüggő szondaamplifikáció)

MPO – mieloperoxidáz

MRD – „measurable residual disease” (mérhető reziduális betegség)

mRNS – „messenger” (hírvivő) RNS

MUM1/IRF4 – „Multiple Myeloma 1/ Interferon Regulatory Factor 4 protein”

MYD88 – „myeloid differentiation primary response 88”

MZ – marginális zóna

N – nő

NCCN – „National Comprehensive Cancer Network”

NF- κ B – „nuclear factor – κ B”

NGS – „next generation sequencing” (új generációs szekvenálás)

NK – „natural killer cell” (természetes ölósejt)

non-GC – „non-germinal center” (subtype)

NOTCH1 – „Notch homolog 1, translocation-associated”

Oct-2 – organikus kation transzporter 2

ofa – ofatumumab

ORR – „overall response rate” (teljes válaszadási ráta)

OS – „overall survival” (teljes túlélés)

p – a kromoszóma rövid karja

pan-CK – pan-citokeratin

PBL – plazmablasztos limfóma

PCR – „polymerase chain reaction” (polimeráz láncreakció)

PEST – prolin (P) – glutaminsav (E) – szerin (S) – treonin (T)

PET/CT – pozitron-emissziós tomográfia/computertomográfia

PFS – „progression-free survival” (progressziómentes túlélés)

PI3K – foszfatidilinozitol-3-kináz

PIP2 – foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát
PIP3 – foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
PLCG2 – „phospholipase C γ 2”
PLL – prolimfocitás leukémia
PTLD – poszttranszplantációs limfoproliferatív betegség
q – a kromoszóma hosszú karja
R – rituximab
RB – rituximab-bendamustin
R-CHOP – rituximab-ciklofoszfamid-hidroxi-daunorubicin-Oncovin-prednizon
R-CNOP – rituximab-ciklofoszfamid-mitoxantron-Oncovin-prednizon
R-CVP – rituximab-ciklofoszfamid-vincristin-prednizon
R-DA-EPOCH – rituximab-dózisadaptált etopozid-prednizon-Oncovin-ciklofoszfamid-hidroxi-daunorubicin
RFC – rituximab-fludarabin-ciklofoszfamid
RM – ribomustin
RNS – ribonukleinsav
R/R – relabáló/refrakter
RS – Richter-szindróma
RT – Richter-transzformáció
SF3B1 – „splicing factor 3B subunit 1”
SHM – szomatikus hipermutáció
SLL – „small lymphocytic lymphoma” (kis limfocitás limfóma)
SNV – „single nucleotide variant” (egy pontos nukleotid variáns)
SOX10 – „SRY-related HMG-box 10”
SUV – „standard uptake value” (standard felvételi érték)
TAE – Tris-acetát-etilén-diamin-tetraecetsav
TLR – „Toll-like receptor”
TLS – tumorlízis-szindróma
TNF α – tumor nekrozis faktor α
TP53 – „tumor protein 53”
TRIS – 2-amino-2-hidroxi-metilpropán-1,3-diol
TTFT – „time to first treatment” (az első kezelésig eltelt idő)
U – „unmutated” (mutációt nem hordozó)
V – variábilis régió
VAF – variáns allélfrekvencia

VEN – venetoclax

VUS – „variant of unknown significance” (ismeretlen jelentőségű variáns)

WHO – „World Health Organization” (Egészségügyi Világszervezet)

XIAP – „X-linked inhibitor of apoptosis protein”

XID – X-hez kötött immundeficiencia

XLA – „X-linked agammaglobulinemia” (X-hez kötött agammaglobulinémia)

I. IRODALMI HÁTTÉR

I.1. Bevezetés

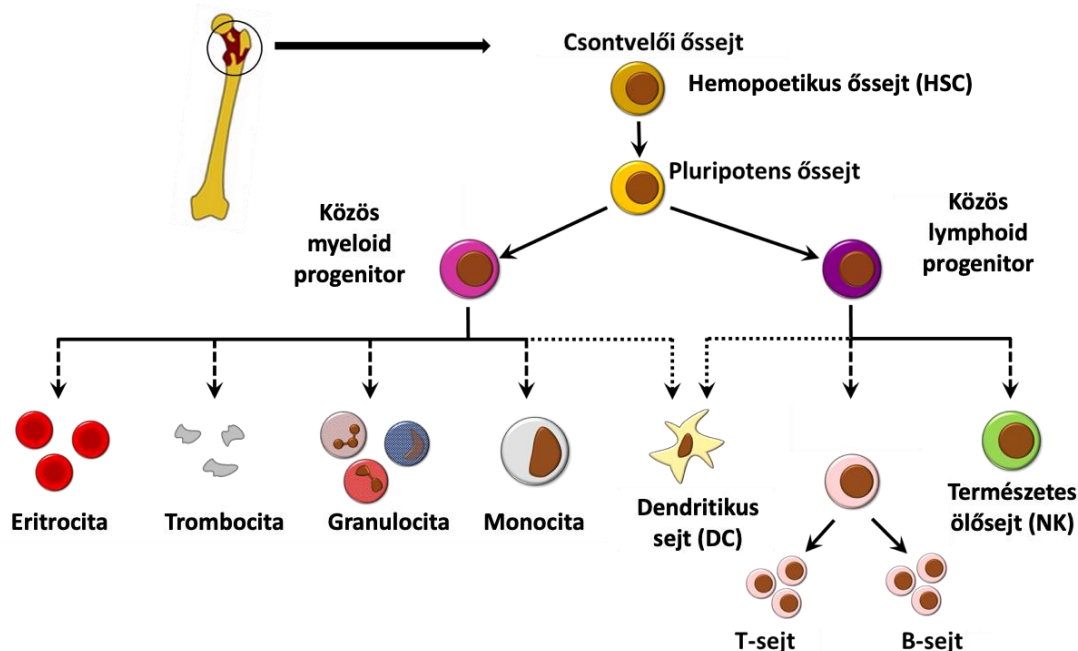
Az elmúlt évtizedben a hematológiai malignitások genetikai hátterének pontosabb megismerése, a precízebb diagnosztikai és prognosztikai eszköztár, valamint az innovatív, molekulárisan célzott terápiák egyre bővülő tárháza a terület robbanásszerű fejlődését jelzik. Noha egyes genetikai eltérések és prognosztikai jelentőségük már évtizedek óta ismert krónikus limfocitás leukémiában (CLL), például bizonyos citogenetikai aberrációk és a Döhner-féle rizikóbesorolás (1), azonban a jelenleg rendelkezésünkre álló genetikai információ túlnyomó többségét az elmúlt évek új-generációs szekvenálási (NGS) tanulmányainak köszönhetjük. Ezért dolgozatom témaválasztása különösen aktuális, kutatásunkban a CLL terápiáját forradalmasító BTK-inhibitor ibrutinib hatását vizsgáltuk a kórkép szubklonális evolúciójára. Emellett vizsgáltuk az ibrutinib, valamint a BCL2-inhibitor venetoclax kezelés talaján kialakuló, kedvezőtlen prognózisú Richter-transzformáció morfológiai és genetikai sajátosságait is.

I.2. A vérképzés és a vérképzőszervi daganatok kialakulása

A vörös csontvelőben elhelyezkedő pluripotens őssejtek (hematopoetic stem cell, HSC) biztosítják a vérképzéshez szükséges folyamatos utánpótlást, korlátlan osztódási képességük révén. A pluripotens őssejtek közös mieloid progenitor és közös limfoid progenitor sejtek irányába differenciálódnak (**1. ábra**). Az előbbiekből létrejönnek a mieloid sejtvonalak kolóniaképző egységeit („colony forming unit”, CFU), melyekből többszöri osztódás és differenciálódás révén az éretlen előalakokon keresztül a perifériás vérben megtalálható végső, funkcióképes sejt elemek (eritrocita, trombocita, granulocita, monocita) alakulnak ki. A közös limfoid progenitor sejtekből jönnek létre a B- és T-limfociták, valamint a természetes ölősejtek („natural killer cells”, NK-sejtek) a csontvelőben és a perifériás nyirokszervekben zajló komplex folyamatok révén (2).

A hematológiai malignitások a hemopoézis különböző érési stádiumú sejtjeinek öröklött vagy szerzett genetikai eltérései következtében jönnek létre, amelyek érésgátláshoz, fokozott proliferációhoz, vagy csökkent apoptóziskészséghez vezetnek. A genetikai eltérések a legváltozatosabb jelátviteli útvonalakat érinthetik, transzkripciós faktorok működését, a sejtciklus folyamatát, az apoptózist és az epigenetikai rendszer

funkcióját is befolyásolhatják. A hematológiai daganatok alapvetően két részre, a mieloid és limfoid malignitások csoportjára oszthatók, dolgozatomban a limfoid daganatok közé tartozó CLL-re fókuszálok.



1. ábra. A vérképzés vázlata. A csontvelői hemopoetikus őssejtből egy szigorúan szabályozott, soklépéses differenciálódási folyamat során jönnek létre a funkcióképes sejtes elemek.

I.3. A normál B-sejtek fejlődése és a limfoid daganatok eredete, osztályozása

I.3.1. A normál B-sejtek fejlődése

A csontvelőben zajló, korai differenciáció során az immunglobulin (Ig) gének variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsoló („joining”, J) szegmensei átrendeződnek egy szigorúan szabályozott enzimatis folyamat során. A pro-B stádiumban az immunglobulin nehézlánc (*IGH*) gén D_H és J_H szegmensei rendeződnek át, majd ehhez az inkomplett DJ_H átrendeződéshez rekombinálódik a pre-B-sejtben a V_H szegmens. A funkcióképes, teljes VDJ_H rekombinációt tartalmazó, érett B-sejt felszíni immunglobulin M-et (IgM), azaz B-sejt-receptort (BCR) expresszál (3, 4). A sikeres *IGH* átrendeződést követően valósul meg az immunglobulin könnyűlánc lókuszk átrendeződése, először a kappa lókuszk (*IGK*), majd annak sikertelensége esetén a lambda lókuszk (*IGL*) rekombinálódik(5, 6).

A V(D)J rekombináción átesett, funkcióképes B-sejt-receptorokat (BCR) expresszáló naiv B-sejtek a csontvelőből a másodlagos nyirokszervekbe jutnak, ahol antigénnel való találkozást követően csíracentrumokat (centrum germinativum, GC) képeznek(7). A GC reakció során, többlépcsős, szigorúan szabályozott folyamatban alakulnak ki a magas affinitású antitesteket képző memória B-sejtek, valamint a plazmasejtek. A GC sötét zónájában szinte kizárólag magas proliferációs aktivitású B-sejtek találhatók, itt zajlik az immunglobulin gének variábilis régiójának szomatikus hipermutációja (SHM), amely a gének megközelítőleg 2 kilobázis nagyságú régiójában történő random pontmutációkat jelent, és az immunglobulinok affinitáséréséhez vezet. A világos zónában a B-sejtek mellett follikuláris dendritikus sejtek, T-sejtek és makrofágok is megtalálhatók, ez adja a B-sejtek aktivációjának, klonális szelekciójának és osztályváltásának a helyszínét. Az antigénnel való találkozást követően alacsony affinitású IgM képződik, majd az osztályváltás során egyéb típusú immunglobulinok termelésére is képessé válik a B-sejt. A világos zónából a sötét zónába történő visszatérés (reentry) révén a szelektált B-sejtek újabb SHM-n és proliferáción esnek keresztül, ismét áthaladnak a világos zóna szelekciós és érési folyamatain, majd innen kilépve memória B-sejtekké vagy plazmasejtekké alakulnak, illetve apoptotizálnak(7).

A GC reakció lépéseiben kulcsfontosságú szereppel bíró jelátviteli molekulák a normál B-sejt fejlődésén túl, aberrációik esetén a B-sejtes limfómák patogenezisében is szerepet játszanak. A GC reakció inicializálásában meghatározó a MYC expressziója, amely a GC fejlődés korai szakaszának transzkripciós mechanizmusait indukálja, illetve erősíti. A sötét zóna B-sejtjeiben a BCL6, mint a GC reakció egyik fő szabályozója a MYC-et szupprimálja, amely a későbbi fázisban a reentry folyamatán áthaladó sejtekben lesz újra aktív(8, 9). A PAX5 a plazmasejt irányú differenciálódást kivéve folyamatosan expresszálódik az érett B-sejtekben, míg a BCL6-ot transzaktiváló MEF2B, és a B-sejt érés számos lépését reguláló BCL6 a GC reakció időtartama alatt expresszálódik(7). A hiszton-metiltranszferáz EZH2 a hiszton 3 K27 aminosavát metilálja (H3K27), és a GC sötét zónájában a proliferációt, valamint a differenciációt szabályozza epigenetikus úton(10). A plazmasejt irányú differenciáció során a B-sejt fejlődés transzkripciós programjában szerepet játszó faktorok, többek között a PAX5 és a BCL6 downregulálódnak, és az IRF4, a BLIMP1 és az XBP1 expressziója nő meg(11).

I.3.2. A limfoid daganatok eredete, osztályozása

A limfoid daganatok a hematológiai malignitások rendkívül változatos csoportját alkotják, heterogén sejteredettel, genetikai háttérrel, terápiás tárházzal és klinikai lefolyással (1. táblázat). Az Egészségügyi Világszervezet 2016-os klasszifikációja alapján csupán az érett B-sejtes neoplazmák közé több mint ötven entitás tartozik(12, 13).

1. táblázat: A limfoid malignitások 2016-as WHO-osztályozása

Kórkép

B-sejtes limfoblasztos leukémia / limfóma

T-sejtes limfoblasztos leukémia / limfóma

Érett B-sejtes neoplazmák

Érett T- és NK-sejtes neoplazmák

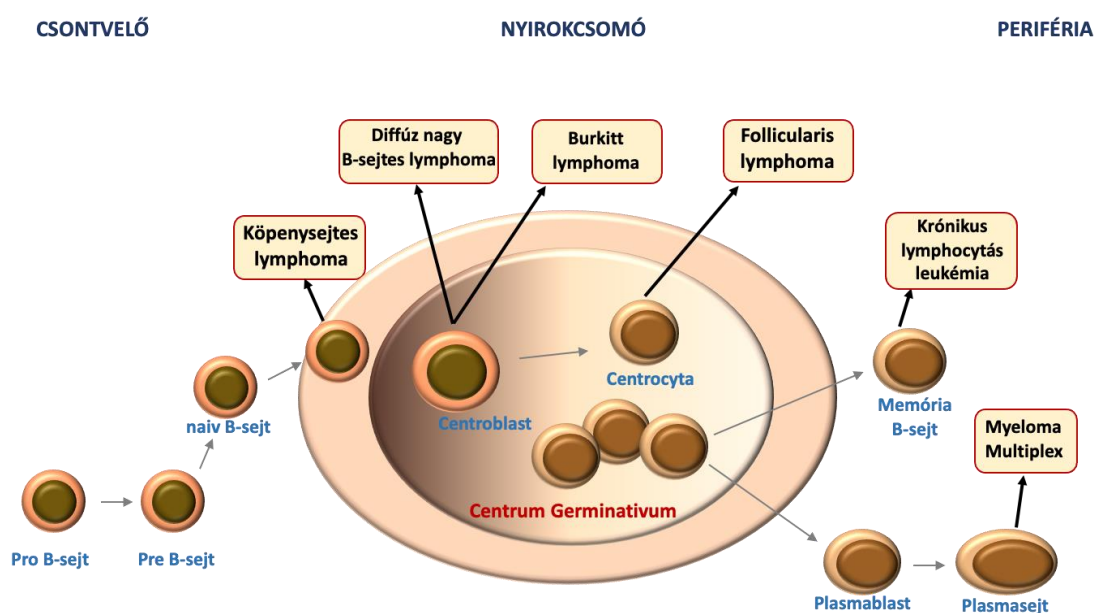
Hodgkin-limfóma

Poszttranszplantációs limfoproliferatív betegségek (PTLD)

Hisztiociter és dendritikus sejtes neoplazmák

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

A B-sejtes non-Hodgkin-limfómák többsége (Burkitt-limfóma - BL, folliculáris limfóma - FL, diffúz nagy B-sejtes limfóma - DLBCL) a GC B-sejtekből indul ki, amint azt a SHM-n átessett immunglobulin gének jelenléte bizonyítja (2. ábra)(14).



2. ábra. A B-sejtes daganatok ábrázolása az alkotó sejttípus alapján. A B-sejt-érés összes fázisában bekövetkezhet olyan aberráció, amely a limfómagenezis irányába tolja el a folyamatot.

Génexpressziós profiljaik alapján a BL és a centrum germinativum-típusú DLBCL a sötét zóna B-sejtjeiből, az FL a világos zóna B-sejtjeiből, míg az aktivált B-sejtes DLBCL a plazmablaszt irányú differenciációt mutató post-GC B-sejtekből származik(15, 16). A kórképek patogenezisében a B-sejt-érésben résztvevő jelátviteli molekulák aberrációja jelentős szereppel bír. BL-ben az aberráns és ektópiás MYC expresszió, FL-ben az ektópiás BCL2 expresszió, DLBCL-ben a BCL6 diszreguláció, aberráns EZH2 aktivitás, valamint a konstitutív NFκB jelátvitel bír egyéb léziók mellett patogenetikai szereppel(7). A dolgozatunk tárgyát képező CLL feltehetően memória B-sejt-eredetű, a sejteredettel kapcsolatos egyéb álláspontok, valamint a betegség patogenezisének részletes tárgyalása az I.6. fejezetben található meg.

I.4. A CLL epidemiológiája

A CLL a leggyakoribb felnőttkori leukémiatípus a fejlett országokban, hazánkban az éves incidenciája 3-5/100 000 lakos/év, ezzel a krónikus leukémiák 90%-át, az összes leukémia 25-30%-át jelenti(2). A betegek medián életkora a diagnózis idején 72 év és kétszer annyi férfit érint a kórkép, mint nőt(17). Noha az esetek zöme sporadikusan alakul ki, a családi halmozódás kockázata CLL-ben az egyik legmagasabb az összes daganat közül, nyolcszor gyakrabban érinti a betegség a CLL-es esetek rokonait(18). A betegség lefolyását jelentős klinikai heterogenitás jellemzi, a betegek egy része a diagnózist követően rövid időn belül kezelésre szorul, és gyors progresszióval, kedvezőtlen túléléssel rendelkezik. Az esetek nagy része a diagnózist követően évek múlva igényel először kezelést és heterogén, relabáló/refrakter lefolyást mutat, illetve egyes, indolens lefolyású esetek soha nem igényelnek terápiát, és az egészségeseket megközelítő élettartammal rendelkeznek(19).

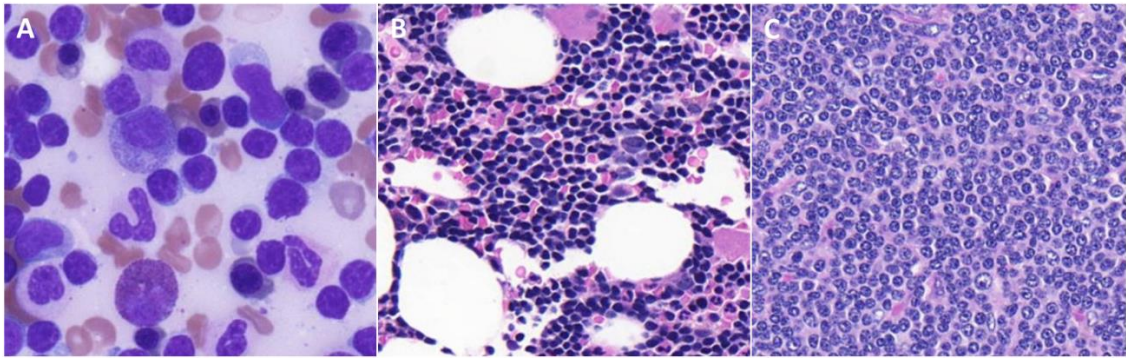
I.5. A CLL diagnosztikája

A CLL leggyakrabban tünetmentes állapotban, véletlenszerűen felfedezett limfocitózis képében kerül felismerésre, kisebb részben nyirokcsomó-megnagyobbodás klinikai tüneteivel jelentkezik a kórkép. A B-tünetek (fáradtság, láz, súlyvesztés,

éjszakai izzadás), valamint a csontvelői infiltráció következtében kialakuló citopéniák és tüneteik az előrehaladott stádiumú CLL-re jellemzők, diagnóziskor ritkán vannak jelen(17).

A diagnózisalkotás alappillérei a szakmai irányelvek, amelyeket a nemzetközi CLL-munkacsoport („International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia”, iwCLL), az európai onkológiai társaság („European Society of Medical Oncology”, ESMO), valamint az Egyesült Államok-beli szakmai szervezet, az NCCN („National Comprehensive Cancer Network”) dolgozott ki(20-22). Noha a diagnózisalkotás lépései nagy hasonlóságokat mutatnak az egyes ajánlásokban, dolgozatunkban az iwCLL irányelveit vesszük alapul.

A CLL diagnózisa alapvetően a perifériás sejt számokon, a perifériás vérkenet kvalitatív és kvantitatív vizsgálatán és a daganatsejtek immunfenotipizálásán alapul. A CLL diagnózisának felállításához a perifériás vérben 5000 B-limfocita jelenléte szükséges mikroliterenként, illetve ilyen mértékű limfocitózis álljon fenn legalább három hónapja. A CLL-sejtek CD5, CD19 és CD23 sejt felszíni markereket expresszálnak, ezek vizsgálatával áramlási citometriával vagy immuncitokémiával karakterizálhatók. A normál B-sejtekhez képest alacsony mértékű a sejt felszíni immunglobulin, a CD20 és CD79b expressziója(23, 24). Mivel monoklonális B-sejtes proliferációról van szó, a daganatsejtek kappa vagy lambda immunglobulin könnyűlánc restrikiót mutatnak(25). Morfológiailag a CLL-sejtek kisméretű, érett limfociták heterokromatinizált sejtmaggal, jól elkülönülő sejtmagvacska nélkül. A perifériás vérkeneten látható Gumprecht-rögök jellegzetesek CLL-re, a fragilis sejtek kenetkészítés során történő mechanikus károsodásából származnak. A CLL-sejtek környezetében nagyobb, atipikus limfociták és prolimfociták is előfordulhatnak, viszont ha az utóbbiak meghaladják az összes limfocita 55%-át, B-sejtes prolimfocitás leukémia (B-PLL) jelenléte valószínű(26) **(3. ábra)**.



3. ábra. A CLL morfológiája. A: A csontvelőkeneten az elszórtan megfigyelhető egyéb hemopoetikus sejtek között nagy számban (>80%) láthatók a CLL-re jellemző kis limfoid sejtek (hematoxilin-eozin (HE), 40x); B: A cristabiopsziás mintában az intertrabekuláris terekben intersticiális mintázattal kis érett, heterokromatinizált magvú limfociták infiltrációja látható (HE, 20x); C: A nyirokcsomóban kis érett megjelenésű limfociták diffúz infiltrációja látható, elszórtan egy-egy nagyobb sejttel, paraimmunoblaszttal, prolimfocitával (HE, 20x).

Amennyiben mikroliterenként 5000-nél kevesebb, CLL fenotípusú sejt található a perifériás vérben, monoklonális B-sejtes limfocitózisról (MBL) beszélünk(27). Az MBL évi 1-2%-os rátával progrediál valódi CLL-be, és a CLL-es betegekben gyakorlatilag minden esetben megelőzi az MBL a CLL kialakulását(28), a CLL-re jellemző genetikai eltéréseket hordozva(27).

A kis limfocitás limfóma (SLL) a CLL-lel egyenértékű entitás a limfoid daganatok 2016-os WHO-osztályozása alapján(13). SLL diagnózisa mondható ki CLL helyett, amennyiben nyirokcsomó-megnagyobbodás van jelen, klonális csontvelő-infiltrátum okozta citopéniák nélkül, valamint a perifériás vér limfocitaszáma nem haladja meg az 5000/ul-t. Az érintett nyirokcsomó szövettani vizsgálata adja meg a végső diagnózist SLL-ben(26).

I.6. A CLL patogenezeise

Míg a B-sejtes malignitások többségénél a kiindulási sejt típus jól ismert, és az *IGHV* gén szomatikusan mutált, vagy nem mutált annak megfelelően, hogy a daganat a B-sejt-fejlődés melyik fázisából származik, CLL-ben mutált, illetve nem mutált *IGHV* gén is előfordul, és a sejteredete is számos kérdést vet fel(29). CLL-es betegekből izolált HSC-ből xenogén transzplantáció során CLL fenotípusú klonális B-sejtek

fejlődtek ki Kikushige és *mtsai.* tanulmányában, amelyek az eredeti CLL sejtklóntól független *IGH* génátrendeződést mutattak; továbbá, a CLL-ben gyakran előforduló *VH1*, *VH3* és *VH4* géneket azonosították a HSC populációban. A kialakuló monoklonális/oligoklonális B-sejt-populáció MBL ekvivalens állapotot jelentett, amelyből onkogén, CLL-re jellemző genetikai eltérések megjelenésével alakult ki CLL. A tanulmány értékes bizonyítékkal szolgál a HSC-nek az érett B-sejtes daganatokban betöltött szerepével kapcsolatban(30).

Többféle hipotézis ismert a CLL-sejtek eredetével kapcsolatban. A B-sejtek klonális expanziója az (auto)antigénnel való többszöri találkozás eredménye. Az autoantigének, valamint mikrobiális patogének aktiválják a BCR-jelátviteli utat, és tolerogén mechanizmusokat (receptorrevízió, anergia, CD5+ expresszió, SHM) indukálnak, amelyek a CLL sejtklónok túléléséhez vezetnek(29). Amennyiben az *IGHV* mutációs státusz alapján vizsgáljuk, hogy a B-sejt-fejlődés mely stádiumából származik a CLL sejt, a mutációt nem hordozó variabilis régióval („unmutated”, *IGHV-U*) rendelkező sejtek feltehetőleg a GC-be történő belépés előtt váltak le a fejlődési sorról, míg a mutált *IGHV* génnel bíró sejtek („mutated”, *IGHV-M*) valószínűleg áthaladtak a GC-n, és ezután következett be a végső, CLL irányú transzformáció(29). A B-sejtek három altípusa vetődött fel a CLL sejteredeteként, a marginális zóna (MZ) B-sejtek, a humán B1-sejtek, valamint a tranzicionális B-sejtek(31, 32). Elképzelhető, hogy az autoantigénnel való találkozást, és a CD5 expresszió upregulációját követően a MZ B-sejtek CLL-sejtekké differenciálódnak, viszont a teóriát gyengíti a sejtfelszíni markerek különbözősége (a MZ B-sejtek CD5-/CD23-/IgM+ fenotípusúak, míg a CLL-sejtek CD5 és CD23 pozitívak, viszont felszíni immunglobulint nem, vagy alacsony mértékben expresszálnak)(31). Továbbá, míg a MZ B-sejtek bakteriális poliszacharid antigénnel szemben gyors és hatékony válaszreakciót mutatnak, már 0. stádiumú CLL-ben is nagyon gyér válaszreakciót adnak a betegek poliszacharid alapú vakcinákra(29). A humán B1-sejtek a CLL-sejtekhez hasonló felszíni marker konstellációt mutatnak, többségük CD5 pozitív, illetve ZAP-70 expresszió is megtalálható(32). A teória ellen szól, hogy a CLL-sejteken lévő BCR variabilis szakaszának 3-as komplementaritás-meghatározó régiója („complementarity determining region 3”, CDR3) hosszabb, mint a humán B1-sejteké, illetve a két sejttípus által használt *IGHV* gének is különböznek egymástól(32). A csontvelőből a másodlagos nyirokszervekbe tartó tranzicionális (T1 és T2) B-sejtek szerepe is felvetődött a CLL sejteredeteként, ám ezen sejtek CD10 pozitivitása gyengíti a teóriát(31). Összességében, a HSC stádiumban szerzett genetikai aberrációk, valamint a B-sejtek autoantigének

indukálta klonális expansziója jelentős szereppel bír a CLL patogenezisében, viszont a kórkép sejteredete továbbra is tudományos vita tárgyát képezi.

I.7. A CLL genetikai háttere és prognosztikai markerei

I.7.1. A B-sejt-jelátvitel szerepe CLL-ben

A BCR komplex membránhoz között IgM-ből, valamint a hozzá nem-kovalens kötésekkel kapcsolódó CD79a (Ig α)/CD79b (Ig β) heterodimerből áll(33). Szolubilis vagy membránkötött antigén kapcsolódásakor a CD79a és CD79b citoplazmatikus ITAM motívumainak tirozin-foszforilációja következik be a Lyn és Syk Src kinázok révén, majd egyéb kinázok és adapterfehérjék kapcsolódásával létrejön a szignalszóma komplex. A szignalszóma aktivációját követően történik a BCR-től downstream elhelyezkedő három fő jelátviteli molekula (Bruton-féle tirozin-kináz - BTK, foszfolipáz C-gamma 2 - PLC γ 2 és foszfatidilinozitol-3-kináz - PI3K) aktivációja. A BTK autofoszforilálódik, ami PLC γ 2, valamint NF κ B aktivációhoz vezet. A Syk és Lyn kinázok a BTK-val közösen foszforilálják a PLC γ 2-t és serkentik a diacilglicerol (DAG), valamint inozitol-trifoszfát (IP3) képződését. A PI3K aktiváció foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát (PIP2) és foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát (PIP3) képződéséhez vezet. A felsorolt lépések széleskörű jelátviteli folyamatokat indukálnak, amelyek a B-sejtek proliferációját és túlélését biztosítják(33).

A normál B-sejtekhez képest, a CLL sejtek BCR-jelátvitele számos eltérést mutat. A BCR szignált elindító molekulák közül a Syk tirozin-kináz nyugalmi foszforilációja CLL-ben kifejezettebb, mint a normál B-sejtekben, illetve a Syk transzkripcionális, valamint fehérjeszintű overexpressziót mutat(34). A Lyn kináz fehérjeszinten ugyancsak overexpresszált, valamint konstitutívan aktív, *in vitro* tanulmány alapján(35). A Syk és Lyn kísérletes gátlása a CLL-sejtek apoptózisához vezetett, így felvetődött a BCR jelátvitel komponenseinek terápiás célpontként történő alkalmazása(35, 36). Nemcsak a szignált elindító molekulák, hanem az effektor útvonalak amplifikációját is megfigyelték CLL-ben. A PI3K CLL-ben tapasztalt konstitutív aktivitása kísérletes úton gátolható, több inhibitor is kaszpázfüggő apoptózishoz vezetett(37, 38). A PI3K aktivitás következtében a tőle downstream elhelyezkedő Akt is konstitutívan aktív CLL-ben, amely az antiapoptotikus Bax és XIAP fehérjékkel együtt PI3K inhibitorokkal gátolhatónak bizonyult(37, 38). A Btk jelátviteli útvonal amplifikációja is túlélési szignálokat közvetít a CLL-sejt felé a PI3K, PLC γ 2 és NF κ B molekulákon keresztül. A Btk gátlása PCI-32765 (jelenlegi nevén

ibrutinib) ágenssel a CLL sejtek apoptózisát okozta, valamint a downstream jelátvitel foszforilációs lépéseit gátolta kísérletes körülmények között(39).

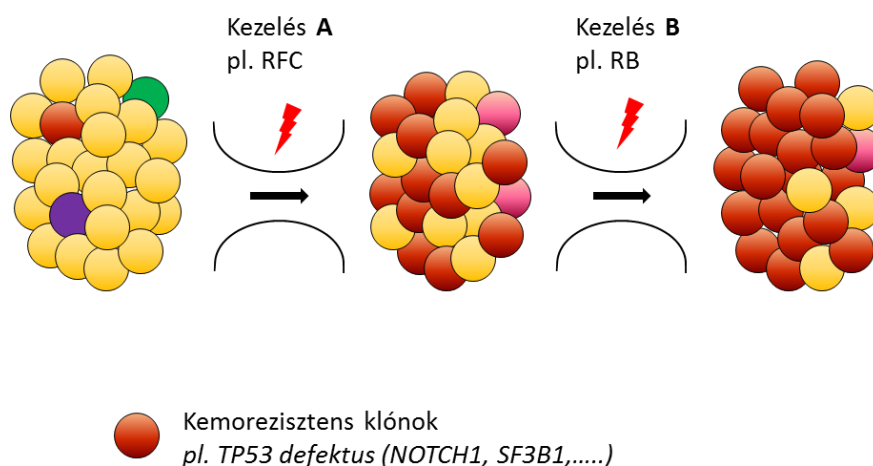
I.7.2. A CLL genetikai háttere, prognosztikus és prediktív markerek

I.7.2.1. Citogenetikai aberrációk

A CLL rendkívül heterogén klinikai lefolyásának hátterében döntő jelentőséggel bírnak a genetikai tényezők. Döhner és *mtsai.* nagy horderejű tanulmányukban interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációval (iFISH) vizsgálták a CLL-ben előforduló gyakori citogenetikai aberrációkat, és az addig használt, klinikai paramétereken alapuló Rai és Binet-féle rizikóbecslő skálák helyett egy precízebb, genetikai alapú kockázatbecslést írtak le(1). Míg az alacsony mitotikus aktivitású CLL-sejtekben a hagyományos kariotipizálással a betegek megközelítőleg felében volt csupán azonosítható citogenetikai eltérés(40), az interfázisban lévő sejtek vizsgálatára is alkalmas iFISH eljárás a betegek 82%-ában detektált aberrációt. A Rai/Binet stádiumra, illetve előzetes kezelési vonalakra tekintet nélkül bevont betegpopulációban a leggyakoribb eltérések a 13q14 deléció (55%), a 11q22-23 deléció (18%), a 12q triszómia (16%), a 17p13 deléció (7%) és a 6q21 deléció (6%) voltak. A medián túlélést a citogenetikai eltérések tükrében vizsgálva, a 13q deletált betegek mutatták a legkedvezőbb túlélést, 133 hónappal, míg a 17p deléciót hordozók a legkedvezőtlenebbet, 32 hónappal. A 11q deletált esetek 79 hónap medián túléléssel bírtak, míg a 12-es triszómiát vagy normál kariotípust hordozók 114, illetve 111 hónapos túléléssel intermediér prognózisúnak bizonyultak(1).

A 13q deléció 80%-a monoallélikus, és *IGHV-M* CLL-ben gyakoribb, mint *IGHV-U* esetekben. Mivel a 13q deléció gyakran egyedüli citogenetikai aberrációként van jelen, a CLL kialakulásának kezdeti szakaszában valószínűsítik a szerepét(1, 41). A deléció kiterjedése betegenként változó, de a hosszú, nem kódoló RNS-eket kódoló *DLEU2* és *DLEU1* gének, valamint a *MIR15A-MIR16-1*, microRNS-eket kódoló génklaszter mindig érintett, és klonális B-sejt proliferációhoz, valamint a CLL fenotípus kialakulásához vezet. A *MIR15A-MIR16-1* a sejtciklus és az apoptózis szabályozásában játszik szerepet, a G₀/G₁-S átmenet génjeinek, valamint az antiapoptotikus *BCL2* génnek az expresszióját csökkentve(42, 43). Amennyiben a 13q deléció nagy kiterjedésű, és a *RBI* tumorszuppresszor gént is érinti, az első kezelésig eltelt idő („time to first treatment”, TTFT), valamint a teljes túlélés („overall survival”, OS) is rövidebb, mint a kisebb kiterjedésű deléciók esetén(44).

A 17p deléció a citogenetikai aberrációk közül a legkedvezőtlenebb prognózissal társul, és gyakorisága függ a vizsgált betegpopulációtól, az előzetes kezelési vonalak számától. Míg az MBL-esetek 1%-ában fordul csak elő, kemorefrakter esetekben 20%-os a gyakorisága, RT-ben pedig az 50%-ot is elérheti(45, 46). A deléció leggyakrabban a 17-es kromoszóma teljes rövid karját érinti, és mindig az itt található *TP53* tumorszuppresszor gén elvesztéséhez vezet(47). A 17p deléció az *IGHV-U* esetekben dúsul fel, és az eleve fokozott genomikus instabilitást a *TP53* elvesztése miatt még tovább növeli(48). A 17p deletált esetek nagy részében megtalálhatók az ép allélt érintő *TP53* mutációk, a *TP53* teljes funkciókieséséhez vezetve. A *TP53* gént érintő deléciót, valamint mutációkat együttesen *TP53* defektusnak nevezzük, és a CLL egyik legerősebb prognosztikus és prediktív faktorát jelenti. Míg intakt *TP53* funkció mellett a kemoimmunoterápia által károsított DNS-ű CLL-sejtek apoptózist szenvednek, ledált *TP53* mellett ez nem következik be, és a kemorefrakter klón növekedési előnyre tesz szert a kemoszenzitív klónokkal szemben (4. ábra)(49).



4. ábra. A klonális evolúció vázlatos ábrázolása. Immunkemoterápiás kezelésekre hatására a kemorezisztens klónok szelektálódnak, ami relapsushoz vezet. (RFC: rituximab-fludarabin-ciklofoszfamid, RB: rituximab-bendamustin).

A 17p deletált eseteknél valamivel kedvezőbb, de továbbra is kedvezőtlen prognózissal bír a 11q deléció jelenléte. Az aberráció által érintett fő target az *ATM* gén, melynek fehérjeterméke a *TP53* regulátora. A deléció többnyire monoallélikus, az *IGHV-U* esetekben dúsul fel, és az esetek egyharmadában a deléció által nem érintett allélon *ATM* mutáció is található. Amennyiben a 11q deléció nem érinti az *ATM* gént, *BIRC3* érintettség figyelhető meg (11q22.2), amely az NF- κ B útvonal szabályozó

eleme. A diagnózis idején a betegek 20%-ában figyelhető meg *ATM* érintettség, a betegek fiatalabbak és gyakran prezentálódnak nyirokcsomó-megnagyobbodással(50-52).

A 12-es triszómia diagnóziskor a CLL esetek 15%-ában, míg az SLL esetek 30%-ában van jelen, a limfociták atípusos morfológiájával, magas proliferációs rátával és önmagában véve intermediér prognózissal társul(1, 53). Míg a 11q, 13q és 17p deléciók háttérben álló molekuláris mechanizmusok jól ismertek, a 12-es triszómia által érintett folyamatok nem tisztázottak. Az esetek jelentős része *NOTCH1* mutációval, illetve subset #8 sztereotip BCR-rel társul, melyek jelenléte az intermediér prognózis helyett kedvezőtlen kimenetelt, és magasabb Richter-transzformációs rátát jelent(54, 55). Tsagiopoulou és *mtsai.* egy speciális DNS-metilációs profilt azonosítottak, amely a 12-es triszómiát hordozó CLL-esetekre jellemző, és a kromoszóma teljes kiterjedésében számos gén, többek között a génextpressziót szabályozó *RUNX3* upregulációját okozza(56).

Amennyiben három vagy több citogenetikai eltérés van jelen, komplex kariotípusról beszélünk, amely a betegek 16%-ában van jelen, és kedvezőtlen prognózissal társul(57, 58). A négy fő citogenetikai aberráción túl számos, ritkábban előforduló eltérést azonosítottak CLL-ben. A 15q15.1 deléció 4%-ban van jelen, az *MGA* gént érinti, klinikai jelentősége nem ismert(59). A 9p21 deléció *CDKN2A* vesztéshez vezet és RT-asszociált módon jelenik meg, míg a 8q24 amplifikáció a *MYC* gén overexpressziójához és szintén RT-hoz vezet(60). A 6q21 deléció az esetek 8%-ára jellemző, gyakran komplex kariotípus részeként figyelhető meg, a proapoptotikus *FOXO3* csökkent expressziójával, valamint kedvezőtlen kórlefelgyással társul(61).

I.7.2.2. Az *IGHV* mutációs státusz szerepe CLL-ben

Az *IGHV* átrendeződés a patogenezisben betöltött szerepén túl a legfontosabb prognosztikai faktort jelenti CLL-ben. Amennyiben az *IGHV* nukleotidsorrendje legalább 98%-os csírvonali homológiát mutat, mutációt nem hordozó (*IGHV-U*) esetről beszélünk, amely a SHM elmaradása miatt polireaktív BCR-rel, túlaktivált jelátviteli útvonallal és CLL sejtproliferációval, valamint kedvezőtlen túléléssel jár. A 97% alatti homológia mutált (*IGHV-M*) CLL-t, míg 97-97,9%-os homológia borderline CLL-t jelent(62). A CLL-betegek harmada szinte azonos, sztereotip BCR immunglobulinokat hordoz, amelyek az alkalmazott géncsaládok, illetve a CDR3 régió hossza alapján alcsoportokat, ún. subseteket alkotnak. Az egyes subsetek gyakran

felülírják prognosztikai jelentőségükben a szélesebb kategóriát jelentő *IGHV-U* és *IGHV-M* alcsoportokat - az *IGHV3-21* gén használatával jellemezhető subset #2 mutációs státusztól függetlenül nagyon agresszív kórlefojással társul, a subset #4 különösen indolens viselkedést mutat, míg a subset #8 rendkívül kedvezőtlen lefojással és gyakori RT-val társul(45, 63). Az SHM szintje alapján elkülönülő két csoport markáns különbségeket mutat a kemoimmunoterápiára adott válaszbán. Míg az *IGHV-M* betegek több mint fele kitűnően reagál intenzív kemoimmunoterápiára (például rituximab-fludarabin-ciklofoszfamid, RFC), hosszútávú, akár mérhető reziduális betegség („measurable residual disease”, MRD) nélküli remissziót elérve, az *IGHV-U* esetek relabáló-refrakter lefojást, folyamatos progressziót tapasztalnak(64). A fentiek tükrében különösen fontos az *IGHV* mutációs státuszának meghatározása, amennyiben kezelési indikáció áll fenn, hogy az *IGHV-U* betegek a számukra megfelelő, célzott terápiában részesülhessenek. Mivel az *IGHV* státusz a betegség időtartama alatt nem változik, elegendő azt egyszer megvizsgálni a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) ajánlásának megfelelően(62).

I.7.2.3. Visszatérő genetikai eltérések CLL-ben

Az elmúlt évtized teljes genom- és exomszekvenálási tanulmányainak köszönhetően feltárult előttünk a CLL genom(65-67), amely megabázisonként 0,9 mutációt tartalmaz, így genomikus komplexitásában egy nagyságrenddel elmarad a szolid tumoroktól, és a hematológiai malignitások között is alacsony komplexitással bír. Továbbá, a leggyakrabban mutált génekben (*NOTCH1*, *ATM*, *SF3B1*, *TP53*) sem azonosítottak mutációt gyakrabban, mint az esetek 15%-ában(65, 67).

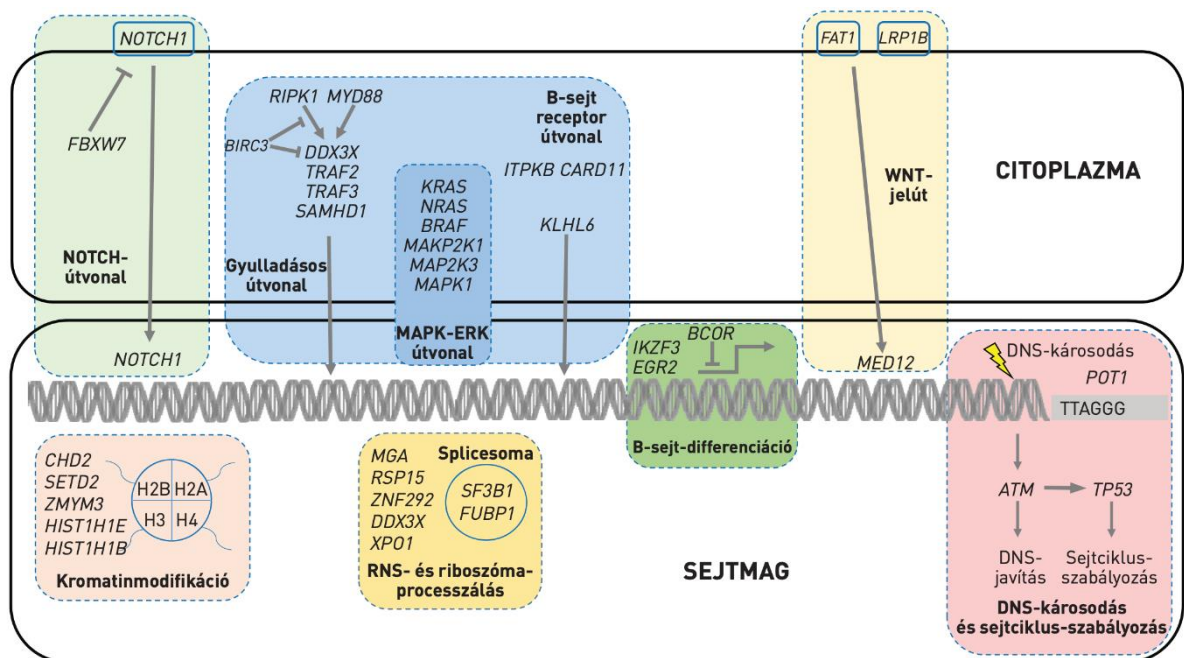
Az NGS-tanulmányok által az egyik legkorábban azonosított driver mutációnak a *NOTCH1* mutációi bizonyultak, amelyek az esetek 10%-ában fordulnak elő, és *IGHV-U* státusszal, valamint 12-es triszómiával asszociáltak(66, 68). A gén fehérjeterméke ligand-aktivált transzkripciós faktorként a sejtproliferáció számos jelátviteli útvonalát szabályozza. A mutációk a gén 34-es exonját érintik, megközelítőleg 80%-ukat a c.7544_7545delCT kereteltolódással járó deléció teszi ki. A deléció következtében a fehérje PEST (prolin - P, glutaminsav - E, szerin - S, treonin - T) doménjében korai termináció következik be, így károsodik a fehérje ubiquitin-mediált degradációja, és felhalmozódik az aktív izoforma(66, 69, 70). A *NOTCH1* mutációk kedvezőtlen prognózist, valamint RT-re való megnövekedett hajlamot jelentenek.

TP53 mutációk a humán daganatok több mint 50%-ában előfordulnak, és onkogén potenciáljukat jelzi, hogy a csíravonali *TP53* mutációk talaján kialakuló Li-Fraumeni-szindrómában gyakran már harmincéves kor előtt megjelennek a különböző malignus kórképek(71, 72). A *TP53* gén által kódolt fehérje a sejtciklus-szabályozás, az apoptózis, valamint a DNS-károsodásra adott válasz központi molekulája, legfőbb tumorszuppresszorunk, a „genom őrzője”. A változatos okokból, például kemoterápia-indukált módon létrejövő DNS-károsodást követően a *TP53* apoptózist indukál, vagy a sejtciklust leállítja G_1 fázisban, így biztosítva alkalmat a károsodás kijavítására, és megelőzve a károsodott genetikai információ továbbadását(73). CLL-ben a *TP53* defektus két formája ismert, a 17p deléció, illetve a *TP53* mutáció, amelyek egymással gyakran társulnak, a 17p deletált esetek 80%-a hordoz *TP53* mutációt a deléció által nem érintett allélon(46). Noha a mutációk a fehérje DNS-kötő doménjében (exon 4-8 által kódolt régió) dúsulnak fel, a gén teljes hosszán előfordulhatnak, tehát a teljes gén szekvenálással történő vizsgálata szükséges a legújabb ERIC ajánlásnak megfelelően(74). A mutációk háromnegyede missense mutáció, de kereteltolódással járó, vagy in-frame inszerciók/deléciók, nonsense mutációk, illetve splice site mutációk is előfordulnak(75). Míg diagnózis idején a betegek mindössze néhány százaléka hordoz *TP53* mutációt, a többszörösen előkezelt, Richter-transzformált esetek felében megtalálható az eltérés(41, 76). Ennek megfelelően, mivel a kemoterápia által indukált klonális szelekció során az agresszívebb, *TP53* mutációt hordozó és kemorefrakter klónok feldúsulnak, a *TP53* státusz vizsgálata a kezelés megkezdésekor, illetve minden újabb kezelési vonalat megelőzően szükséges(74). A *TP53* defektust hordozó betegek a DNS-károsodásra adott elégtelen válasz miatt a hagyományos kemoimmunoterápiára kedvezőtlenül reagálnak. A CLL8 tanulmányban, amely fludarabin-ciklofoszfamid kombináció terápiás hatását vizsgálta az anti-CD20 monoklonális antitest rituximabbal kiegészítve, vagy anélkül, a *TP53* defektus bizonyult a legerősebb prognosztikai tényezőnek, és igen kedvezőtlen PFS-sel és OS-sel társult(77). Az alkiláló ágens bendamustin, valamint rituximab kombinációját vizsgálva szintén csekély terápiás hatást detektáltak a *TP53* deficiens esetekben(78). Ezen betegekben tehát mindenképpen innovatív, személyre szabott terápiás megközelítés szükséges, amely *TP53*-independens módon váltja ki a CLL-sejtek pusztulását(79).

A *MYD88* mutációi a CLL esetek 3-8%-ában fordulnak elő, kizárólag *IGHV-M* eseteket érintenek(66, 67). A gén fehérjeterméke a Toll-like receptor (TLR) komplex adaptormolekulája, amely TLR stimulációt követően homodimerként komplexet formál

az IRAK4 fehérjével, IRAK1 és IRAK2 aktivációhoz vezetve. TRAF6 aktivációt és I κ B α foszforilációt követően aktiválódik a B-sejtek egyik fő transzkripciós faktora, az NF- κ B. CLL-ben, illetve egyéb érett B-sejtes limfómákban (DLBCL, primer központi idegrendszeri limfóma és limfoplazmocitás limfóma/Waldenström-makroglobulinémia) is az L265P mutációs forrópont érintett leggyakrabban, amely a TLR ligandkötésének hiányában is folyamatosan aktív MYD88-IRAK jelátvitelhez és NF- κ B aktivitáshoz vezet(41).

Az említetteken túl, számos egyéb gén (driver) mutációja vezethet CLL kialakulásához, több celluláris jelút hálózatot (gyulladásos útvonal, MAPK-ERK útvonal, BCR-útvonal, WNT-jelút, kromatinmodifikáció, spliceoszóma, B-sejt-differenciáció, sejtciklus-szabályozás) érintve (5. ábra).



5. ábra. Az új-generációs szekvenálási tanulmányok során azonosított, CLL-ben leggyakrabban mutációt hordozó gének, funkciójuknak és celluláris lokalizációjuknak megfelelően csoportosítva. Az ábra forrása: Marosvári és *mtsai*. Magyar Onkológia, 2016(80).

A *MYD88* mutációihoz hasonlóan, a *BIRC3* mutációk is konstitutív NF- κ B aktivációval járnak. A *BIRC3* a TRAF2 és TRAF3 fehérjékkel együtt az NF- κ B útvonalat aktiváló MAP3K14-et regulálja negatívan, tehát az útvonal gátló molekulájaként funkcionál, és mutációi esetén folyamatosan aktívvá válik a jelút.

A *BIRC3* mutációk a CLL-es betegek 4%-ában fordulnak elő, *IGHV-U* esetekben dúsulnak fel, és kemorefrakteritással, valamint kedvezőtlen prognózissal társulnak. Kemoterápia hatására a *BIRC3* mutációt hordozó klónok szelektálódnak, így az eltérés gyakorisága fludarabinrefrakter esetekben a 24%-ot is elérheti(51, 81).

A spliceoszóma-mutációk, különösen az *SF3B1* mutációi nagy jelentőséggel bírnak a CLL patogenezisében, sőt, mivel mielodiszpláziás szindrómában is gyakran előfordulnak, felvetik a vérképző őssejt diszregulációjának szerepét érett sejtes limfoid daganatokban is(82, 83). Az *SF3B1* a pre-mRNS-ből az intronok excíziójáért felelős U2 spliceoszóma központi eleme, mutációi a CLL esetek 10-14%-ában fordulnak elő, zömmel *IGHV-U* státuszhoz társulva(67, 70, 84). A mutációk a fehérje HEAT doménjének evolúciósan konzervált régióiban fordulnak elő, alátámasztva ezzel patogén szerepüket(67). Az *SF3B1* mutációk által okozott spliceoszóma-károsodás mellett a *DDX3X*, valamint az *XPO1* mutációi is a CLL-ben fontos szerepet betöltő RNS processzálas zavarához vezetnek(67). Az *SF3B1* mutációk közül leggyakrabban a K700E fordul elő, az *SF3B1* mutált betegek rövidebb TTFT-vel, progressziómentes és teljes túléléssel rendelkeznek. Az *SF3B1* mutációk megjelenése késői esemény a CLL klonális evolúciójában, MBL-ben nagyon ritkán, míg kemorefrakter esetekben gyakran előfordul, és a relapszus kiinduló klónját adja(67, 85).

I.7.2.4. Prognosztikai tényezők CLL-ben

A prognosztikai, azaz a betegség kimenetelét becselő faktorok között genetikai, illetve klinikai tényezők is megtalálhatók. Az *IGHV* gén mutációs státusza a CLL lefolyása során nem változik, és az egyik legfontosabb prognosztikai tényezőt jelenti CLL-ben. Az esetek 40%-a *IGHV-U* státuszú, körükben sokkal gyakoribbak a társuló, magas kockázatot jelentő genetikai eltérések, ami indokolja a kedvezőtlenebb prognózisukat mind a PFS, mind az OS szempontjából, az *IGHV-M* esetekhez képest(65). A sztereotip BCR-t (subset) hordozó betegek prognózisa a subset típusától függ, előfordulnak nagyon kedvező (például subset #4), illetve agresszív (például subset #2) kórlefyással társuló típusok is(86). Az *IGHV* jelentős prognosztikai ereje kemoimmunoterápiával kezelt betegekben érvényesül elsősorban, ezért az új, célzott terápiák alkalmazásakor új kockázatbecslő skálák kidolgozása szükséges(48). A Rossi és *mtsai*. által kidolgozott kockázatbecslő skála genetikai alapokon nyugszik, és nagy érdeme, hogy a FISH-sel detektálható aberrációk mellett a molekuláris eltérések vizsgálatával az alacsony rizikójú betegek 20%-a átkerült a pontosabb karakterizálás révén a magas kockázatú csoportba(87). Magas kockázatot

jelent a TP53 defektus és/vagy *BIRC3* mutációk jelenléte, intermedier prognózissal társul a *NOTCH1* mutáció, *SF3B1* mutáció, vagy 11q deléció, alacsony kockázattal bírnak a 12-es triszómiát hordozó, vagy normál kariotípusú esetek, míg a 13q deletált esetek nagyon alacsony kockázatúak(87). A CLL International Prognostic Index (CLL nemzetközi prognosztikus index, CLL-IPI) a terápiás döntéshozatalt segíti az OS előrejelzésével, akár már a diagnózis pillanatában. A CLL-IPI alkotóelemei, melyek egyenként kedvezőtlen prognózist jelentenek, a TP53 defektus, az *IGHV-U* státusz, a 3,5 mg/l feletti β 2-mikroglobulinszint, a B vagy C Binet-stádium, illetve a 65 év feletti életkor(88). Jeromin és mtsai. az *SF3B1* mutációk, az *IGHV-U* státusz, valamint a 11q deléció rövid TTFT-vel való asszociációját írták le. Az első két eltérés, valamint a TP53 defektus, a férfi nem és az életkor pozitívan korreláltak a rövid idejű OS-sel(89). Nadeu és mtsai. komplex genetikai vizsgálatokon alapuló, elsősorban korai stádiumú betegekre alkalmazható kockázatbecslő rendszerükben leírták, hogy a CLL-IPI megállapításával ellentétben a rövid TTFT nem korrelál a TP53 defektus jelenlétével(90). Mivel számos, más prognosztikus rendszerben nem szereplő gén (*BRAF*, *ATM*, *FBXW7*, *MGA*) vizsgálatát is igényli a módszer, alkalmazhatósága egyelőre limitált.

I.8. A CLL terápiája

I.8.1. Kemo(immuno)terápia CLL-ben

Az elmúlt években robbanásszerű fejlődés ment végbe a CLL terápiájában, amely ezt megelőzően kemoterápián, illetve később az immunkemoterápián alapult. Az alkiláló ágensek közé tartozó chlorambucil jelentette hosszú időn keresztül a CLL standard elsővonalbeli terápiáját, amely a CLL tüneteit igen, viszont a betegek túlélési esélyeit nem javította(91). A purinanalóg fludarabin kedvezőbb medián túlélést biztosított a chlorambucilnál, illetve a fludarabint is felülmúlta a teljes válaszadási arány, illetve a progressziómentes túlélés tekintetében a fludarabinnak az alkiláló hatásmechanizmusú ciklofoszfamiddal történő kombinációja (FC)(92). Az anti-CD20 monoklonális antitest rituximabot a fázis III CLL8 vizsgálatban FC-vel kombinálva (RFC) korábban nem kezelt betegeknél 90%-os objektív válaszadási rátát és 44%-os komplett remissziót idézett elő, az FC által biztosított 80%-os válaszadási rátával és 22%-os komplett remissziós rátával szemben. Továbbá, a rituximab hozzáadása a PFS-t, valamint az OS-t is jelentős mértékben növelte 65 évnél fiatalabb betegeknél(93). Az RFC kezelésre adott hosszú távú PFS erős prediktora az *IGHV* mutációs státusz. Az *IGHV-M* státuszú betegek 54%-a 12,8 éves követési idő után is remisszióban volt, és

10,4 éves követési időt elérve, 42 beteget vizsgálva, további relapszusok nélküli platófázis alakult ki. Ezen adatoknak megfelelően, az *IGHV*-M státuszú, kedvező általános állapotú betegekben az RFC kezelés a hosszútávú remisszió lehetőségét nyújtja(94). Mivel az RFC protokoll alkalmazása során mély neutropénia, infekciók, mieloszuppresszió, másodlagos malignitások (ideértve többek között a terápia-asszociált mielodiszpláziás szindrómát, illetve akut mieloid leukémiát) meglehetősen gyakran fordulnak elő, idős, illetve komorbiditásokkal bíró, elesett állapotú betegek részére kedvezőbb alternatívát nyújt a rituximabnak az alkilálószer bendamustinnal való kombinációja (RB). Míg fiatal, jó általános állapotú, TP53 defektust nem hordozó betegekben az RB elsővonalbeli kezelésként rövidebb PFS-t biztosít, mint az RFC (57,6 hónap vs. 42,3 hónap), hatvanöt éves életkor felett ez a különbség eltűnik, miközben az RB lényegesen kedvezőbb mellékhatásprofilal bír(95, 96). Amennyiben idős, elesett állapotú betegekben a rituximab helyett a második generációs anti-CD20 monoklonális antitest obinutuzumabot kombináljuk chlorambucillal, a medián PFS a kétszeresére nőtt (29,9 hónap vs. 15,7 hónap), miközben az OS is szignifikánsan javult(97). Az új, célzott terápiás gyógyszerek ellenére a hagyományos kemoimmunoterápia továbbra is része a CLL terápiás protokolljának, ugyanis jól megválasztott beteganyagban kedvező terápiás hatást biztosít.

I.8.2. Célzott terápia CLL-ben

Az elmúlt években részletesen megismertük a CLL genomját, ezáltal forradalmi változások indulhattak el a célzott terápiák fejlesztésében, a hatékonyságukat előrejelző prediktív biomarkerek azonosításában, valamint a terápiás kudarcot jelentő rezisztenciamutációk előrejelzésében és elkerülésének lehetőségeiben. Dolgozatomban a BCR jelátviteli út komponenseként lényeges BTK, valamint az antiapoptotikus BCL2 gátlása, és az inhibitorok által indukált rezisztenciamutációk kerülnek részletes ismertetésre.

I.8.2.1. BTK-gátlás CLL-ben

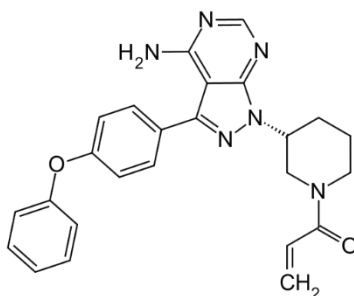
A BCR szignál felerősítésében kritikus szerepet játszik a BTK. A fehérje a tirozin-protein-kinázok (Tec) egyik képviselője, defektusát, az X-hez kötött agammaglobulinémiát („X-linked agammaglobulinemia”, XLA) 1952-ben írta le Bruton(98), akiről később az enzimet elnevezték. A *BTK* pontmutációk által okozott XLA-ban a B-sejt-érés pro-B-sejt szintű korai terminációja következik be, és a keringő

immunglobulinok hiánya súlyos zavarokat okoz a humorális immunitásban(99, 100). Az XLA kórkép megfelelője egérben az X-hez kötött immundeficiencia („X-linked immunodeficiency”, XID), amely az XLA-nak megfelelő B-sejt-érési blokáddal, viszont enyhébb tünetekkel társul(101). A kísérletesen létrehozott *BTK* mutáns, illetve *BTK* knock-out egérmodellek szintén pro-B-sejt-szintű érési blokádot, az antigénstimulációra adott elégtelen proliferációs választ, valamint a B-sejt-jelátvitel zavarát mutatják, így felvetődött a BTK terápiás célpontként történő vizsgálata(33, 101, 102).

Míg a Tec családba tartozó tirozin-kinázok a hematopoetikus sejtek többségében expresszálódnak, a Btk elsősorban a B-sejtekben fejeződik ki, T-limfocitákon és plazmasejteken nem(103). Mivel a Btk szerepe elengedhetetlen a BCR-jelátvitelben és úgy a normál B-sejtek, mint a CLL tumorsejtek fejlődésében, továbbá, expressziója CLL-ben kifejezettebb, mint a normál B-sejtekben, célzott terápiák ideális targetjét jelenti(104).

I.8.2.1.1. Az ibrutinib

A PCI-32765 (későbbi nevén, illetve a dolgozatban a továbbiakban: ibrutinib) a Btk szelektív inhibitora, az eredetileg rheumatoid arthritis kezelésére szánt molekulát az Egyesült Államokban szintetizálták és 2007-ben írták le(105). Az ibrutinib egy amino-pirazolo[3,4-d]-pirimidinszármazék (6. ábra), amely a Btk fehérje számos aminosavával létesít másodlagos kötéseket (például az M477, az E475, a T474 aminosavakkal), miközben a másodlagos kötéseken túl, kovalensen és irreverzibilisen is kötődik a fehérje α D-hélice előtt elhelyezkedő 481-es cisztein (C481) szulfhidril csoportjához(106).

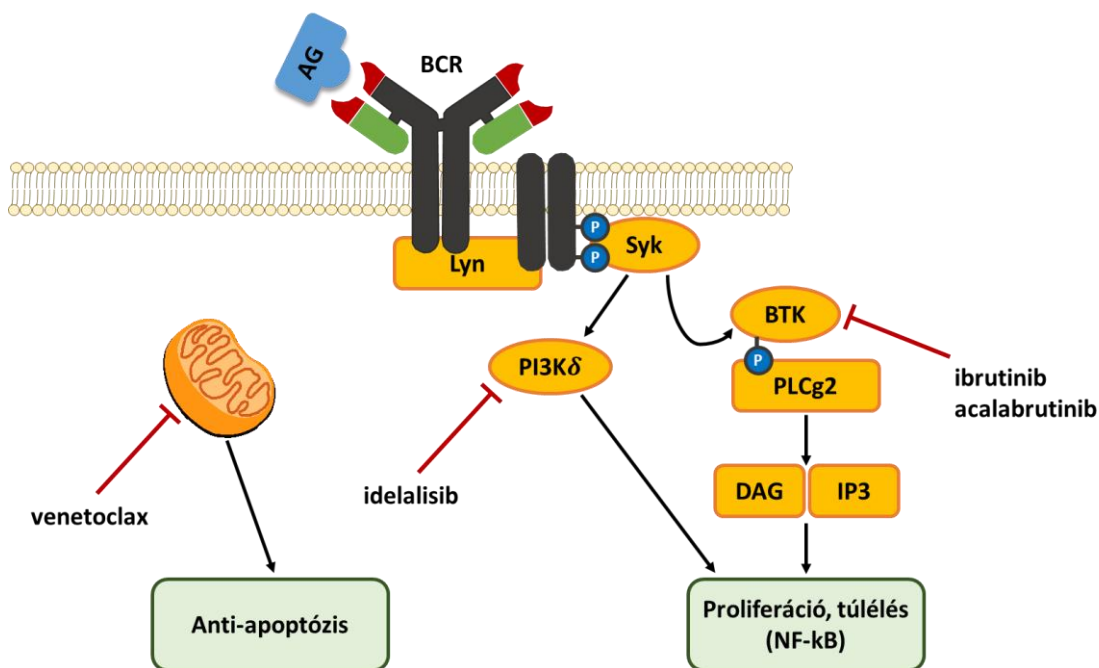


6. ábra. Az ibrutinib kémiai szerkezete.

(Forrás: Wikimedia Commons).

Preklinikai vizsgálatok alapján az ibrutinibbel történő kísérletes Btk-gátlás kaszpázfüggő apoptózist indukált, és a BCR ligandkötését követően a Btk, valamint a

downstream jelkövetítésben szerepet játszó Erk, NF κ B és Akt molekulák foszforilációját is gátolta(39). Továbbá, az ibrutinib a CLL-sejtek CpG oligonukleotidok indukálta *in vitro* sejtproliferációját hatékonyan gátolta, valamint csontvelői strómasejtekkel kokultúrában tenyésztve a CLL-sejteket, az ibrutinib a sejtek túlélését csökkentette a mikrokoznyezetből érkező túlélési szignálok (TNF- α és BAFF) ellensúlyozása révén(39, 107). CLL fenotípusú transzgén egérmodellben a genetikailag inaktív Btk, valamint az ibrutinibbel történő Btk gátlás egyaránt a CLL-sejtek fejlődését és proliferációját gátolta(108) (7. ábra).



7. ábra. A CLL-ben alkalmazott legfőbb, molekulárisan célzott terápiák hatásmechanizmusa. A B-sejt-receptor jelátviteli útvonalán hat az ibrutinib a BTK, míg az idelalisib a PI3K δ gátlása révén. A BCL2-gátló venetoclax az előbbiektől független útvonalon keresztül fokozza a CLL-sejtek apoptózisát.

A preklinikai vizsgálatok, valamint a kis beteganyagon végzett, dózist beállító fázis I vizsgálatok sikerességét és az ibrutinib hatékonyságát látva megkezdődtek a szélesebb körű klinikai vizsgálatok. Az ibrutinib monoterápia a relabáló-refrakter (R/R) CLL-es betegek körében jó tolerabilitás mellett 71%-os teljes válaszadási rátához („overall response rate”, ORR) vezetett, amelyet a kedvezőtlen prognózisú 17p deletált betegek figyelemre méltó 68%-os ORR értéke szorosan megközelített. A válasz tartósnak bizonyult mind a teljes, mind a 17p deletált populációban. A 26 hónapos követési idő alatt 75%-os becsült PFS és 83%-os OS értékeket értek el a teljes, míg 57%-os PFS és 70%-os OS értékeket a kedvezőtlen prognózisú csoportban(109).

Egy fázis II vizsgálatban 51, TP53 defektust hordozó beteget vizsgáltak, kétharmaduk korábban nem részesült kezelésben, egyharmaduk R/R lefolyást mutatott. Ebben a magas rizikójú betegcsoportban az ibrutinib 24 hónapos követési idő alatt 82%-os becsült PFS-t és 80%-os OS-t biztosított(110). Az igen kedvező eredményeket látva az FDA („Food and Drug Administration”, Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet) 2014 februárjában megadta az engedélyt az ibrutinib monoterápia használatára R/R CLL-ben, majd 2014 júliusában az elsővonalbeli alkalmazásra TP53 defektussal bíró betegekben, amelyet az EMA („European Medicines Agency”, Európai Gyógyszerügynökség) engedélye 2014 októberében követett(104). Mivel az ibrutinib monoterápia kedvező toxicitási profillal bír (zömmel alacsony grádusú mellékhatások - hányás, hasmenés, fáradékonyság, láz, neutropenia, pitvarfibrilláció, vérzés, infekciók fordulnak elő), a monoterápia sikerét látva a monoklonális antitestekkel, illetve kemoterápiával történő kombinációk vizsgálata is elkezdődött(104). A HELIOS placebo-kontroll, fázis III vizsgálatban az előzetesen már kezelt, de TP53 defektust nem hordozó betegekben hasonlították össze az RB, illetve az ibrutinib + RB kombinációk hatékonyságát, megengedve az RB karon progrediáló betegek számára az ibrutinibet tartalmazó másik karra történő átkerülést. Az ibrutinib hozzáadásával a betegek 79%-a ért el 18 hónapos PFS-t, míg ibrutinib nélkül csupán 24%-uk. Továbbá, háromszor annyi beteg ért el komplett remissziót ibrutinib mellett, mint anélkül, illetve az MRD-negativitást elért betegek száma is szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ibrutinibkezeltek körében(111). Hosszabb, 34,8 hónapos medián követési idő alatt az RB kar 14,3 hónapos medián PFS-t mutatott, míg az ibrutinibet is tartalmazó karon lévő betegek még nem érték el a PFS-t, valamint az utóbbi csoportba tartozó betegek 26,3%-a ért el MRD-negativitást az ibrutinibkezelésben nem részesülő betegek 6,2%-os értékével szemben(112). Noha több kezelési irányelv létezik CLL-ben, egyetértés mutatkozik abban, hogy ibrutinib alkalmazása javasolt a TP53 defektussal bíró betegek elsővonalbeli terápiájaként, valamint R/R CLL-es betegekben TP53 státusztól függetlenül(20, 22).

I.8.2.1.1. A BTK gátlókkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere

Ibrutinibterápia mellett relabáló betegekben teljes exomszekvenálással azonosítottak Woyach és *mtsai*. a relapszus hátterében álló rezisztenciamutációkat a *BTK*, valamint a BCR-jelátviteli útvonalban tőle közvetlenül downstream elhelyezkedő *PLCG2* génben. A mutációk kizárólag a relapszuskori mintában voltak azonosíthatók,

és a *BTK* génben az ibrutinibkötő aminosavat érintették cisztein – szerin aminosavcsere révén (C481S). Ennek következtében az ibrutinib affinitása a gyógyszerkötő helyhez számottevően csökken, és irreverzibilis helyett csupán reverzibilis kötődés válik lehetővé(113). A leggyakoribb C481S mutáción kívül C481R, C481F, C481Y és C481T aminosavcserek is előfordulnak, továbbá, a *BTK* konformációjában szintén jelentős szereppel bíró 474-es treonin aminosav mutációi (T474I és T474S) az ibrutinib iránti affinitás és szelektivitás számottevő csökkenéséhez vezetnek(114). *PLCG2* mutációk előfordultak *BTK* mutáció kísérőjeként, illetve önállóan is, a leggyakoribb aminosavcserek a következők voltak: R665W, L845F, S707Y. Amíg a *BTK* mutációk az ibrutinib *BTK*-gátló hatásának elvesztéséhez vezetnek, a *PLCG2* funkciónyerő mutációi a *BTK* aktivitástól függetlenül fenntartják a folyamatosan aktív BCR jelátvitelt(113). A *BTK* mutációk esetleges, ibrutinibkezeléstől független megjelenését lényegesen több (613) ibrutinib-naiv betegen vizsgálva, egy esetben sem azonosítottak mutációt, megerősítve azt a feltételezést, hogy a *BTK* mutációk az ibrutinib klonális szelektációs nyomására alakulnak ki, és vezetnek relapszushoz(115).

Többféle megoldás vetődött fel az ibrutinibrezisztens CLL kezelésére. Noha a második generációs acalabrutinib aktívabb és szelektívebb az ibrutinibnél, ahhoz hasonló rezisztenciamechanizmust (C481S) indukál, ennél fogva tehát az ibrutinibkezelés talaján kialakult rezisztens esetekben nem bizonyul hatékonynak. Ígéretes fejlesztési iránynak bizonyultak a nonkovalens *BTK*-inhibitorok, amelyek az előző molekuláktól eltérő aminosavakkal létesítenek kapcsolatot másodlagos kötőerők révén, így C481S mutáns *BTK*-val szemben is hatékonyak. A CGI1746 az M477 és K430 aminosavakhoz kapcsolódik hidrogénkötésekkel, és 1000x-es szelektivitást mutat a *BTK*-val szemben, a többi Tec és Src kinázzal összehasonlítva. A BMS-986142 nemkovalens inhibitor az M477 és E475 aminosavakhoz kötődik hidrogénhidakkal, és szintén aktív C481S mutáns *BTK*-val szemben(114). A nemkovalens *BTK*-gátlókon kívül a *BTK*-tól downstream elhelyezkedő fehérjék gátlásával is megvalósulhat a BCR jelátviteli útvonal gátlása. Mivel a *BTK*-tól upstream elhelyezkedő Lyn és Syk a *BTK* megkerülésével is aktiválhatják a PLC γ 2-t, gátlószereik (a Lyn-gátló dasatinib és a Syk-gátló fostamatatinib, illetve cerdulatinib) képesek *BTK* mutáns esetben is gátolni a BCR jelátvitelt(114). A harmadik lehetőség, amely a klinikai gyakorlatban is meghonosodott, a BCR jelátviteli útvonalhoz nem kapcsolódó, eltérő mechanizmusú target gyógyszeres blokkolását jelenti – a BCL2 gátló venetoclax ma az ibrutinibrezisztens CLL leggyakoribb terápiája.

I.8.2.2. BCL2-gátlás CLL-ben

A daganatok egyik fő ismérve az apoptózis elkerülése(116). Az apoptózis (programozott sejthalál) kulcsmolekulái és végrehajtói a kaspázok (cisztein-proteázok), amelyeket az extrinsic út során a halálreceptorok felől érkező jelek, az intrinsic út során pedig a celluláris stressz aktiválnak. Mindkét útvonalban szerepet játszanak a BCL2 („B-cell lymphoma 2”) család tagjai, a mitokondrium külső membránja integritásának szabályozásával. A család egyes tagjai antiapoptotikus, míg mások proapoptotikus szereppel bírnak, bonyolult egyensúlyuk határozza meg, hogy az extracelluláris jelek, illetve a sejtstressz milyen következménnyel járnak a sejt túlélésére nézve. A BCL2 család antiapoptotikus funkciót bíró tagjai a BCL2, a BCL-XL, a BCL-W, az MCL-1 és a BFL-1/A1, míg proapoptotikusak az ún. „BH3-only” fehérjék (például BIM és PUMA), illetve a multidomén BAX és BAK fehérjék, amelyek a mitokondriális membrán permeabilitását szabályozzák(117).

A BCL2 onkogenitása régóta ismert, a follikuláris limfómában (FL) előforduló leggyakoribb transzlokáció – t(14;18) – a BCL2 emelkedett expressziójához és az apoptózis elkerüléséhez vezet. A BCL2 overexpressziót kromoszomális transzlokációkon kívül génamplifikáció, illetve a szabályozó miRNS-ek zavara is előidézhetheti. A BCL2 onkogenitását FL-en kívül egyéb hematológiai malignitásokban (például DLBCL, köpenysejtes limfóma, akut mieloid leukémia), valamint szolid daganatokban is leírták(117). CLL-ben a BCL2 overexpresszió gyakori jelenség, és az érett limfociták apoptózisgátlásáért és felhalmozódásáért felelős(1). A folyamat háttérében transzlokációs mechanizmus helyett a 13q14 delécióval együttjáró miR-15 és miR-16 clusterek deléciója és downregulációja áll. Egészséges B-sejtekben ezen miRNS-ek a BCL2-t downregulálják, ezzel szemben a malignusan transzformált B-sejtekben az alacsony miR-15 és miR-16 expresszió a BCL2 overexpressziójához vezet(42). Mivel a BCL2 overexpressziót mutató daganatsejtekben az apoptózis súlyosan károsodott, felvetődött az antiapoptotikus BCL2 gyógyszeres gátlása, illetve a proapoptotikus fehérjék expressziójának növelése, hogy a sejtek az apoptotikus szignálokra érzékenyebbé válhassanak(117).

I.8.2.2.1. A venetoclax

A BCL2 gátlók fejlesztése az 1990-es években kezdődött, az antiszenz oligonukleotid oblimersen viszont csekély hatékonysággal bírt úgy monoterápiában, mind kombinációs kezelés részeként. A fejlesztés következő állomását jelentették az ún.

fordult elő, és a korai vizsgálatokban jellemző tumorlízis-szindróma (TLS) a venetoclax dózis fokozatos beállításának köszönhetően csupán laboratóriumi szintű, de nem klinikai TLS-t jelentett(121, 122). Ibrutinibre refrakter vagy intoleráns betegekben a venetoclax monoterápia 65%-os ORR-t és 23,5 hónapos medián PFS-t biztosított(123). A kedvező eredmények hatására az FDA 2016 áprilisában befogadta a gyógyszert olyan 17p deletált CLL-es betegek kezelésére, akik már legalább egy megelőző kezelési vonalban részesültek, míg az EMA 2017-ben adta meg az engedélyt(117). Kombinációs terápiaik részeként is bizonyította hatásosságát a venetoclax, a fázis III MURANO vizsgálatban R/R CLL-es betegekben a kemoterápiamentes venetoclax-rituximab kombináció 92%-os ORR-t biztosított a standard RB karon tapasztalt 72%-os ORR-rel szemben. Huszonhárom hónapos medián követési idő alatt a RB karon kezelt betegek medián PFS-e 18,1 hónapnak bizonyult, míg a venetoclax-rituximab karon kezelték (ideértve a kedvezőtlen prognózisú 17p deletált eseteket is) nem érték el a medián PFS-t(124). A vizsgálatot követően az FDA megadta az engedélyt a venetoclax-rituximab kombinációs kezelésre R/R CLL-ben(117).

A kedvező eredmények és toxicitási profil ellenére a venetoclax alkalmazása további kérdéseket vet fel, ugyanis az ibrutinibhez hasonlóan a gyógyszer szelekciós nyomására rezisztenciamechanizmusok lépnek fel, amelyek újabb kihívások elé állítják mind a gyógyszerfejlesztést, mind pedig a klinikusokat.

I.8.2.2.1.1. A BCL2 gátlókkal szembeni rezisztencia molekuláris háttere

A CLL-es betegek egy részében a venetoclaxra adott kedvező terápiás választ követően gyógyszerindukált rezisztenciamutáció és klinikai progresszió alakul ki. Venetoclax monoterápia mellett TP53 defektussal bíró betegek felében lépett fel relapszus kétéves kezelési időtartam alatt(125). A relapszus hátterében főképp a *BCL2* rezisztenciamutációi állnak, a leggyakoribb, G101V mutációt 15, venetoclaxkezelés alatt progrediált R/R CLL-es beteg közül heten hordozták. A mutáns fehérje affinitása a szerkezeti változások miatt 180-szor alacsonyabb a venetoclax iránt, és a *BCL2* a gátlás ellenére kifejtheti antiapoptotikus működését(126). A D103Y mutáció a G101V mutációnál ritkábban, és eltérő szubklónként fordul elő(127). Az említetteken kívül a következő mutációkat írták le ibrutinibrezisztenciát követően venetoclax mellett progrediált betegekben, gyakran együttesen előfordulva, zömmel alacsony allélaránnyal: A2T, G101A, F104S, F104L, R107_R110dup, A113G, L119V.

Míg a venetoclax mellett progrediáló CLL-es esetek nagy részében megtalálható *BCL2* mutáció, RT háttérében eddig mindössze egy alkalommal közöltek ilyen mutációt (R107_R110dup)(128). Mivel alacsony allélfrekvenciával az ibrutinibrezisztenciát okozó mutációkhoz hasonlóan a *BCL2* mutációk is kimutathatók már a klinikai relapszust megelőzően, vizsgálatuk a relapszus előrejelzésében és a terápiaváltás mérlegelésében, előkészítésében nagy jelentőséggel bír(129, 130).

A rezisztenciamutációkon kívül ritkábban a proapoptotikus BCL-X_L overexpressziója, valamint MCL1 amplifikáció, illetve *CDKN2A/B* deléció és *BTG* mutáció is előfordulhat a szerzett venetoclax-rezisztencia háttérében CLL-ben(129).

I.9. Richter-transzformáció (RT) CLL-ben

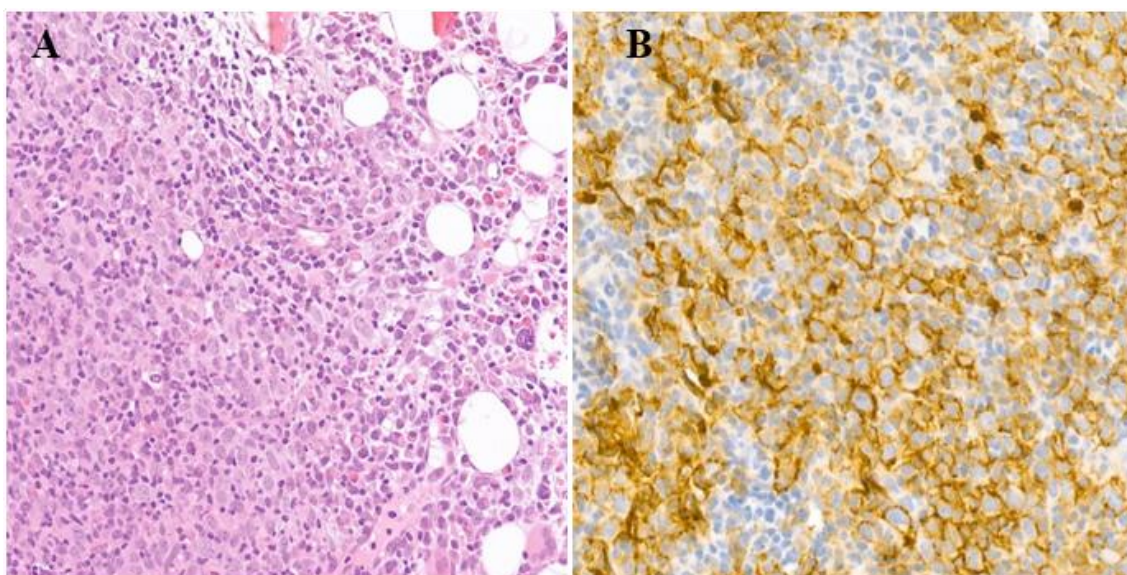
A Richter-szindróma (RS) tágabb értelemben minden low-grade limfóma high-grade, nagysejtes transzformációját jelenti, dolgozatunkban az elnevezést specifikusan a CLL/SLL-t követő, vagy azzal szinkron fellépő RS-ra használjuk(131). Az entitást Maurice N. Richter írta le retikuláris sejtes szarkómaként 1928-ban egy limfoid leukémiás beteg rövid idő alatt halálhoz vezető nyirokcsomó-, máj-, és lépmeagnagyobbodásának háttérében(132), az ő tiszteletére javasolták a RS elnevezést 1964-ben(133). Noha a CLL progressziója során csupán az esetek kis hányadában következik be RT, a kórkép diagnosztikája és kezelése is nagy kihívásokkal jár. Az innovatív, célzott terápiák mellett kialakuló RT eltérő morfológiai, genetikai és terápiás jellemzőkkel bírhat, ezért is különösen indokolt dolgozatunk témaválasztása.

I.9.1. A RT morfológiai sajátosságai

A CLL-es betegek 2-5%-a transzformál az igen agresszív klinikai lefolyást mutató RS-ba, évente 0,5-1%-os incidenciával(134, 135). Morfológiailag a RS két fő típusa különíthető el, a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) teszi ki az esetek 80-90%-át, míg a fennmaradó esetek háttérében klasszikus Hodgkin-limfóma figyelhető meg(131). Ritka típusként előfordulhat plazmablasztos limfóma (PBL), limfoblasztos limfóma, hisztiocitás szarkóma, vagy interdigitáló dendritikus sejtes szarkóma(136), ezért a szövettani vizsgálat is elengedhetetlen a diagnózis felállításához.

A DLBCL típusú transzformációt széles mezőkbe rendeződő, CD19+/CD20+/CD22+/PAX5+ neoplasztikus B-sejtek alkotják, amelyek a CLL-sejteknél lényegesen nagyobbak, fellazult kromatinszerkezettel és prominens

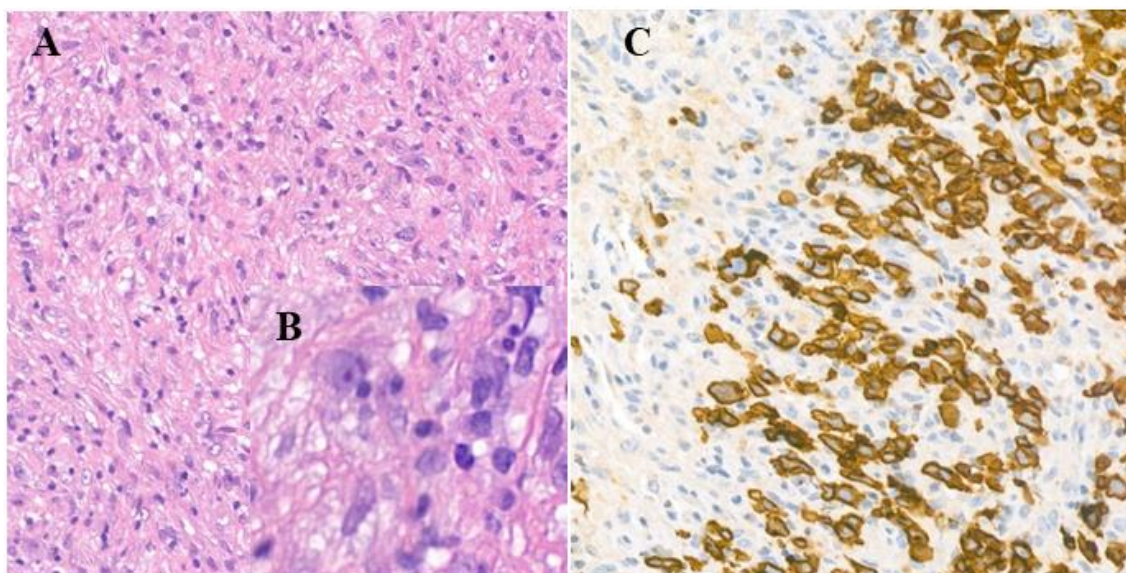
sejtmagvacskával rendelkeznek, és nyirokcsomóban megjelenve az eredeti struktúrát elmoossák. A nagysejtek leggyakrabban centroblasztos morfológiájúak, mitotikus alakok, apoptotikus testek, csillagos égbolt mintázat és koagulációs nekrozis gyakran előfordul a szöveti képben. A megelőző CLL-re jellemző CD5 és CD23 pozitivitás a nagysejteken 30, illetve 15%-ban van jelen(137, 138). Az esetek 90-95%-a non-centrum germinativum fenotípusú, amelyet a MUM1/IRF4 pozitivitás jelez(45, 138, 139). A p53 overexpresszió és a 70% feletti Ki67 proliferációs index gyakran jellemzi az RS-DLBCL-t(137) (9. ábra).



9. ábra. A DLBCL típusú RS morfológiája. A csontvelőben elhelyezkedő gócos limfoid infiltrátumok nagy, hólyagos magvú, centroblast karakterű CD20+ sejtekből, valamint az eredeti CLL kis, érett limfocitáiból állnak (A, hematoxilin-eozin, 20x; B, CD20, 20x).

A cHL típusú transzformáció két, morfológia és immunfenotípus szempontjából különböző alcsoportra oszlik. Az 1-es típusban a CD30+/CD15+/CD20- Hodgkin- és Sternberg-Reed-sejtek Hodgkin-limfómára jellemző kevertsejtes háttérben található meg, amelyet T-sejtek, hisztiociták, eozinofil granulociták és plazmasejtek alkotnak (10. ábra). A 2-es típusú variáns daganatsejtjei CD30+/CD20+/CD15- immunfenotípusúak és kis CLL-sejtes háttérben helyezkednek el(140, 141). A Sternberg-Reed-sejtek eredete kérdéses, *IGH* szekvenciaanalízis segítségével egyes szerzők a CLL-sejtekkel való azonos klonális eredetet mutattak ki(142, 143), míg mások ezt az elméletet elvetve a fludarabin, illetve az EBV-pozitivitás szerepét valószínűsítik(144). A morfológiailag

eltérő két alcsoport szintén utalhat a Sternberg-Reed-sejtek eredetére, eszerint a CLL-sejtes háttérben megjelenve valódi hisztológiai transzformáció áll fenn, ezt erősíti a B-sejtes markerek gyakori expressziója is. Ezzel szemben a polimorf, gyulladással háttérben megjelenő, a CLL-es háttértől elkülönülten mutakozó tumorsejtek eltérő klonális eredetet bizonyíthatnak(142). A cHL-be transzformált esetek többsége kevertsejtes (44%) vagy noduláris szklerózis (27%) altípusba tartozik, és kétharmadukban mutatható ki EBV pozitívitas(140).



10. ábra. A klasszikus HL típusú RS morfológiája. A nyirokcsomó alapszerkezete elmosódott. Fibrotikus, reaktív háttérben számos atípusos nagysejt látható eozinofil magvacskával, laza kromatinszerkezettel, elvétve többmagvú sejtek is előfordulnak (A, hematoxilin-eozin, 20x és B, hematoxilin-eozin, 60x). A nagysejtek intenzív CD30 pozitívítást mutatnak (C, CD30, 20x).

A PBL egy ritka, különösen agresszív B-sejtes malignitás, amely legtöbbször extranodálisan jelentkezik, immundeficienciával, illetve EBV-fertőzéssel társultan, és csupán néhány hónapos túléléssel jár(145). A daganatsejtek CD38, CD138, BLIMP1, MUM1/IRF4 és XBP1 markereket expresszálnak, kappa vagy lambda immunoglobulin könnyűlánc restrikció, valamint CD5, CD20 és PAX5 negativitás mellett(137).

I.9.2. A RT genetikai háttere

A CLL genetikai hátteréről alkotott ismereteink, valamint a terápiás eszköztár bővülésével egyre fontosabbá válik a CLL progressziójához, valamint transzformációjához vezető kockázati tényezők feltárása. A nem mutált *IGHV* gén jelenlétében 4x gyakrabban alakul ki RT, amelyet tovább fokoz, ha *IGHV4-39* gént hordoz a beteg önmagában, vagy subset #8 sztereotip BCR részeként(139). A sztereotip BCR-t hordozó betegek 3,3x rizikóval rendelkeznek RT tekintetében. Azon betegek, akik ezen belül a subset #8 alcsoportba tartoznak, öt éven belül 70%-os eséllyel esnek át RT-n(139). A jelenség oka, hogy a subset #8 a többi sztereotip BCR-hez képest rendkívül reaktív a mikro környezet antigénstimulusaival szemben, és az agresszívan növekvő klónok gyors szelekciójához vezet(86, 146). Az RS legfontosabb prognosztikai tényezője a klonális kapcsolttság, amely a megelőző CLL, valamint az RS stádium *IGHV-D-J* génátrendeződésének vizsgálatán alapul. Amennyiben az RS ugyanazon *IGHV-D-J* géneket hordozza, mint a megelőző CLL, bizonyítékot jelent a klonális kapcsolttságra, és valódi transzformációt jelent a klonálisan nem kapcsolt, CLL-től független módon kialakuló high-grade limfómával szemben(147). Utóbbi entitást a klonális összefüggés hiánya ellenére gyakran klonálisan nem kapcsolt RT-nek nevezik.

Bizonyos öröklődő SNP-k mérsékelt kockázatot jelentenek RS kialakulására, pontosan nem ismert mechanizmusok révén (*BCL2* rs4987852, *Fcd38* rs6449182 és *LRP4* rs2306029)(148-150). *NOTCH1* mutáció jelenlétében tízszeres a RT kockázata a vad típusú *NOTCH1* gént hordozókéhoz képest(151-153). TP53 defektus (*TP53* mutációk és/vagy 17p deléció) az RS esetek 60%-ában fordul elő, többnyire a RT idején akvirált, közvetlenül a transzformációhoz vezető molekuláris eltérésként, és agresszív klinikai lefolyáshoz, valamint kemorefrakteritáshoz vezet(45). A *MYC* és *CDKN2A* géneket érintő abnormalitások deregulációhoz vezetnek és szintén a RT idején jelennek meg a tumorsejtben(45, 154-156).

Annak ellenére, hogy a DLBCL típusú RS morfológiailag jelentős hasonlóságokat mutat a *de novo* DLBCL-lel, patogenezisükben markáns eltérések figyelhetők meg. Míg ez utóbbi entitásban nagyon gyakoriak a *CREBBP/EP300* hiszton-acetiltranszferáz gének, vagy a *B2M* inaktíváló mutációi, illetve a *BCL2* vagy *BCL6* géneket érintő transzlokációk(155), az RS-DLBCL mutációs mintázata az egyéb indolens limfómák transzformációjához hasonlít, a *TP53*, *NOTCH1*, *MYC* és *CDKN2A* gének érintettségével. Továbbá, a RS-DLBCL és a *de novo* DLBCL metilációs profilja

is jelentős eltéréseket mutat, amely az epigenetikai rendszerek különbözőségével tovább erősíti a két entitás eltérő patogenetikai hátterét(157). Két tanulmányban az RT három, egymástól jól elkülönülő genetikai mintázatát azonosították, amelyek eltérnek a CLL, valamint a *de novo* DLBCL mutációs mintázatától(154, 155). A betegek felében megtalálható TP53 defektus, *CDKN2A* veszteség, vagy *c-myc* aktiváció. Ezen esetek magas, 70% feletti Ki67 proliferációs indexszel bírnak, és teljes túlélésük kedvezőtlenebb, mint a TP53 vagy *CDKN2A* aberrációt nem hordozóké. A *CDKN2A* tumorszuppresszor gén elvesztéséhez a 9p21 kromoszómarégió deléciója vezet, és gyakran együttesen fordul elő TP53 defektussal, vagy *c-myc* aktivációval. Második mintázatként, a betegek 30%-a hordoz 12-es triszómiát és/vagy *NOTCH1* aktiváló mutációt, ezen esetekben TP53/*CDKN2A* aberráció nem jellemző. A harmadik mintázatra heterogén genetikai összetétel jellemző(154, 155). A fentiek alapján, az RS patogenezisében a sejtciklus-szabályozás zavara (*CDKN2A*, *c-myc*), valamint a DNS-károsodásra adott válasz zavara (*TP53*, *CDKN2A*) játszik elsősorban szerepet, a BCR jelátvitel zavarát nem valószínűsítik a transzformáció folyamatában.

A transzformáció hátterében miRNS-mediált mechanizmus szerepét is leírták. A miR-21, miR-146b és miR-181b overexpressziójával, valamint a miR-150 downregulációjával jellemezhető mintázat CLL transzformáció nélküli progressziója során nem fordul elő, viszont RT során megjelenik(158). Az azonosított miRNS-ek célpontjai között számos, a daganatképződésben, immunitásban és gyulladással kapcsolatos válaszreakcióban érintett komponens szerepel, így felvetődik anti-miRNS terápia célpontjaként való vizsgálatuk a nagy terápiás kihívást jelentő RS-ben(159).

I.9.3. A RT klinikai jellegzetességei és terápiája

Általános vélekedés szerint az RT a CLL késői szövődménye, ezzel szemben a DLBCL-RS medián 1,8-1,9 évvel a CLL diagnózist követően alakul ki(134, 160), míg a HL-RS medián 4-5 év elteltével jelentkezik(140, 141). Továbbá, a RS az esetek 47%-ában azelőtt alakul ki, mielőtt a beteg CLL-specifikus kezelésben részesült volna(161). A korábban említett genetikai rizikófaktorokon túl néhány klinikai tényező is hajlamosít a RS kialakulására, így az előrehaladott Rai-stádium, a 3 cm-nél nagyobb nyirokcsomók, az emelkedett β 2-mikroglobulin, valamint emelkedett laktát-dehidrogenáz-(LDH)-szint(134, 160).

A RT gyanúját rövid idő alatt progrediáló nyirokcsomó-megnagyobbodás, B-tünetek (láz, fogyás, éjszakai izzadás) fellépte és markáns LDH-emelkedés veti fel. Extranodális RS is előfordul az esetek egy részében, amely leggyakrabban a gasztrointesztinális traktust, a központi idegrendszert, a tüdőt, a vesét és a bőrt érinti. Mivel a progrediáló CLL és az RT klinikailag nem különíthető el minden esetben egymástól, a diagnózist szövettani vizsgálat alapján szükséges felállítani(162). A pozitron-emissziós tomográfia/computertomográfia (PET/CT) a szövettani vizsgálatot megelőzően az RS gyanúját erősíti, illetve meghatározza az érintett anatómiai lokalizációt, amelynek a mintavételezése szükséges. Amennyiben a standard felvételi érték („standard uptake value”, SUV) meghaladja a 10-et, az RS diagnózisa valószínű 91%-os szenzitivitással és 95%-os specificitással. Ezen SUV érték mentén kettéosztva a betegeket, az ezt meghaladó esetekben medián 6,9 hónap a teljes túlélés, míg a 10 alatti érték 56,9 hónapos teljes túlélést vetít előre(163).

A RS esetek rizikóbecslése többféle módszerrel lehetséges, a 2006-ban a MD Anderson Cancer Center által kidolgozott Richter-score öt tényező alapján határozza meg a prognózist (ECOG teljesítménystátusz, LDH-szint, trombocitaszám, tumorméret, megelőző terápiák száma)(164). A Rossi és *mtsai.* által módosított skála a teljesítménystátusz mellett a TP53 státuszt, valamint az indukciós terápiára adott választ is figyelembe veszi. A genetikai háttér figyelembe vétele miatt precízebb rizikóbecslést tesz lehetővé, de mivel a terápiás választ is magában foglalja, így a diagnózis pillanatában nem használható. A Rossi-féle skála alapján a magas, valamint intermediér rizikójú betegek 8 és 24 hónapos medián túlélésre számíthatnak, míg az alacsony kockázatú csoport ötéves túlélése 70%(45). A kockázati csoportokon túl, a klonális kapcsoltság megléte vagy hiánya nagyban befolyásolja a terápiás választ és a betegség kimenetelét. A klonálisan nem kapcsolt RS a *de novo* DLBCL-hez hasonló túléléssel bír, és annak hagyományos immunkemoterápiás kezelési protokolljára megfelelően reagálnak a betegek. Ezzel szemben a klonálisan kapcsolt (valódi) RS esetek igen kedvezőtlen terápiás választ adnak, és a tartós remisszió csak allogén hemopoetikus őssejt-átültetés, vagy innovatív, célzott gyógyszerek alkalmazásával képzelhető el(161). A DLBCL-RS-ben hagyományos, antraciklin- vagy platinabázisú kemoterápiák alkalmazásával 40%-os teljes válaszadási arány, és csupán 5-15%-os komplett remisszió érhető el(164, 165), amely hagyományos, vagy új típusú anti-CD20 ágensek (rituximab, ofatumumab) hozzáadásával sem vált kedvezőbbé(161), ezért különösen sürgető az innovatív, célzott szerek használata. A HL-RS standard terápiája a *de novo* HL-ban alkalmazott adriamycin-bleomycin-vinblastin-dacarbazin (ABVD)

protokoll, CD20 pozitívitás esetén rituximab hozzáadásával. A betegek medián túlélése 37,8 hónap, amely elmarad a *de novo* HL túlélésétől, de kedvezőbb, mint a DLBCL-RS túlélése(140, 166). Az anti-CD30 brentuximab vedotin előnyeiről kevés adat áll rendelkezésre HL-RS-ben, de előrehaladott stádiumú *de novo* HL-ben szerzett tapasztalatok alapján javíthatja a kimenetelt(167).

Az indukciós terápiára kedvezően reagáló RS eseteknél megfontolandó a transzplantációval történő konszolidációs kezelés, bár az életkor, társbetegségek és a kedvezőtlen terápiás válasz miatt a betegeknek csak a töredéke alkalmas rá(164). Amennyiben a beteg mély remissziót ér el az indukciós kemoterápia során, az allogén HSCT kedvezőbb túlélési esélyt nyújt. Ötvenkilenc, autológ vagy allogén HSCT-n átesett beteg vizsgálata során az előbbi csoport 59%-os, míg az utóbbi 36%-os 3 éves teljes túlélést mutatott, bár az RS és a megelőző CLL közötti klonális viszonyt nem vették figyelembe(168).

Az innovatív, kismolekulájú gyógyszerek közül a BTK-inhibitor ibrutinib relabáló/refrakter CLL-ben, valamint a non-centrum germinativum (non-GC) altípusú DLBCL-ben is jelentős terápiás sikereket hozott(169, 170), így RS-ben is nagy reményekkel kecsegtetett az alkalmazása. Kiszámú betegen, több esettanulmányban vizsgálták az ibrutinib hatékonyságát. Noha rövid ideig tartó komplett remisszió is elérhetővé vált, jellemzően parciális remissziót követően néhány hónapon belül CLL vagy DLBCL progressziója következett be(171-173). Acalabrutinib monoterápiával kezelt 29 beteg közül 3-an értek el komplett remissziót, a választ (komplett vagy parciális remissziót) mutató betegek medián 5,7 hónapig reagáltak a terápiára(174). A proapoptotikus BH3-mimetikum venetoclax egy fázis I tanulmányban 3/7 RS betegen hozott létre parciális remissziót, viszont a *de novo* DLBCL esetekkel együtt vizsgálva őket csupán 1 hónapos medián progressziómentes túlélést biztosított(175). Több klinikai vizsgálat is zajlik jelenleg, a CRC043 fázis II vizsgálat (NCT03054896) a venetoclax és a rituximab – dózisadaptált etopozid, prednizolon, vinkrisztin, ciklofoszfamid, doxorubicin (R-DA-EPOCH) kombinációját vizsgálja RS-ben.

I.9.4. A célzott terápiák talaján kialakuló RT

A CLL, valamint a RS genetikai heterogenitását alátámasztva, míg egyes RS betegek remisszióba kerülnek célzott terápiák hatására, más esetekben éppen az innovatív ágensek indukálják a CLL transzformációját(176). Egy 2015-ös tanulmányban 20 hónapos követési idő (intervallum: 2-47 hónap) alatt az ibrutinibkezelte CLL-es betegek 10%-a progrediált (31/308), ezen esetek közül 18-an transzformáltak RS-be. A RT esetek háromnegyede DLBCL fenotípust mutatott, 1-1 esetben alakult ki HL, PBL, kompozit B- és T-sejtes limfóma, valamint perifériás T-sejtes limfóma. Az ibrutinibkezelés hatására korábban következett be a RT, mint a CLL progressziója, 12 hónapos kezelési időtartam alatt a RT becsült kumulatív incidenciája 4,5%-nak, míg a progresszióé 0,3%-nak adódott(169). A kis esetszámok miatt a RT és a CLL progresszió rizikófaktoraikat együttesen vizsgálva, a *BCL6* aberrációk, valamint a komplex kariotípus bizonyult a progresszió független kockázati tényezőjének, míg az ibrutinibkezelés kezdetén mért emelkedett LDH-szint kizárólag az RT-vel mutatott összefüggést, a progresszióval nem. Az RT-n átesett betegek medián túlélése 3,5 hónapnak (intervallum: 10 nap – 6 hónap) bizonyult a változatos immunkemoterápiás protokollok, illetve célzott terápiák alkalmazása ellenére. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy egyik beteg sem részesült BCL2-gátló terápiában az ibrutinibkezelés kudarcát követően. Továbbá, míg a progresszió idején vett minták mindegyikében azonosítható volt IonTorrent nagy mélységű szekvenálással az ibrutinibrezisztenciáért felelős *BTK* és/vagy *PLCG2* mutáció, a vizsgált nyolc RT eset közül mindössze két esetben detektáltak ilyen mutációkat. Ezen betegek a RT mellett is egyre romló, CLL fenotípusú limfocitózist mutattak, tehát elképzelhető, hogy a RT mellett CLL progresszió is fennállt az esetükben, és ehhez asszociáltnak jelentkeztek a rezisztenciamutációk(169).

Maddocks és *mtsai.* eredményeivel szemben, egy másik munkacsoport a vizsgált hat, ibrutinibkezelés alatt transzformált beteg felében (3/6) azonosított *BTK* mutációt a RT mintában. Egy esetben a progresszív CLL-ben azonosított *BTK* T316A mutáció a RT mintában nem volt detektálható. Hasonló jelenséget tapasztaltak más genetikai eltérések vizsgálata során is, 5/6 esetben a relabáló beteg keringő CLL-sejtjeiben kimutatott aberrációk egy része, például a 12-es triszómia, nem volt detektálható az RS mintában. Ez alapján feltételezhető, hogy a rátermettebb CLL klón mutat RS irányú klonális evolúciót és transzformációt a kevésbé rátermett klónokkal szemben(177).

Egy ausztrál munkacsoport 2017-es tanulmányában a BCL2-gátló venetoclax talaján kialakult progresszió klinikopatológiai jellemzőit vizsgálta,

kemoimmunoterápiával többszörösen előkezelt, ám BTK-gátló kezelésben nem részesült betegek körében(178). Huszonhárom hónapos követési idő (intervallum: 2-46 hónap) alatt 25/67 beteg mutatott progressziót, amely 17 esetben RT-t, 8 esetben progresszív CLL-t jelentett. A transzformáció, az ibrutinibbel kezelt esetekhez hasonlóan, sokkal korábban következett be (medián 7,9 hónap), mint a CLL progressziója (medián 23,4 hónap). A RT esetek 82%-a mutatott DLBCL, 18%-uk pedig HL fenotípust. A RT esetek 47%-a hordozott komplex kariotípust, akár a CLL fázisban, akár az RT idején akviráltan. Általánosságban a RT kockázati tényezője a TP53 defektus jelenléte(45). A venetoclax-kezelt betegek progresszióját és a RT-t együttesen vizsgálva, a fludarabin-refrakteritás és a komplex kariotípus progresszív betegség kialakulására hajlamosít, míg a TP53 defektus nem. A betegek medián túlélése a progressziót vagy RT-t követően 13 hónapnak (<1-49,9 hónap) bizonyult, a BTK inhibitorral korábban nem kezelt betegekben kedvező hatás érhető el ibrutinib alkalmazásával(178).

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az ibrutinib hatására végbemenő szubklonális evolúció vizsgálata saját tervezésű génpanellel CLL-es betegekben.
2. Az ibrutinibrezisztencia hátterében álló molekuláris mechanizmusok feltárása.
3. Az ibrutinibrezisztencia kialakulását előrejelző, érzékeny vizsgálati módszer beállítása.
4. Az ibrutinib- vagy venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának morfológiai és genetikai vizsgálata, a két entitás közötti klonális kapcsoltság feltárása.
5. Az ibrutinib- vagy venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának morfológiai és genetikai vizsgálata, a két entitás közötti klonális kapcsoltság feltárása.
6. Térbeli heterogenitás szerepének vizsgálata ibrutinibkezelt CLL rezisztenciájában és progressziójában.

III. MÓDSZEREK

III.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata

III.1.1. Beteganyag

Az ibrutinib hatására végbemenő klonális evolúció vizsgálatához 20 beteg (8 nő és 12 férfi) ibrutinibkezelés előtti és alatti mintáit használtuk fel, a betegek medián életkora 63 év volt (intervallum: 50-85 év). Az ibrutinibkezelést megelőzően a betegek medián 2 (intervallum: 1-5) kezelési vonalban részesültek, részletes klinikai adataik a 2. táblázatban láthatók. A betegek kezdetben egyedi méltányossági kérelem alapján részesültek ibrutinibkezelésben, így hazánkban 2014 júliusa óta érhető el a BTK inhibitor. A vizsgálat idején a húszfős beteganyagunk jelentette a legnagyobb populációt, amely fázis III klinikai vizsgálat keretein kívül részesült ibrutinibterápiában. A kezelést megelőző, valamint ibrutinibkezelés tartama alatt gyűjtött perifériás vérmintákból mononukleáris sejtfrakciót szeparáltunk denzitás alapú gradiens centrifugálással, Histopaque®-1077 (Merck, Darmstadt, Németország) alkalmazásával. Az ibrutinibkezelés időtartama betegenként eltérő volt, az egyéni mintavételi időpontok a 20. ábrán láthatók. A CLL sejtarányt áramlási citometriával határoztuk meg, CD5/CD19/CD23/CD45 immunreakciókkal. A szeparált mononukleáris sejtfrakcióból DNS-t izoláltunk High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Svájc) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A keringő sejtmentes DNS („circulating cell-free DNA”, ccfDNA) izolálása QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával történt, PAXgene Blood ccfDNA Tubes (Qiagen) mintavételi csövekbe levett perifériás vérmintából. Az *IGHV* gén mutációs státuszát a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) ajánlásai alapján határoztuk meg(62), míg a CLL-ben gyakran előforduló citogenetikai aberrációk (13q, 11q és 17p deléción, valamint 12-es triszómia) vizsgálatát interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációval (iFISH) végeztük, Vysis próbák alkalmazásával (Abbott Molecular, Lake Bluff, Illinois, Egyesült Államok). Negatív kontrollként öt egészséges önkéntes perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből izolált DNS-t használtunk. Az ibrutinib-indukált klonális evolúció, valamint a célzott terápiaik talaján kialakuló RT kutatását is a résztvevő betegek írásos, tájékozott beleegyezését követően, a Helsinki Nyilatkozattal összhangban, a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság etikai engedélyei (45371-2/2016/EKU és 14383-2/2017/EKU) birtokában végeztük (2. táblázat).

2. táblázat. A betegcsoport főbb klinikai és biológiai jellemzői.

Beteg	Diagnóziskori életkor (év)	Nem	Megelőző terápiás vonalak	Pre-ibrutinib FISH citogenetika	IGHV (M/U)	Megelőző terápiás vonalak száma	TTFT (hónap)	Diagnózistól az ibrutinibkezelésig eltelt idő (hónap)	Ibrutinibkezelés időtartama (hónap)	Az NGS analízist követő addicionális követési idő (hónap)
1	60	N	FC, ofatumumab, RFC, R-CHOP, RB	12+/IgHdel	U	5	48	126	34	6
2	65	F	RFC, R-CVP, RB	17p-/13q-	U	3	60	115	24	2
3	64	F	FC, alemtuzumab, allo-SCT	11q-/13q-	U	2	13	117	18	28
4	58	N	RFC, RB	11q-/6q-/13q-	M	2	3	39	12	28
5	63	F	FC, R-CVP, RFC, RB	normál	U	4	6	103	32	12
6	85	F	FC, RB, R-CVP, HDMP+R+RM	13q-	M	4	51	119	29	0
7	48	F	RFC	11q-/13q-	U	1	36	58	27	13
8	50	N	RFC, RB	13q-/17p-	U	2	72	149	8	28
9	63	N	RFC, R-CHOP, R-CNOP	12+	U	3	10	67	3	0
10	51	F	RFC, R-CVP, RB	13q-	U	3	1	41	21	0
11	65	N	CVP, R-CVP, RB	12+	U	3	6	96	24	13
12	63	F	RFC, R-CVP, RB	13q-	U	3	50	99	26	12
13	69	N	Chl, Cyc, RB	17p-/12+	U	2	15	86	8	27
14	66	N	RFC, R-Chl	normál	U	2	20	53	28	13
15	63	F	FCM, RB	12+	U	2	36	137	24	15
16	51	F	FC, RB	13q-	U	2	0,5	82	30	13
17	73	N	RFC, RB, R-Chl, R-CVP, R-CHOP	17p-/12+	M	5	19	75	18	0
18	65	F	RFC, RB	17p-	U	2	0	19	3	29
19	64	F	RFC, HDMP	17p-	U	2	34	36	8	0
20	56	F	RFC	17p-/13q-	U	1	83	132	17	15

III.1.2. Új generációs szekvenálás

A CLL esetek legalább 2%-ában mutációt hordozó harminc gén(65-67, 84, 179) (*ATM, BCOR, BIRC3, BRAF, BTK, CHD2, DDX3X, EGR2, EIF2A, EP300, FBXW7, HIST1H1E, IGLL5, KLHL6, KMT2D, LRP1B, MED12, MGA, MYD88, NFKBIE, NOTCH1, PLCG2, POT1, RIPK1, RPS15, SAMHD1, SF3B1, TP53, XPO1* és *ZMYM3*) releváns régióinak ultramély, célzott újraszekvenálását egyedi tervezésű génpanel segítségével végeztük, TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit (Illumina, San Diego, Kalifornia, Egyesült Államok) könyvtárkészítő reagenssel (3. táblázat).

3. táblázat. Az új generációs szekvenálás során vizsgált gének és régióik.

Gén	Vizsgált régió	Transzkriptum (Ensembl)
<i>ATM</i>	teljes kódoló régió	ENST00000278616
<i>BCOR</i>	4, 8-10, 12, 13 exonok	ENST00000378444
<i>BIRC3</i>	2, 6-9 exonok	ENST00000615299
<i>BRAF</i>	11-15 exonok	ENST00000288602
<i>BTK</i>	teljes kódoló régió	ENST00000308731
<i>CHD2</i>	2-3, 8, 10, 13, 16, 17, 20-21, 25-27, 29-32, 35, 36 exonok	ENST00000394196
<i>DDX3X</i>	2, 3, 6, 7, 9-13 exonok	ENST00000399959
<i>EGR2</i>	1, 2 exonok	ENST00000242480
<i>EIF2A</i>	exon 10	ENST00000460851
<i>EP300</i>	20, 28 exonok	ENST00000263253
<i>FBXW7</i>	5, 7, 9, 10, 11 exonok	ENST00000281708
<i>HIST1H1E</i>	exon 1	ENST00000304218
<i>IGLL5</i>	teljes kódoló régió	ENST00000532223
<i>KLHL6</i>	1, 2 exonok	ENST00000341319
<i>KMT2D</i>	exon 39	ENST00000301067
<i>LRP1B</i>	7, 13, 32, 41 exonok	ENST00000389484
<i>MED12</i>	1, 2, 21 exonok	ENST00000374080
<i>MGA</i>	2, 3, 8, 11, 13, 15 exonok	ENST00000219905
<i>MYD88</i>	teljes kódoló régió	ENST00000396334
<i>NFKBIE</i>	1, 2 exonok	ENST00000275015
<i>NOTCH1</i>	2, 4, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 21, 22, 26, 31, 34 exonok	ENST00000277541
<i>PLCG2</i>	teljes kódoló régió	ENST00000564138
<i>POT1</i>	5-10, 18 exonok	ENST00000357628
<i>RIPK1</i>	8, 10 exonok	ENST00000380409
<i>RPS15</i>	teljes kódoló régió	ENST00000592588
<i>SAMHD1</i>	2-4, 6-13 exonok	ENST00000262878
<i>SF3B1</i>	14-18 exonok	ENST00000335508
<i>TP53</i>	teljes kódoló régió	ENST00000269305
<i>XPO1</i>	2, 16, 20 exonok	ENST00000401558
<i>ZMYM3</i>	6, 15, 16, 20, 23, 24 exonok	ENST00000314425

A DNS-minták koncentrációjának fluorimetriás meghatározását Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) készüléssel és reagensekkel végeztük a gyártó utasításai szerint, majd 80 ng DNS-templátot mértünk be az egyes reakciókba. A target régiókra specifikus forward és reverz oligonukleotidok hibridizációját követően, mágnesgyöngyös tisztítással eltávolítottuk a be nem kötődött oligonukleotidokat. Következő lépésként extenziót és ligációt végeztünk a bekötődött oligonukleotidok által kijelölt releváns génszakaszokon, DNS-polimerázt és DNS-ligázt tartalmazó reakcióban, amelyet az egyes minták egyedi azonosítását szolgáló, néhány bázispáros adapter szekvenciák jelenlétében végzett amplifikáció követett. Újbóli mágnesgyöngyös tisztítást követően a könyvtárak minőségét 4200 TapeStation (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) automata kapilláris elektroforetikus rendszerrel ellenőriztük, majd ekvimoláris poolozást követően HiSeq 4000, valamint MiSeq (Illumina) készülékekkel végeztük a 150 bp paired-end szekvenálást. A nyert variáns allélfrekvencia (VAF) adatokat az áramlási citometria során nyert CLL sejtarányra normalizáltuk. Az NGS analízis idején a betegek 22,5 hónap medián követési idővel (intervallum: 3-34 hónap) rendelkeztek.

III.1.3. Bioinformatikai analízis

A szekvenálás során nyert readeket a BaseSpace Sequence Hub (Illumina) BWA v0.7.13 szoftverével illesztettük a referenciagenomhoz (*Homo sapiens* GRCh37). A BAM kimeneti fájlok válogatását és indexálását a SAMtools v1.7 és a GATK v4.0 programokkal végeztünk, a szisztematikus szekvenálási hibák felismerése és javítása céljából pedig a GATK Base Quality Score Recalibration-t alkalmaztuk. Az egy pontos nukleotid variánsok („single nucleotide variant”, SNV), valamint inzerciók és deléciók (együttvéve: indélék) detektálása (ún. variánshívás) a LoFreq v2.1 programmal történt. A variánsok funkcionális jelentőségének meghatározása az SnpEff v4.3i, valamint az ANNOVAR v2017Jul17 programokkal történt, az utóbbi szoftver naprakész információkat szolgáltatott az azonosított mutációk klinikai jelentőségéről a COSMIC, avSNP és CLINVAR adatbázisokban történő keresés révén. A *TP53* gén kódoló és splice site mutációinak annotálását a TP53-specifikus Seshat és IARC adatbázisokkal végeztük. A nyers szekvenálási adatok megtalálhatók a European Nucleotide Archive adatbázisában (<https://www.ebi.ac.uk/ena>, Primary Accession: PRJEB32120, Secondary Accession: ERP114759).

III.1.4. Az azonosított szomatikus mutációk validálása

A 20%-ot elérő, vagy meghaladó variáns allélfrekvenciával (VAF) azonosított mutációk mindegyikét sikeresen validáltuk kétirányú Sanger szekvenálással. A validálás első lépéseként az azonosított mutációt tartalmazó génszakaszt amplifikáltuk AmpliTaqGold™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) DNS-polimerázt tartalmazó PCR mixszel és a Primer3Plus online tervezővel (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) tervezett primerekkel (4. táblázat).

4. táblázat. A Sanger szekvenáláshoz használt primerek szekvenciái.

Gén	cDNS pozíció	Forward primer	Reverz primer
<i>ATM</i>	c.6067G>A	TTGTTGTTTCCATGTTTTTCAGG	GCTTTGGGTTTTACACACACAT
<i>ATM</i>	c.7177T>G	AATTTGTGTTGGGCCACATT	AAAGACCAAGTCACTCTTTCTATGC
<i>ATM</i>	c.8187A>T	GAGGTGCACAGATGCTCAGA	CCACTTCACCCAACCAAATG
<i>BRAF</i>	c.1801A>G	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG	AGTAACTCAGCAGCATCTCAGG
<i>BTK</i>	c.1442G>C	CCCAGCCCCCTTTATTGCTA	AAATTGAAATGATGGCACCAG
<i>CHD2</i>	c.3349A>G	TTGCCTCGATCTTTCTCAGG	CGCACTTTCAAACAAGCTCA
<i>DDX3X</i>	c.669_670dupTG	ATACTCGCCCAACTCCAGTG	GCAAACTGCATGACCCATA
<i>EGR2</i>	c.1066G>A	CACCACCTCCACCTCTTCCT	TTCGGCCACAGTAGTCACAG
<i>EGR2</i>	c.1150C>A	GCATAAGCCCTTCCAGTGTC	TGCTTTTTCCGCTCTTTCTGT
<i>KMT2D</i>	c.12144_12145insGGGGCCG	TAGACCCAGCCGTTTCTTCA	TTGGACAAGCAGGAGTTGTG
<i>MED12</i>	c.97G>A	CTTTTCGGCTCCCTCTCC	TTCGGGACTTTTGCTCTCAC
<i>NOTCH1</i>	c.7225C>T	GAGTCACCCCATGGCTACCT	GCCACAGTGAAATTCAGG
<i>NOTCH1</i>	c.7516G>T, c.7541_7542delCT	ACAGCTACTCCTCGCCTGTG	TACTTGAAGGCCTCCGGAAT
<i>POT1</i>	c.185T>C	GGTTTGGTGTGTTTGAAGTAAGCA	TGCTAACTAGTTTCAGTGAACAATACA
<i>POT1</i>	c.284G>A	GGTTGTGCATCAGTAAGCTATTTT	TGCTGAAACATAAGCTCTTTACA
<i>SAMHD1</i>	c.1015C>T	GCCAGGTATGCACTGAACACT	TCCTCTGGCACAGCTTACCT
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	TGCTGACAGGCTATGGTTCA	GAGTTGCTGCTTCAGCCAAG
<i>TP53</i>	c.314G>T	TGCTCTTTTCACCCATCTAC	ATACGGCCAGGCATTGAAGT
<i>TP53</i>	c.376-2dupA	TTCAACTCTGTCTCCTTCCT	CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG
<i>TP53</i>	c.742C>T	AGGCGCACTGGCCTCATCTT	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC
<i>TP53</i>	c.803A>T, c.841G>A	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	AGTGTTAGACTGGAACTTT

A PCR mix végtérfogata 25 μ l, a templát DNS mennyisége csövenként 100 ng volt. Az AmpliTaqGold™ kittel (10x PCR puffer, 10 mM dNTP mix, 25 mM MgCl₂, és AmpliTaqGold™ DNA Polymerase, 5 U/ μ l) készített PCR mix összetételét az 5. táblázat, a reakció hőprofilját a 6. táblázat foglalja össze. A reakció 35 cikluson keresztül zajlott a ProFlex™ 3 x 32-well PCR System PCR-készülékben (Thermo Fisher Scientific).

5. táblázat. A PCR mix összetétele.

Komponens	Bemérés
AmpliTaq Gold™	12,5 μ l
Forward primer (10 μ M)	1 μ l
Reverz primer (10 μ M)	1 μ l
PCR grade víz	25 μ l-ig
DNS-templát	100 ng

6. táblázat. A PCR hőprofilja.

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	95 °C	5 perc
Denaturáció	95 °C	30 s
Anelláció	58 °C	30 s
Extenzió	72 °C	30 s
Végső extenzió	72 °C	5 perc

} 35 ciklus

Az amplifikációt követően a PCR-termék jelenlétét agaróz gélelektroforézissel detektáltuk 2 v%-os agaróz gélben (2,6 g agaróz, 125 ml 1x TAE puffer), GelRed™ (Biotium) fluoreszcens jelöléssel. Futtatáshoz a 10x-es TAE törzsoldatból (0,4 M TRIS, 0,2 M ecetsav, 0,01 M EDTA) hígított 1x-es TAE puffert használtuk. A mintákat a gélelektroforézist követően tisztítottuk: a termék mellett szennyezőként jelenlévő, fel nem használt dezoxinukleotid-trifoszfátokat (dNTP) és primereket ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) segítségével távolítottuk el a gyártó utasításai szerint, 37 °C-on 15 percig emésztve a szennyeződések, majd pedig 80 °C-on 15 percig inaktíválva az enzimeket.

A tisztított termék bázissorrendjét kétirányú direkt szekvenálással határoztuk meg Big Dye™ Terminator Kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A reakció 25 cikluson keresztül zajlott a ProFlex™ 3 x 32-well PCR System PCR-készülékben. A reakcióelegy összetétele a 7. táblázatban, a reakció hőprofilja a 8. táblázatban látható.

7. táblázat. A szekvenáló reakció összetétele.

Komponens	Bemérés
BigDye™ Terminator v3.1	0,25 µl
BigDye™ 5X Sequencing Buffer	1,875 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
PCR grade víz	10 µl-ig
Tisztított PCR termék	1 µl

8. táblázat. A szekvenáló reakció hőprofilja.

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	95 °C	2 perc
Denaturáció	95 °C	30 s
Anelláció	51 °C	15 s
Extenzió	60 °C	4 perc

} 25 ciklus

A szekvenálást követően a terméket Performa® Spin Columns (Edge Biosystems, San José, Kalifornia, Egyesült Államok) géloszlopon tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. A tisztított termékhez 10 µl molekuláris biológiai tisztaságú vizet adtunk, majd 20 µl Hi-Di Formamide™-dal (Thermo Fisher Scientific) egészítettük ki az elegyet 40 µl végtérfogatra. A denaturálást 95 °C-on végeztük 3 percen keresztül. A szekvenanciaanalízist ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a kapott szekvenciák kiértékelését Sequencing Analysis SeqA6 (Thermo Fisher Scientific) programmal végeztük.

A *BTK* C481S és *PLCG2* D993H mutációkat az igen szenzitív droplet digitális PCR-rel (ddPCR) validáltuk, 50 ng DNS templátból kiindulva, lókuszszer specifikus mutáns és vad típusú targetekre tervezett fluoreszcens próbákkal (*BTK* C481S – dHsaMDS802598840, *PLCG2* D993H - dHsaMDS815970714), a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció során az amplifikáció elkülönült reakcióterekben, olaj-víz emulziós cseppekben megy végbe, így különösen hatékony amplifikáció válik lehetővé (9. és 10. táblázat). A cseppképzést a QX200 Automated Droplet Generatorral, az amplifikációt a C1000 Touch™ Thermal Cycler készülékkel, míg a reakciót követő leolvasást QX200 Droplet Readerrel végeztük (QX200 ddPCR System, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok).

9. táblázat. A ddPCR mix összetétele.

Komponens	Bemérés
ddPCR Supermix for Probes	11 µl
ddPCR Assay	1 µl
PCR grade víz	22 µl-ig
DNS-templát	100 ng

10. táblázat. A ddPCR hőprofilja.

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	95 °C	10 perc
Denaturáció	94 °C	30 s
Anelláció	55 °C	1 perc
Extenzió	98 °C	10 perc

} 40 ciklus

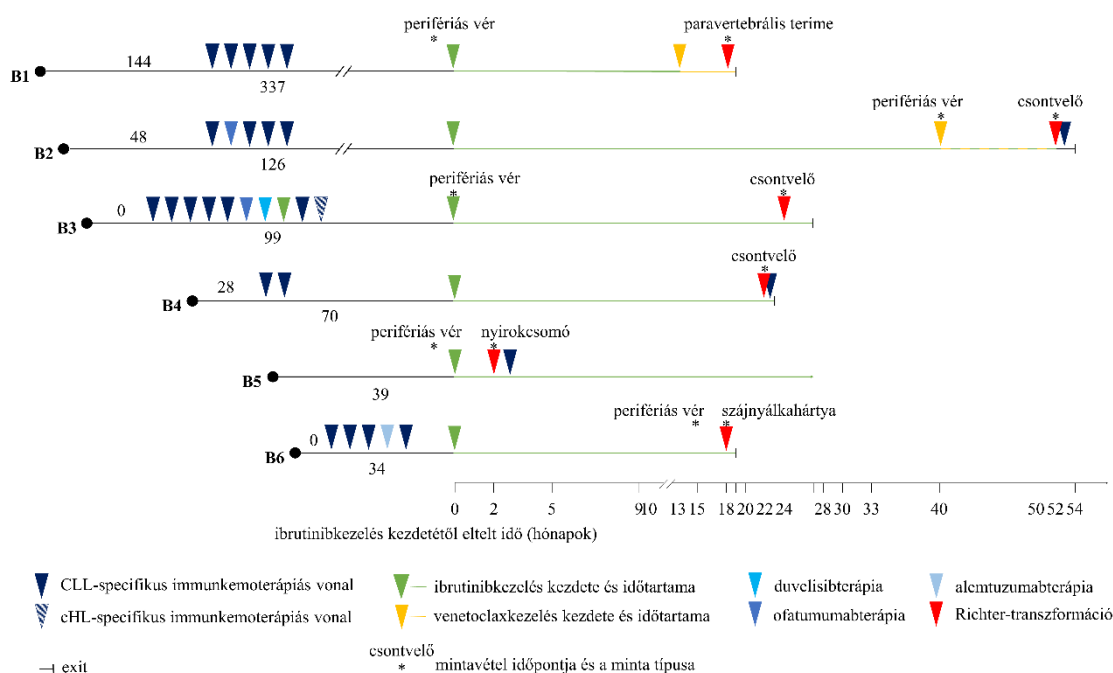
A leolvasást követő értékelés Bio-Rad QuantaSoft szoftverrel történt. A *BTK* és *PLCG2* mutációk VAF-ja a mutáns DNS-molekulát hordozó droplet (a), illetve a mutáns (a) plusz vad típusú (b) DNS-molekulát hordozó droplet hányadosaként számítható ki [$VAF=a/(a+b)$], a módszer átlagos szenzitivitása 0,01%.

III.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata

III.2.1. Beteganyag

Ibrutinib- vagy venetoclaxkezelés alatt Richter-transzformáción átesett hat CLL/SLL-es beteg szekvenciális mintáit vizsgáltuk, egy kivétellel (B4) az összes betegből rendelkezünk CLL és RS mintákkal is. Mivel B4 betegből a CLL diagnózisa idején elvégzett FISH vizsgálaton kívül DNS-tárolás nem történt, így csak az RS minta vizsgálatára nyílt lehetőségünk. A betegpopuláció egy nőből és öt férfiből állt, a medián életkor a CLL diagnózisa idején 58 évnek bizonyult (intervallum: 38-75 év), a medián követési idő 109,5 hónap volt (intervallum: 53-355 hónap). A tanulmányban vizsgált B2 beteg megegyezik a klonális evolúcióval foglalkozó tanulmányunkban szereplő B1 beteggel, a fennmaradó öt beteg a korábbi tanulmányunkban nem szerepel. A RT minden esetben célzott terápia során alakult ki, négy betegnél ibrutinib alatt, egy-egy betegnél pedig venetoclax monoterápia, illetve ibrutinib + venetoclax kombinációs terápia alatt. Az ibrutinibterápia bevezetésétől a RT-ig medián 20 hónap telt el (intervallum: 2-24 hónap), venetoclax esetén ez az időtartam 8,5 hónapnak (intervallum:

5-12 hónap) adódott. A transzformációt követő medián túlélés 1,5 hónapnak bizonyult (intervallum: 0-29 hónap) (11. ábra és 11. táblázat).



11. ábra. A betegcsoport főbb klinikai jellemzőit és a vizsgált mintákat bemutató idővonal. A grafikon bal oldala a CLL diagnózistól az ibrutinibterápia bevezetéséig eltelt időszakot mutatja, az alkalmazott kezelési vonalak feltüntetésével. A vonal feletti számok a diagnózistól az első kezelésig eltelt időt (TTFT), míg a vonal alatti számok a diagnózistól az ibrutinibterápia bevezetéséig eltelt időt mutatják. A B2 beteg a transzformációt megelőzően 12 hónapig részesült párhuzamosan ibrutinib- és venetoclaxterápiában. A tartós ibrutinibterápiát megelőzően a B3 beteg három héten keresztül részesült ibrutinibkezelésben, amely intolerancia miatt felfüggesztésre került, majd a kezelés későbbi szakaszában ismét bevezették. Mivel a B3 betegben a CLL kezelése során klasszikus Hodgkin-limfóma is kialakult, erre specifikus kemoterápiában is részesült.

11. táblázat. A betegcsoport alapvető klinikai jellemzői.

Beteg	Nem	Életkor a diagnózis idején (év)	Életkor a RT idején (év)	A CLL diagnózistól a RT-ig eltelt idő (hónap)	Teljes követési idő (hónap)	A RT-t megelőző terápiás vonalak
B1	F	38	67	355	355	Chl, Flu, R-B, R-B, R-CVP, IBR, VEN-R
B2	N	48	62	178	180	FC, ofa, R-FC, R-CHOP, R-B, IBR, R-IBR-VEN
B3	F	49	59	123	126	FC, R-CHOP, B, B, Chl, ofa, duve, IBR (3 hétig), CHOP, COPP/ABV + irradiáció (cHL kezelésére), IBR
B4	F	67	74	92	93	R-FC, R-B, IBR
B5	F	75	78	41	70	IBR
B6	F	75	79	52	53	R-CVP, CHOP, R, alem, R-B, IBR

III.2.2. Módszerek

A célzott terápiák alkalmazása során bekövetkező Richter-transzformáció morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatát formalin-fixált, paraffinba ágyazott („formalin-fixed, paraffin-embedded”, FFPE) szövetmintákon végeztük. A CLL-minták vizsgálatához a perifériás vérből vagy csontvelő-aspirátumból CD19+ limfocitákat szeparáltunk EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) segítségével. A DNS-izolálás a szeparált CD19+ sejtekből AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen), míg az Richter-transzformált FFPE mintákból QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) segítségével történt. A DNS-koncentráció fluorimetriás meghatározását követően *IGHV-IGHD-IGHJ* szekvenálást és a *TP53* gén új generációs szekvenálását végeztük el. Továbbá, a CLL-ben releváns visszatérő citogenetikai aberrációk és egyes pontmutációk vizsgálatát multiplex ligáció-dependens szondaamplifikációval (“multiplex ligation-dependent probe amplification”, MLPA) végeztük, míg az ibrutinib- és venetoclax-rezisztenciát okozó mutációkat ddPCR eljárással azonosítottuk. Az *IGHV-IGHD-IGHJ* átrendeződést a „European Research Initiative on CLL” (ERIC) ajánlásai alapján határoztuk meg(62), az immunoinformatikai analízist az IMGT V-QUEST és az ARResT/AssignSubsets szoftverekkel végeztük. A *TP53* gén teljes kódoló és splice site régiójának szekvenálásához a SureMASTR TP53 kittel (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok) preparáltunk könyvtárakat, majd MiSeq (Illumina) készüléken szekvenáltunk 10000x átlagos lefedettséggel. A *TP53* variánsok patogenitását a TP53-specifikus Seshat adatbázis alapján (<https://p53.fr/tp53-database/seshat>) határoztuk meg.

Az MLPA eljárás során a SALSA P037 és P038 CLL-specifikus szondakeverékek (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) segítségével vizsgáltuk a CLL-ben leggyakrabban előforduló citogenetikai eltéréseket és klinikailag releváns pontmutációkat. A vizsgált régiók a 12. táblázatban láthatók, csillaggal jelöltük a belső kontrollként szolgáló referenciaszondákat. A reakció során 50 ng DNS-templátból indultunk ki, majd a DNS-t PCR-készülékben denaturáltuk és a CLL-specifikus szondákat a DNS-hez hibridizáltattuk. A hibridizált próbák ligációját követően fluoreszcensen jelölt primerpárral PCR amplifikációt, majd fragmensanalízist végeztünk ABI3500 Genetic Analyzer szekvenátorral (Thermo Fisher Scientific). Az eredmények kiértékelése a Coffalyser.Net (MRC-Holland) szoftverrel történt.

12. táblázat. A CLL-specifikus MLPA-val vizsgált régiók.

CLL szondakeverék	Gén-Exon	Kromoszóma-régió	CLL szondakeverék	Gén-Exon	Kromoszóma-régió
P037-CLL-1	MYCN-2	2p24.3	P038-CLL-2	SF3B1-16 (MUT)	2q33.1
P037-CLL-1	MYCN-2	2p24.3	P038-CLL-2	MYD88-5 (MUT)	3p22.2
P037-CLL-1	MYCN-3	2p24.3	P038-CLL-2	NOTCH1-34 (MUT)	9q34.3
P037-CLL-1	MYCN-3	2p24.3	P038-CLL-2	PTEN-5	10q23.31
P037-CLL-1	ALK-27	2p23.2	P038-CLL-2	PTEN-9	10q23.31
P037-CLL-1	ALK-4	2p23.2	P038-CLL-2	ATM-1	11q22.3
P037-CLL-1	REL-7	2p16.1	P038-CLL-2	ATM-13	11q22.3
P037-CLL-1	REL-11	2p16.1	P038-CLL-2	ATM-44	11q22.3
P037-CLL-1	AIM1-2	6q21	P038-CLL-2	ATM-55	11q22.3
P037-CLL-1	SEC63-16	6q21	P038-CLL-2	ATM-63	11q22.3
P037-CLL-1	TNFAIP3-2	6q23.3	P038-CLL-2	RDX-11	11q22.3
P037-CLL-1	TNFAIP3-9	6q23.3	P038-CLL-2	PPP2R1B-4	11q23.1
P037-CLL-1	LATS1-4	6q25.1	P038-CLL-2	CADM1-1	11q23.2
P037-CLL-1	IGF2R-3	6q25.3	P038-CLL-2	CD27-3	12p13.31
P037-CLL-1	PARK2-10	6q26	P038-CLL-2	STAT6-4	12q13.3
P037-CLL-1	TNFRSF10B-5	8p21.3	P038-CLL-2	HMGA2-2	12q14.3
P037-CLL-1	TNFRSF10A-1	8p21.3	P038-CLL-2	IGF1-3	12q23.2
P037-CLL-1	EIF3H-1	8q24.11	P038-CLL-2	PAH-4	12q23.2
P037-CLL-1	MYC-3	8q24.21	P038-CLL-2	RB1-17	13q14.2
P037-CLL-1	MYC-3	8q24.21	P038-CLL-2	RB1-27	13q14.2
P037-CLL-1	CDKN2A-3	9p21.3	P038-CLL-2	DLEU2-11	13q14.3
P037-CLL-1	CDKN2B-2	9p21.3	P038-CLL-2	KCNRG-1	13q14.3
P037-CLL-1	ATM-14	11q22.3	P038-CLL-2	DLEU1-3	13q14.3
P037-CLL-1	ATM-22	11q22.3	P038-CLL-2	DLEU1-down	13q14.3
P037-CLL-1	CCND2-5	12p13.32	P038-CLL-2	ATP7B-4	13q14.3
P037-CLL-1	LRMP-21	12p12.1	P038-CLL-2	AKT1-4	14q32.33
P037-CLL-1	CDK4-8	12q14.1	P038-CLL-2	MTA1-3	14q32.33
P037-CLL-1	IFNG-4	12q15	P038-CLL-2	KIAA0125-up	14q32.33
P037-CLL-1	CHFR-4	12q24.33	P038-CLL-2	TP53-10	17p13.1
P037-CLL-1	RB1-21	13q14.2	P038-CLL-2	TP53-6	17p13.1
P037-CLL-1	FNDC3A-6	13q14.2	P038-CLL-2	TP53-5	17p13.1
P037-CLL-1	KCNRG-3	13q14.3	P038-CLL-2	TP53-2a	17p13.1
P037-CLL-1	MIR15A-1	13q14.3	P038-CLL-2	TP53-1	17p13.1
P037-CLL-1	DLEU2-intr 1	13q14.3	P038-CLL-2	CDKN2D-2	19p13.2
P037-CLL-1	DLEU7-2	13q14.3	P038-CLL-2	LDLR-7	19p13.2
P037-CLL-1	DLEU7-1	13q14.3	P038-CLL-2	CCNE1-12	19q12
P037-CLL-1	ATP7B-6	13q14.3	P038-CLL-2	AKT2-6	19q13.2
P037-CLL-1	TP53-7	17p13.1	P038-CLL-2	MIR498-1	19q13.41
P037-CLL-1	TP53-4b	17p13.1	P038-CLL-2	COL11A1*	1p21.1
P037-CLL-1	TP53-3	17p13.1	P038-CLL-2	SERPINC1*	1q25.1
P037-CLL-1	TP53-1	17p13.1	P038-CLL-2	ZNF638*	2p13.3
P037-CLL-1	COL11A1*	1p21.1	P038-CLL-2	SCN1A*	2q24.3
P037-CLL-1	USH2A*	1q41	P038-CLL-2	GBE1*	3p12.3
P037-CLL-1	EDAR*	2q13	P038-CLL-2	IL4*	5q31.1
P037-CLL-1	COL3A1*	2q32.2	P038-CLL-2	GARS*	7p15.1
P037-CLL-1	SCN5A*	3p22.2	P038-CLL-2	STX1A*	7q11.23
P037-CLL-1	GBE1*	3p12.3	P038-CLL-2	OPTN*	10p13
P037-CLL-1	KLKB1*	4q35.2	P038-CLL-2	RPGRIP1*	14q11.2
P037-CLL-1	NIPBL*	5p13.2	P038-CLL-2	SEMA7A*	15q24.1
P037-CLL-1	IL4*	5q31.1	P038-CLL-2	ABAT*	16p13.2
P037-CLL-1	KIAA0319*	6p22.2	P038-CLL-2	CACNG2*	22q12.3
P037-CLL-1	COL5A1*	9q34.3			
P037-CLL-1	ABCC8*	11p15.1			
P037-CLL-1	SPG11*	15q15.3			

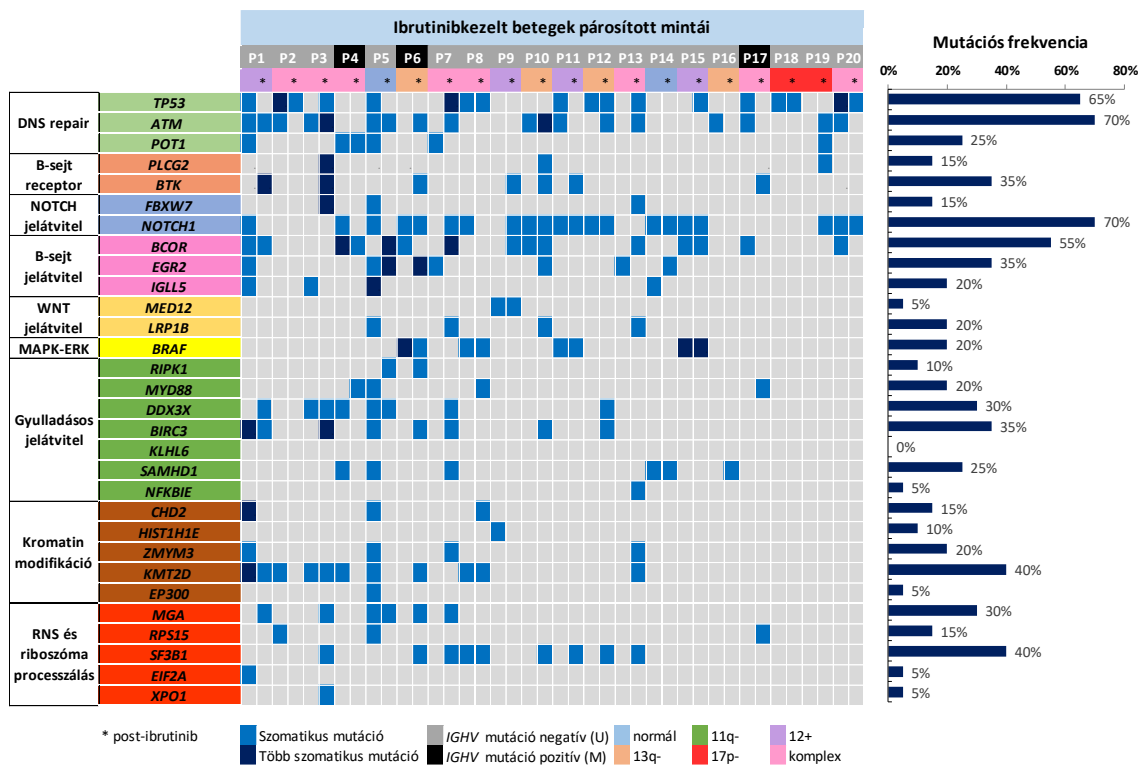
A rezisztenciamutációk azonosítását a III.1.4. fejezetben leírt módon, ddPCR módszerrel végeztük, a *BTK* C481S, valamint a *BCL2* G101V és D103Y mutációkra specifikus, illetve vad típusú próbák alkalmazásával. A próbák azonosítói: *BTK* C481S mutáns + vad típus - dHsaMDS802598840, *BCL2* G101V vad típus – dHsaADS52164188, *BCL2* G101V mutáns típus – dHsaADS26433961, *BCL2* D103Y vad típus – dHsaADS13624642, *BCL2* D103Y mutáns típus – dHsaADS77894415.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata

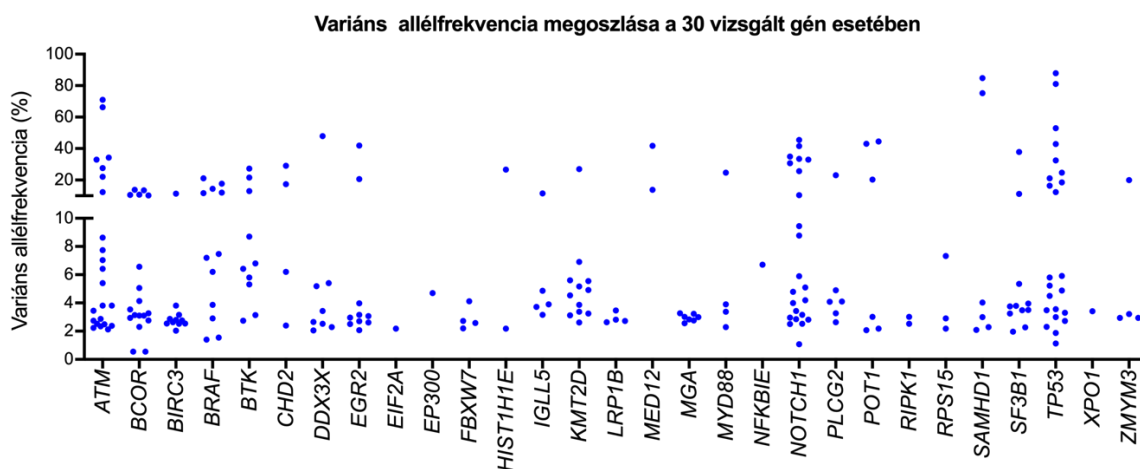
IV.1.1. Mutációs összetétel

Az ultramély NGS során a húsz beteg párosított mintáiban összesen 211 szomatikus variánst azonosítottunk, átlagosan 7500x lefedettséggel (12. ábra).



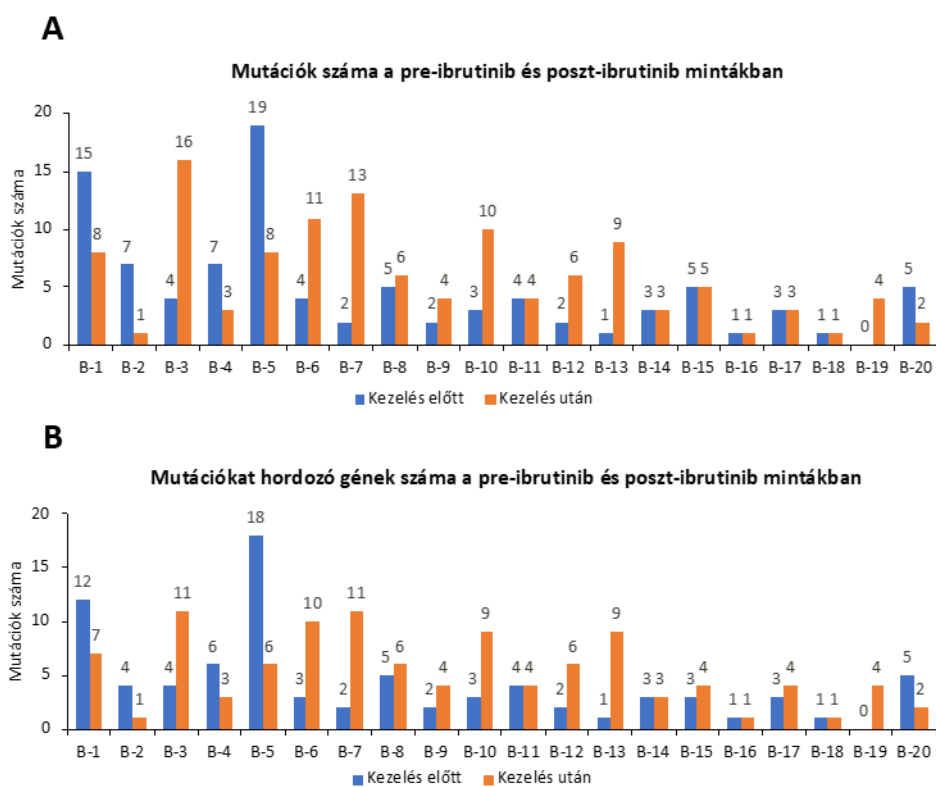
12. ábra. A betegpopuláció mutációs összetételét bemutató hőtérkép. Az ábrán a mutációk mellett a betegek *IGHV* és citogenetikai státusza is látható, a leggyakrabban mutációt hordozó gének a *TP53* (65%), az *ATM* (70%), valamint a *NOTCH1* (70%).

Az azonosított variánsok többsége szubklonálisnak bizonyult, 10% alatti VAF-fal (13. ábra).



13. ábra. Az azonosított variáns allélfrekvenciák megoszlása. A mutációk többsége szubklonálisnak bizonyult, a *KLHL6* génben nem azonosítottunk mutációt.

Jelentős szubklonális heterogenitás volt megfigyelhető a vizsgált betegcsoportban, betegenként átlagosan öt mutációt (intervallum: 0-19) azonosítottunk, amelyek átlagosan négy gént (intervallum: 0-18) érintettek (14. ábra).



14. ábra. Az azonosított mutációk száma (A), valamint a mutációt hordozó gének száma (B) az ibrutinibkezelés előtti, valamint a kezelés alatti mintákban.

A leggyakrabban mutációt hordozó géneknek a *NOTCH1* (70%, 14/20), az *ATM* (70%, 14/20), a *TP53* (65%, 13/20) és a *BCOR* (55%, 11/20) bizonyultak. Az összes, 20% feletti VAF-fal bíró variánst sikeresen validáltuk kétirányú Sanger-szekvenálással (15. ábra).

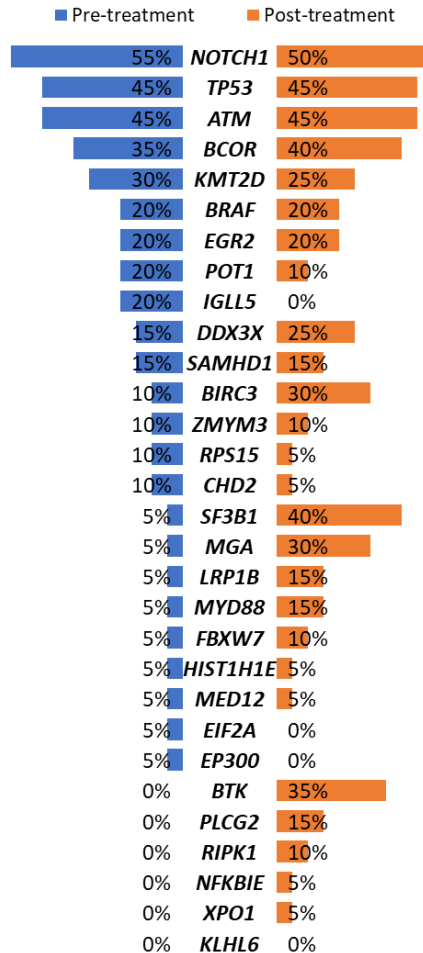


15. ábra. Kétirányú Sanger-szekvenálással validált mutációk elektroferogramjai. A 20% feletti variáns allélfrekvenciájú mutációk mindegyikét sikeresen validáltuk. Piros nyíl jelöli a kis ábrák felett feltüntetett variáns pozícióját, az elektroferogramok alatt a beteg sorszáma, és az ibrutinibkezelés hónapokban mért időtartama (mintavétel időpontja) látható.

IV.1.2. A mutációs összetétel időbeli megoszlása

A poszt-ibrutinib mintákban enyhén magasabb számban (összesen 118) azonosítottunk mutációkat a pre-ibrutinib mintákhoz (összesen 91) képest, ez mintánként 5,9 (intervallum: 1-16), valamint 4,7 (intervallum: 0-19) mutációt jelent kezelés alatt, illetve azt megelőzően. Úgy kezelés előtt, mind az alatt a *NOTCH1*, *ATM*, *TP53* és *BCOR* gének hordoztak leggyakrabban mutációt. Amíg az *IGLL5*, *EIF2A* és *EP300* gének mutációi nem voltak jelen a poszt-ibrutinib mintákban, feldúsultak a kezelés hatására az *SF3B1* (5% vs. 40%), az *MGA* (5% vs. 30%) és a *BIRC3* (10% vs. 30%) gének mutációi a pre-ibrutinib mintákhoz képest. A *MYD88* és az *LRP1B* gének mutációiban háromszoros növekedés volt megfigyelhető az ibrutinibkezelés hatására. A *BTK*, *PLCG2*, *RIPK1*, *NFKBIE* és *XPO1* mutációk kizárólag a kezelés során vett mintákban jelentek meg, 35, 15, 10, 5 és 5%-ban a fenti sorrend szerint (16. ábra).

A SZOMATIKUS MUTÁCIÓK IDŐBELI MEGJELENÉSE



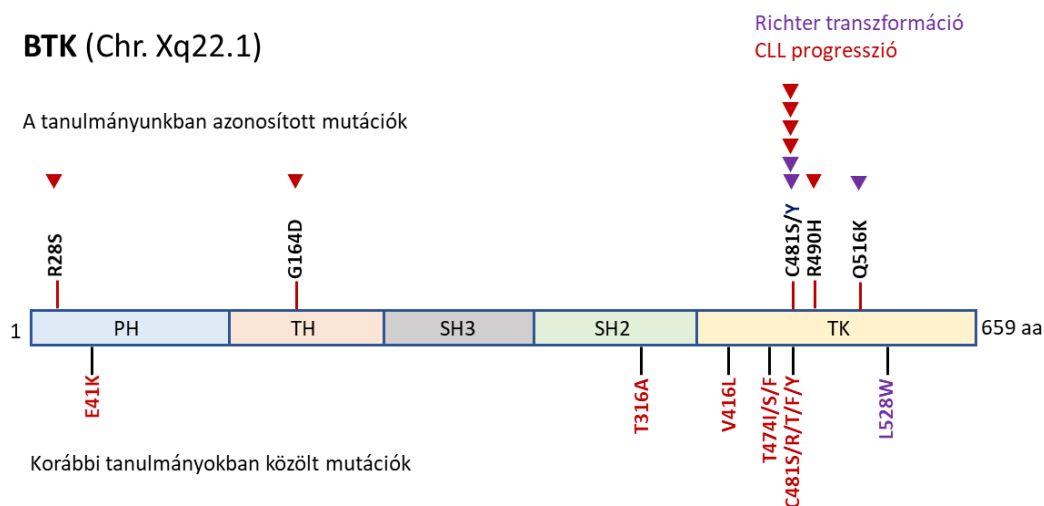
16. ábra. A szomatikus mutációk előfordulását mutató diagram. Egyes mutációk az ibrutinibkezelés során feldúsulnak (*SF3B1*, *MGA*, *BIRC3*), mások kizárólag a kezelés alatt jelennek meg, így például a *BTK* és *PLCG2* rezisztenciamutációk.

Betegenként különböző, egyedi mutációs mintázatokat azonosítottunk. Konvergens mutációevolúció („convergent mutation evolution”, CME), azaz egy génben többszörös mutáció jelenléte(180) volt megfigyelhető a vizsgált gének 40%-ában (12/30), génenként 2-4 mutációval. A betegek felében fordult elő CME, amely a mintapárok mindkét tagját négy betegben, míg a pre-ibrutinib, illetve poszt-ibrutinib mintát három-három betegben érintette.

IV.1.3. A *TP53*, *BTK* és *PLCG2* mutációk szubklonális dinamikája

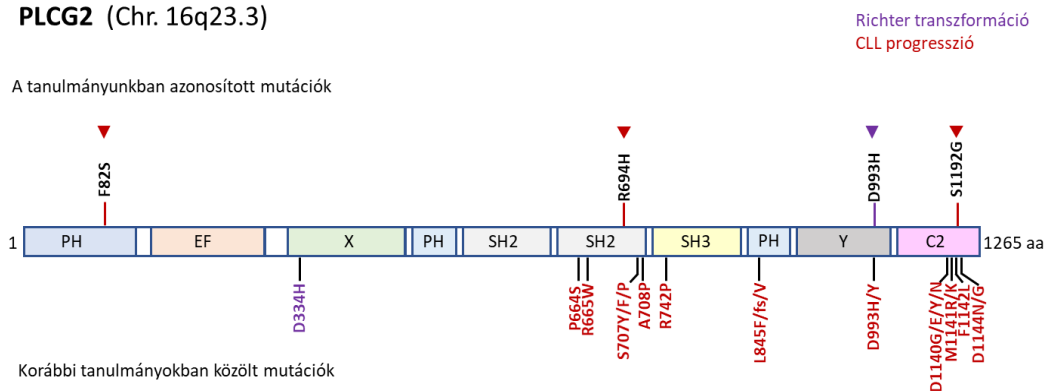
Ibrutinibrezisztenciáért bizonyítottan felelős *BTK* vagy *PLCG2* mutációkat az esetek 40%-ában (8/20), illetve 5%-ában (1/20) azonosítottunk, továbbá, kizárólag

a kezelés során vett mintákban mutattunk ki rezisztenciamutációt. *BTK* és *PLCG2* mutáció együttes előfordulását két betegben figyeltük meg. A kanonikus *BTK* C481S és *PLCG2* D993H mutációs forrópontokon kívül négy, korábban le nem írt *BTK* mutációt (az érintett aminosavak: R28, G164, R490, Q516) és három *PLCG2* mutációt (az érintett aminosavak: F82, R694, S1192) azonosítottunk összesen négy betegben (17. és 18. ábra).



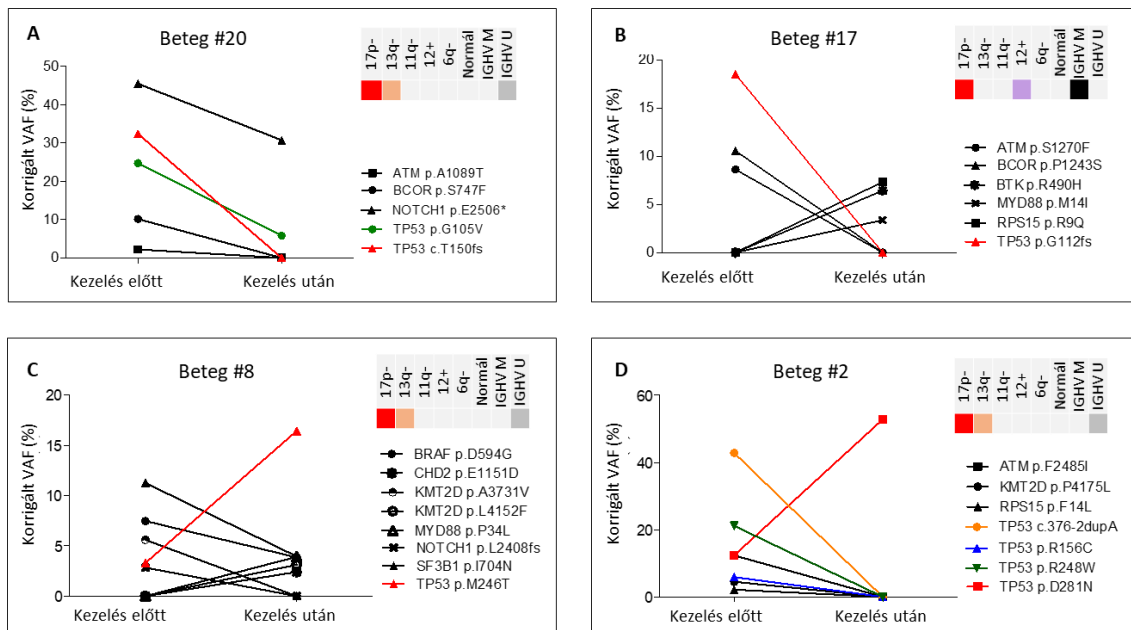
17. ábra. A *BTK* fehérje vázlatos struktúrája a tanulmányunkban, illetve korábbi közleményekben azonosított variánsok feltüntetésével. A fehérje PH, TH és TK doménjeiben azonosítottunk mutációkat. (PH: „Pleckstrin homology”, TH: „Tec homology”, SH3/2: „Src homology 3/2”, TK: tirozin-kináz). A pirossal jelölt variánsok CLL-ben, míg a lilával jelölt variánsok Richter-transzformációban fordultak elő. A *BTK* R28S, G164D, R490H és Q516K variánsok a COSMIC adatbázis alapján tanulmányunkat megelőzően nem kerültek leírásra.

PLCG2 (Chr. 16q23.3)



18. ábra. A PLCG2 fehérje vázlatos struktúrája a tanulmányunkban, illetve korábbi közleményekben azonosított variánsok feltüntetésével. (EF: „EF-hand motifs”, X: X domén, SH2/3: „Src homology 2/3”, Y: Y domén, C2: kalciumkötő domén). A pirossal jelölt variánsok CLL-ben, míg a lilával jelölt variánsok Richter-transzformációban fordultak elő. A *PLCG2* F82S és S1192G variánsok a COSMIC adatbázis alapján tanulmányunkat megelőzően nem kerültek leírásra. Az R694H variánst CLL-ben korábban nem írták le, viszont vastagbélrákban már azonosították (COSM2693625).

A nagy számban jelenlévő *TP53* mutációk eltérő klonális dinamikával fordultak elő a vizsgált betegcsoportban (19. ábra, A-D). Egyes esetekben a *TP53* mutációk a kezelés hatására eliminálódtak, a B20-as beteg két *TP53* mutációja közül az egyik az ibrutinibkezelés során már nem volt azonosítható, míg a másik VAF-ja jelentősen csökkent (A). A B17-es beteg *TP53* mutációja szintén eliminálódott, az ibrutinibkezelt mintában már nem volt azonosítható (B). Más esetekben az eredetileg *TP53* mutációt hordozó betegben kezelés hatására expandált a mutáns klón, amelyet a VAF növekedése jelez (B8-as beteg) (C), vagy pedig az eredetileg jelenlévő négy *TP53* mutáció közül három eliminálódott, miközben a negyedik klón VAF-ja a háromszorosára nőtt (B2-es beteg), (D).

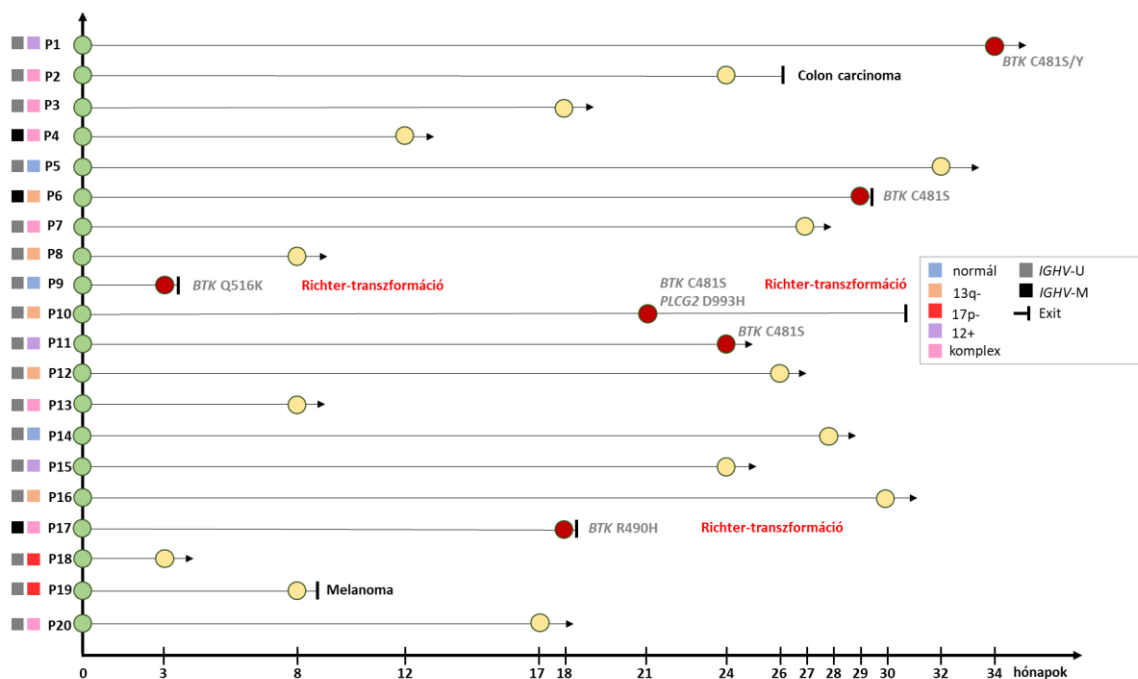


19. ábra. A *TP53* mutációk klonális dinamikája néhány reprezentatív esetben. A mutációk teljes eliminációját, a mutáns klón méretének csökkenését, valamint klonális expanzióját is megfigyeltük.

A *TP53* és *BTK* mutációk alternáló dinamikája a mindkét eltérést hordozó esetek túlnyomó többségében előfordult. Miközben az ibrutinib evolúciós nyomására kialakult a rezisztenciáért felelős *BTK* mutáció, a kezelés előtt jelenlévő *TP53* mutáció eliminálódott, illetve VAF-ja lecsökkent. A *BTK* C481S mutációt hordozó hat beteg (B1, B5, B6, B10, B11, B20) közül négyen hordoztak a kezelés előtt *TP53* mutációt (B1, B5, B11, B20), amelyek mindegyike eliminálódott, illetve a *TP53* mutáns klón mérete lecsökkent ibrutinib hatására. A B17-es beteg által hordozott nem kanonikus *BTK* R490H mutáció megjelenésével szintén eliminálódott az eredetileg jelenlévő *TP53* mutáció. A kanonikus *BTK* mutációt nem hordozó esetekben vizsgálva a *TP53* mutációk klonális dinamikáját, az idetartozó összes beteg (8/20) *TP53* mutációja perzisztált, vagy expandált az ibrutinibkezelés során (B2, B3, B7, B8, B12, B13, B15, B18). Közülük egy beteg (B3) hordozott két, korábban le nem írt, ismeretlen klinikai jelentőségű *BTK* mutációt (R28S, G164D), viszont kanonikus *BTK* mutáció jelenlétében egy esetben sem azonosítottunk *TP53* mutációt.

IV.1.4. A betegcsoport követése és kórlefolysa

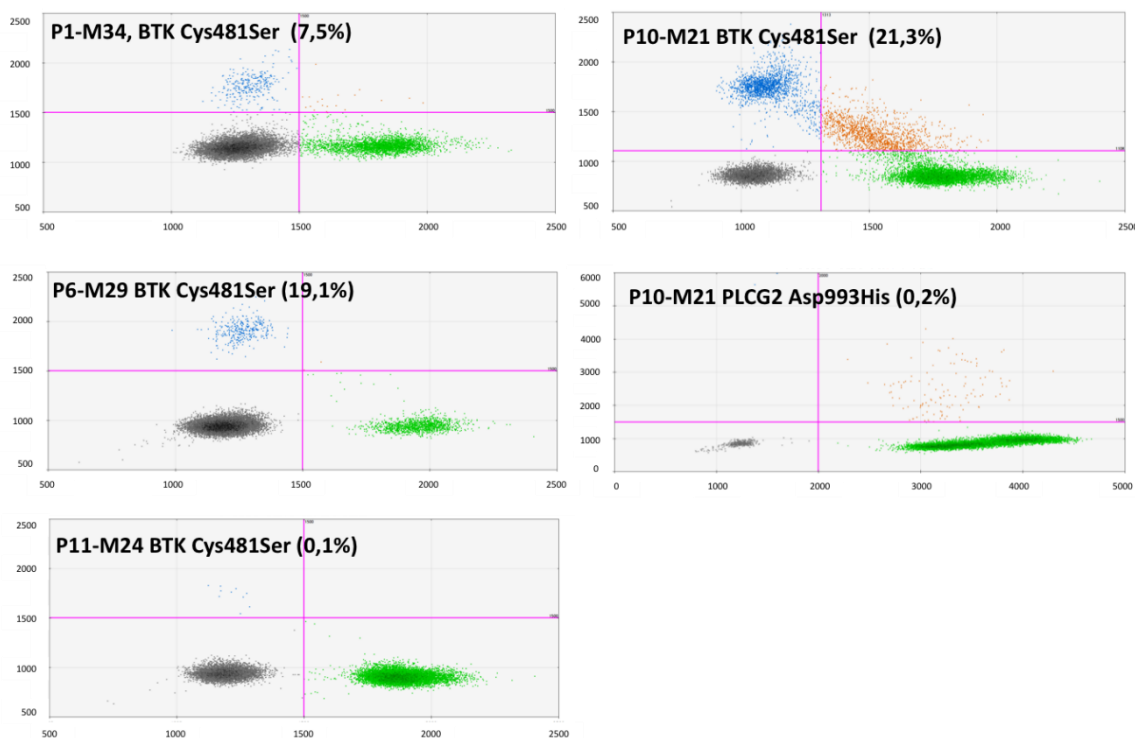
Kiterjesztett, 36,5 hónapos követési idő után (intervallum: 3-43 hónap) a betegek 65%-a (13/20) továbbra is ibrutinibkezelésben részesül, és parciális vagy komplett remisszióban van. Három beteg (B9, B10, B17) RT-n esett át és elhunyt 4, 30, illetve 18 hónappal az ibrutinibterápia kezdetét követően. Míg a B10-es beteg progressziójában a *BTK* C481S és *PLCG2* D993H rezisztenciamutációk szerepét írtuk le egy korábbi esettanulmányunkban(180), a B9 és B17 progressziójában a korábban le nem írt *BTK* Q516K és R490H mutációk játszhattak szerepet. A B1-es beteg ibrutinibkezelésének 34. hónapjában együttesen előforduló *BTK* C481S és C481Y mutációkat azonosítottunk NGS-sel, amelyek az ibrutinibterápiát kiegészítő venetoclax hatására eliminálódtak, és a beteg remisszióba került. A B2-es beteg másodlagos daganatban (vastagbélrák) hunyt el expandáló *TP53* mutáns klón mellett az ibrutinibterápia kezdetétől számított 27 hónap után. A *BTK* C481S mutációval rendelkező B6-os beteg szepszisben hunyt el az ibrutinibkezelés 30. hónapjában, stabil CLL mellett. A B11-es beteg *BTK* C481S mutációját az ibrutinibkezelés 24. hónapjában azonosítottuk, ekkor a beteg klinikailag még nem progrediált, de a limfocita-kettőződési idő már egyre rövidült. A B3-as beteg 18. havi mintájának vizsgálata során két, korábban le nem írt *BTK* mutációt (R28S és G164D), valamint két, szintén ismeretlen *PLCG2* mutációt (F82S és S1192G) azonosítottunk, a beteg a 40. hónapban is klinikai remisszióban van. A B19-es beteg 8. havi mintájában egy korábban le nem írt *PLCG2* R694H variánst detektáltunk, a beteg stabil betegség mellett szekunder malignitás (melanoma malignum) következtében hunyt el két hónappal a mintavételt követően (20. ábra).



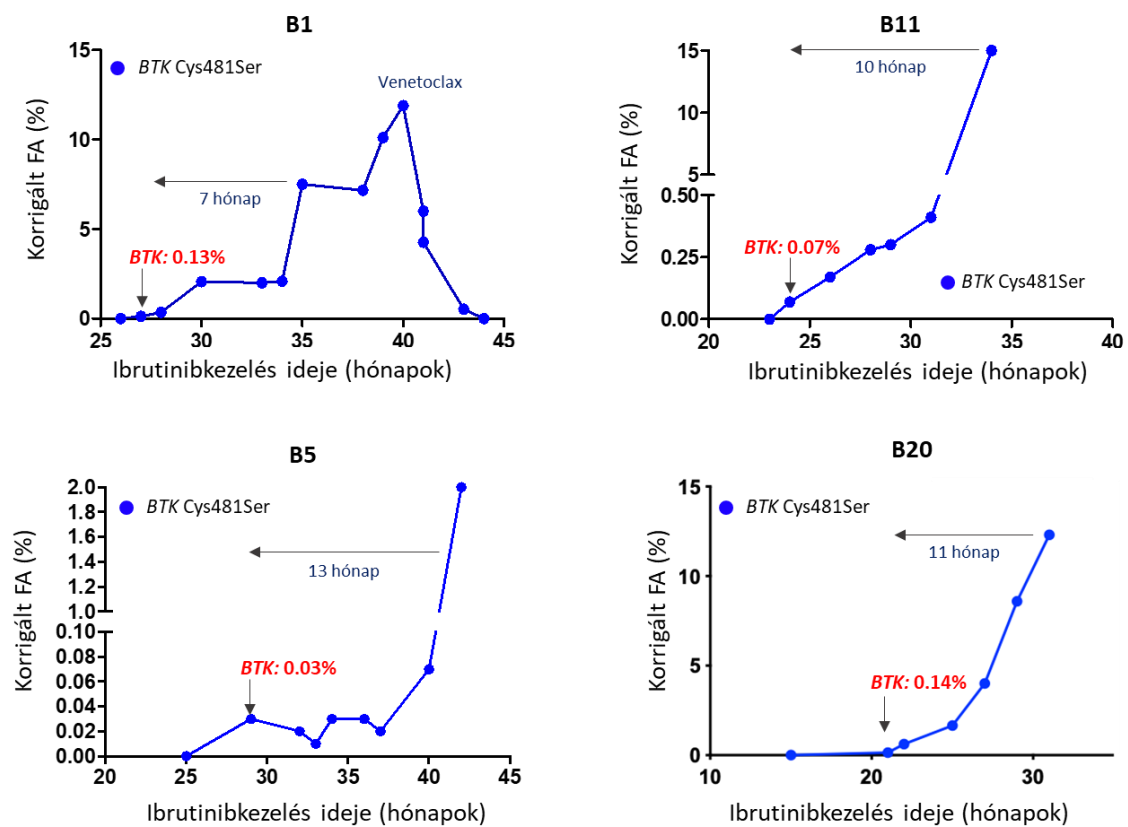
20. ábra. A betegcsoport mintavételi időpontjait és alapvető genetikai, valamint klinikai jellemzőit bemutató idővonal. A zöld körök jelölik az ibrutinibkezelés 0. napján vett mintákat, a sárga, illetve piros körök pedig az ibrutinibkezelés során vett mintákat. A piros színnel jelzett esetek mutattak CLL progressziót *BTK* és/vagy *PLCG2* mutáció jelenlétében.

IV.1.5. A *BTK* C481S és *PLCG2* D993H rezisztenciamutációk droplet digitális PCR alapú követése

Tizenkét és tizenöt hónappal az NGS analízisre szánt, ibrutinibkezelt minták gyűjtését követően ddPCR módszerrel azonosítottuk a B5-ös és B20-as betegek *BTK* C481S mutációit, a kezelés 44. és 32. hónapjában, 0,03% és 10,1% VAF-fal (21. ábra). A betegek ekkor klinikailag nem mutattak progressziót, viszont a limfocita-kettőződési idő rövidülése előrevetítette azt. E két beteg, valamint a B1, B10 és B11 esetek *BTK* és *PLCG2* mutációit retrospektíven megvizsgálva a 0,01% érzékenységű ddPCR-rel, a rezisztenciamutációk átlagosan 10,5 hónappal (intervallum: 7-15 hónap) a klinikai relapszust megelőzően jelentek meg, alacsony, de kimutatható VAF-fal. A B11-es beteg tíz hónappal a *BTK* C481S mutáció első észlelését követően laboratóriumi progresszió jeleit mutatta. Az ibrutinibterápiát követően venetoclax kezelésben részesült a B1 és B10 eset, a *BTK* mutáns szubklónok a *BCL2* inhibitor hatására eliminálódtak (22. és 24. ábra).



21. ábra. A *BTK* C481S (Cys481Ser) és *PLCG2* D993H (Asp993His) ibrutinibrezisztencia-mutációk azonosítása ddPCR-rel. A pontdiagramokon az amplifikált DNS-molekulákat tartalmazó dropletnek négy populációja különíthető el: a bal alsó kvadránsba az ún. üres, fekete színnel jelölődő droplet tartoznak, amelyek DNS-t nem tartalmaznak a DNS-molekulák cseppekben történő véletlenszerű megoszlásának következtében. A jobb alsó kvadránsban található a negatív, azaz vad típusú DNS-t hordozó droplet (zöld). A bal felső kvadránsban láthatók a pozitív, azaz a mutáns allélt tartalmazó droplet (kék), míg a jobb felső kvadránsban lokalizálnak a mutáns, és vad típusú allélt egyaránt tartalmazó (narancssárga) droplet.



22. ábra. A *BTK* C481S rezisztenciamutációk követése droplet digitális PCR technikával. A rezisztenciamutációk átlagosan 10,5 hónappal a klinikai relapszust megelőzően már azonosíthatók voltak. (FA: frakcionális abundancia, amely a variáns allélfrekvencia megfelelője a droplet digitális PCR eredmények leolvasása során).

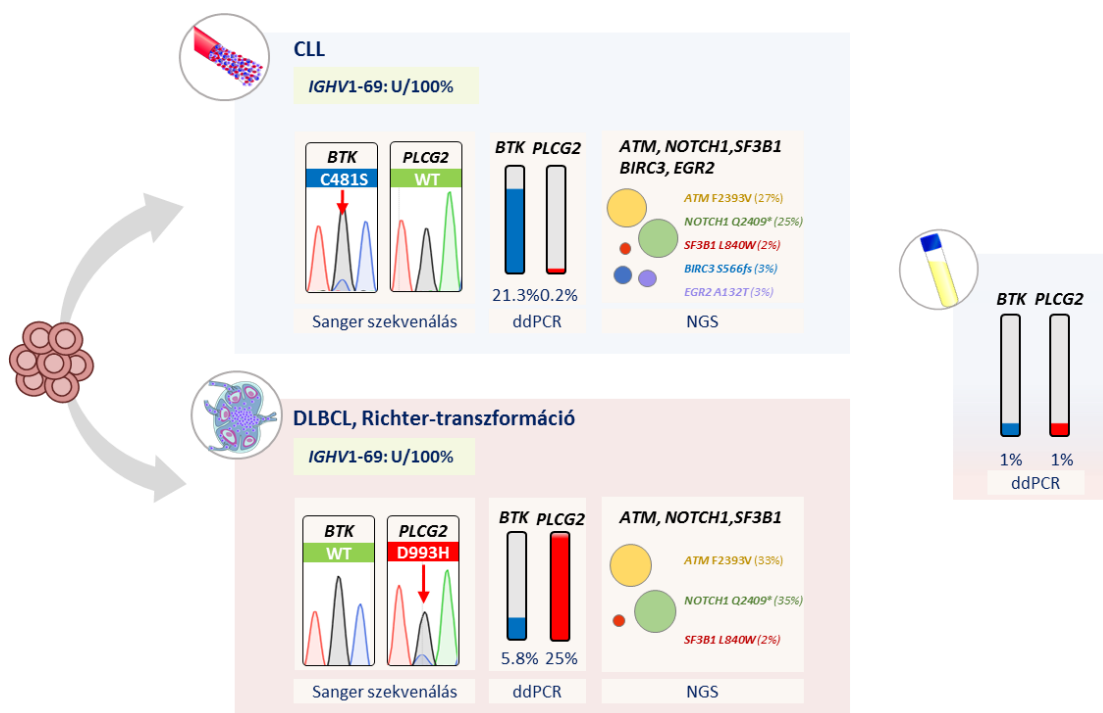
Összességében a *BTK* mutációt hordozó 9 beteg közül 7 mutatott laboratóriumi vagy klinikai progressziót, amely előtt több hónappal már azonosíthatók voltak a rezisztenciamutációk. *BTK* mutáció jelenléte nélkül nem fordult elő progresszió a vizsgált betegcsoportunkban. A RT-n átesett három betegben a *BTK* mutációk az ibrutinibterápia első két évében (4-18 hónap) jelentek meg, míg a CLL progressziót mutató betegekben hosszabb kezelési időtartamra (21-28 hónap) volt ehhez szükség. A *BTK* mutációk korai megjelenése tehát gyorsan progrediáló kórlefolyást vetíthet előre.

IV.1.6. Térbeli heterogenitás szerepének vizsgálata ibrutinibkezelte CLL progressziójában

Az NGS-tanulmány során vizsgált B10-es beteg részletes kórlefolását és a célzott terápiák hatására kialakuló térbeli heterogenitást és klonális evolúciót munkacsoportunk külön közleményben ismertette(180). Az *IGHV*-U mutációs státuszú, 13q delécióval bíró, kemoimmunoterápiával többszörösen előkezelt beteg (2. táblázat) R/R CLL-je ibrutinib hatására 21 hónapig tartó részleges remisszióba került, majd az ibrutinibrezisztencia és relapszus gyanúját nyirokcsomó-megnagyobbodás és limfocitaszám-emelkedés vetette fel. A nyirokcsomó-biopsziás mintából DLBCL fenotípusú, *IGHV* analízis alapján klonálisan kapcsolt RT igazolódott, majd a beteg venetoclaxterápiát, mentő immunkemoterápiát és autológ őssejt-transzplantációt követően exitált.

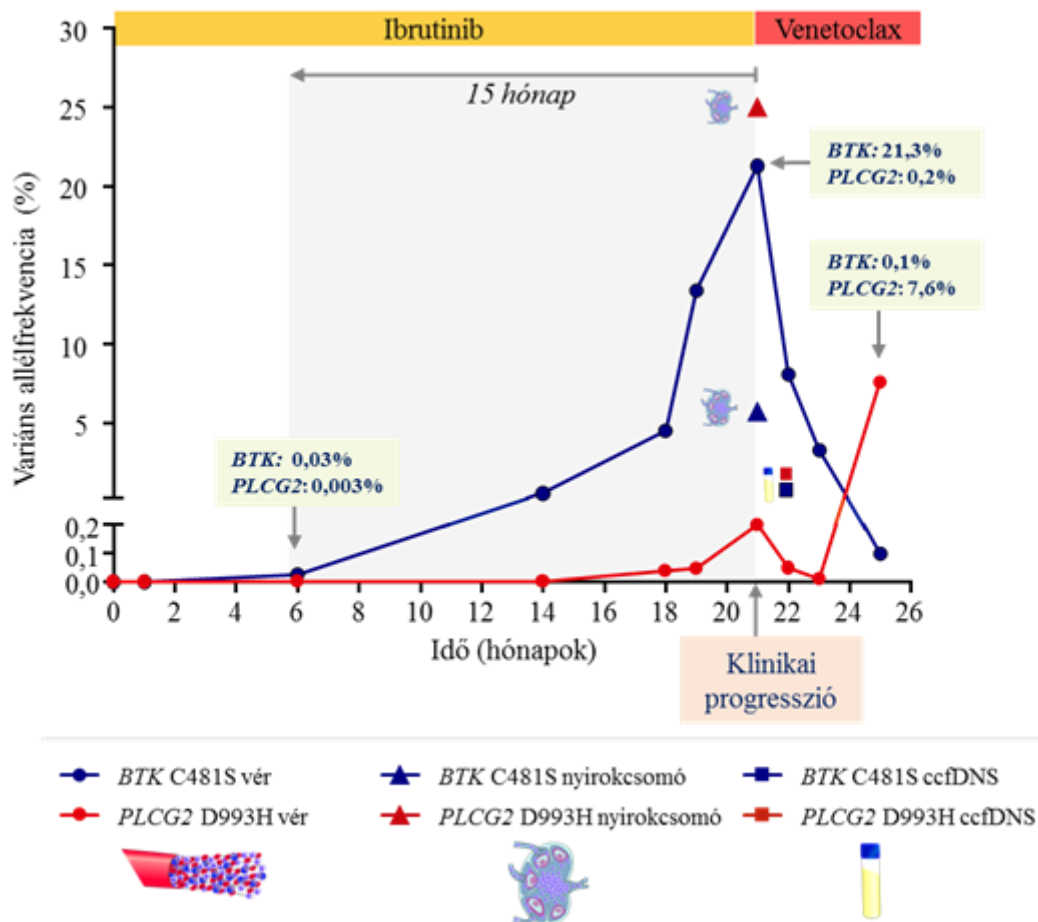
Sanger szekvenálással az ibrutinibkezelés 21. hónapjában, a relapszus idején vett perifériás vérmintából kanonikus *BTK* C481S mutáció igazolódott, miközben a nyirokcsomó-mintában a *PLCG2* D993H rezisztenciamutációt azonosítottuk, *BTK* negativitás mellett. Az azonosított térbeli heterogenitás pontosabb vizsgálatát elvégeztük NGS-sel, amely a Sanger szekvenálással kapott eredményeket megerősítette, illetve minor klónként, 5,8%-os VAF-fal a nyirokcsomó-mintában is igazolt *BTK* C481S mutációt, és 0,2%-os VAF-fal a perifériás vérben *PLCG2* D993H mutációt. A betegtől a relapszus idején vett ccfDNS mintában ddPCR módszerrel vizsgáltuk a perifériás vérben, valamint a nyirokcsomóban azonosított ibrutinibrezisztencia-mutációk jelenlétét, és 1%-os VAF-fal azonosítottuk mindkét anatómiai lokalizációban.

A rezisztenciamutációkon túl, NGS analízissel vizsgáltuk a CLL-ben leggyakrabban mutációt hordozó géneket is mindkét kompartmentben. Míg az *ATM* F2393V, *NOTCH1* Q2409* és *SF3B1* L840W mutációk mind a perifériás vérben, mind a nyirokcsomóban jelen voltak, a *BIRC3* S566fs és *EGR2* A132T mutációkat csupán az előbbi lokalizációban azonosítottuk (23. ábra).



23. ábra. Klonális heterogenitás ibrutinibkezelt CLL Richter-transzformációjában. Míg a perifériás vérben major klónként a *BTK* C481S rezisztenciamutációt, a Richter-transzformációt mutató nyirokcsomóban a *PLCG2* D993H mutációt azonosítottuk. A keringő sejtmentes DNS alacsony VAF-fal mindkét mutációt tartalmazta. A CLL-ben leggyakrabban mutációt hordozó gének közül az *ATM*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* és *EGR2* génekben azonosítottunk mutációkat a két kompartmentben, a mutáns klón reprezentáló körök mérete a klón méretével arányos.

A *BTK* és *PLCG2* mutációk időbeli dinamikájának vizsgálata céljából a B10-es beteg összesen tíz, a kezelés különböző időpontjaiban vett perifériás vérmintáit vizsgáltuk ddPCR-rel. Míg az ibrutinibkezelést megelőzően nem detektáltunk rezisztenciamutációt, a klinikai progresszió előtt 15 hónappal, a kezelés 6. hónapjában már kimutattuk a *BTK* mutációt 0,03%-os, a *PLCG2* mutációt 0,003%-os VAF-fal. Az ibrutinibkezelés folyamán a mutáns klónok mérete folyamatosan növekedett. A relapszust követő venetoclaxterápiára a *BTK* és *PLCG2* mutáns klón eltérően reagált – míg az előbbi mérete jelentősen csökkent, az utóbbi expandált, és a nyirokcsomóban látott jelenséghez hasonlóan, a vérben is a *PLCG2* mutáns klón vált a rezisztencia meghatározójává, és vezetett további progresszióhoz (24. ábra).



24. ábra. A *BTK* és *PLCG2* rezisztenciamutációk időbeli és térbeli klonális dinamikája a B10-es beteg sorozatmintáin követve. Az ibrutinibkezelés során a mutáns klónok mérete a perifériás vérben folyamatosan növekedett, majd a venetoclaxterápia alatt a *BTK* mutáns klón méretcsökkenésével párhuzamosan a *PLCG2* mutáns klón expandált. A szenzitív ddPCR módszerrel a rezisztenciamutációk már 15 hónappal a klinikai progressziót megelőzően kimutathatók voltak.

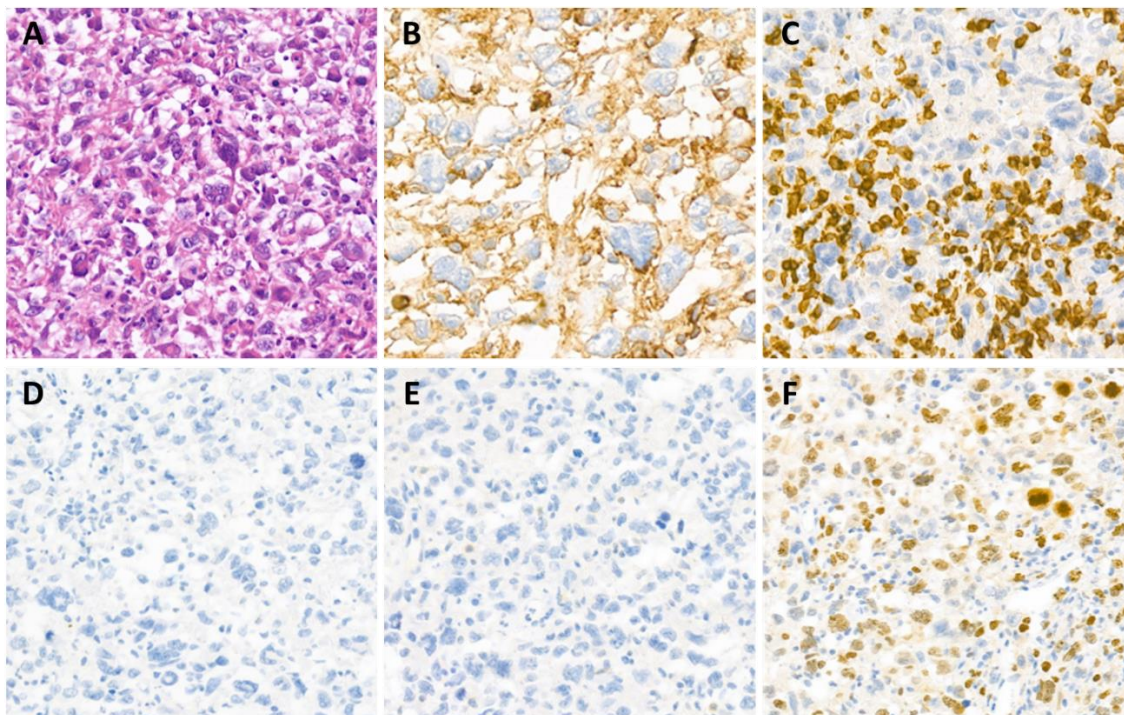
IV.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata

IV.2.1. A transzformáció immunmorfológiai jellemzői

Az RS diagnózisának felállításához kötelező az érintett lokalizációból származó minta szövettani vizsgálata(181), ennek megfelelően tanulmányunkban az összes diagnózist két független, tapasztalt hematopatológus állította fel. Az esetek fele (3/6, B2, B3 és B4) DLBCL fenotípusúnak bizonyult, neoplastikus, nagy

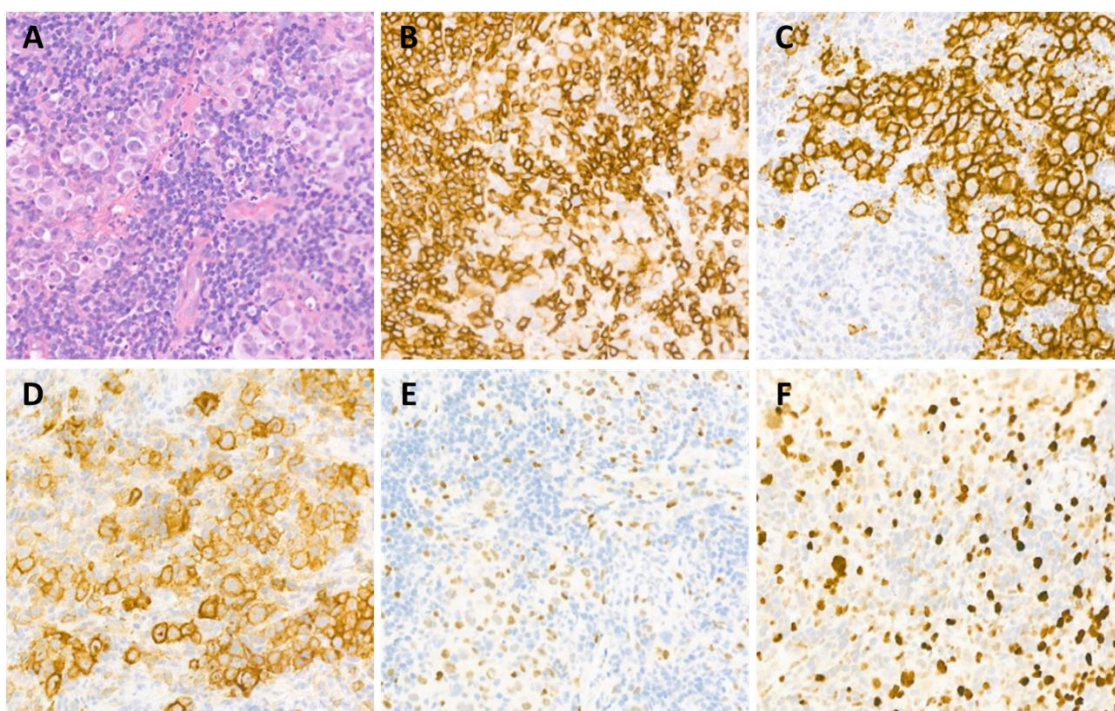
B-limfociták diffúz proliferációjával és jelentősen emelkedett Ki67 proliferációs aktivitással (az eseteket a DLBCL fenotípus gyakorisága miatt nem részletezzük).

A B1-es beteg öt hónappal a venetoclaxterápia kezdetét követően mutatta a RT klinikai gyanújeleit, képalkotó vizsgálattal ábrázolódó paravertebrális terime és háti fájdalom képében. A teriméből vett vastagtű-biopsziás minta szövettani vizsgálata polimorf nagysejtekből álló, diffúz megjelenésű tumort igazolt. A nagysejtek részben anaplasztikus morfológiájúak, részben Sternberg-Reed-(SR)-sejtekre emlékeztetnek, eozinofil sejtplazmával és prominens sejtmagvacskával bíró lobulált sejtmaggal. Széleskörű immunhisztokémiai vizsgálatokat követően, a tumorsejtek részleges LCA-, Oct-2- és Fascin-1-, valamint MUM1-, p53-, S100- és CD4-pozitivitást mutattak, 60%-os Ki67 proliferációs aktivitással. A következő markerekre nézve negatívnak bizonyult a minta: CD20, PAX5, CD79a, CD21, CD23, Bcl-6, CD10, CD138, CD30, CD3, CD5, CD7, PD-L1, CD68, ALK1, kappa, lambda, CD15 és melanoma markerek (MelanA, HMB45 és SOX10). A részleges LCA- és Oct-2-expresszió, a kifejezett Ki67-pozitivitás, valamint a sejteredetre specifikus markerek (B-sejt- és T-sejt-markerek, CD30) hiánya miatt “null fenotípusú” high-grade limfóma diagnózisa került felállításra, Hodgkin-limfómára, vagy anaplasztikus nagysejtes limfómára emlékeztető morfológiával (25. ábra). A B-sejtes eredetet tanulmányunk során a monoklonális *IGH* génátrendeződés kimutatásával bizonyítottuk.



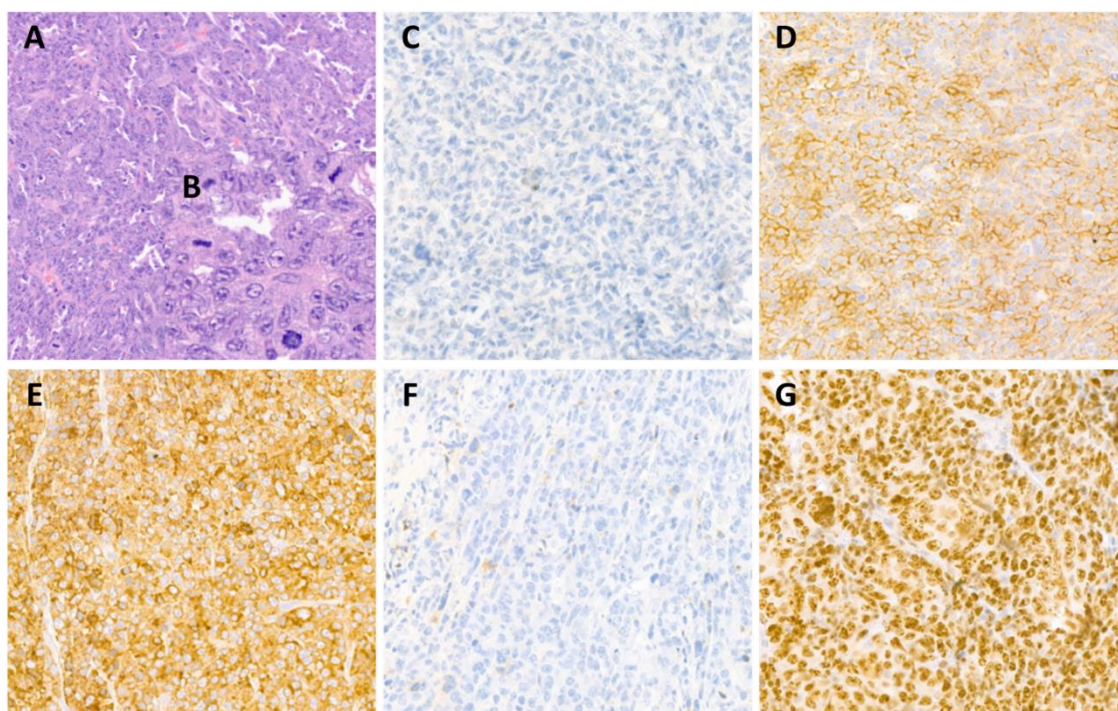
25. ábra. A B1-es beteg paravertebrális terime képében prezentálódó Richter-szindrómája. A neoplasztikus nagysejtek részben anaplasztikus morfológiájúak, részben Sternberg-Reed-sejtekre emlékeztetnek, lobulált sejtmaggal és prominens sejtmagvacskával (hematoxilín-eozin, A). Az LCA-pozitivitás a hemopoetikus eredetet támasztja alá (B). A tumorsejtek CD20 (D) és CD30 (E) negatívak, a nagysejtek között elszórtan az eredeti CLL kis CD5+ limfocitái jelennek meg (C). A Ki67 proliferációs index 60% (F). Objektív nagyítás: 20x.

A B5-ös beteg Richter-szindrómája jobboldali lágyéki nyirokcsomó-megnagyobbodás klinikai képében jelentkezett két hónappal az ibrutinibterápia bevezetését követően, miközben az egyéb anatómiai lokalizációban található meggyobbodott nyirokcsomók regrediáltak. A nyirokcsomó-biopszia szövettani vizsgálata az eredeti struktúrát elmosó diffúz limfoid infiltrátumot tárt fel, amely nagyrészt atípusos, anaplasztikus morfológiájú, prominens eozinofil magvacskájú CD20 és CD30 pozitív nagysejtekből állt, a CLL-re jellemző CD5+ kis limfociták mellett. A nagysejtek egy része többmagvú óriássejtnek bizonyult. A neoplasztikus nagysejtek részleges C-MYC expressziót és 100%-os MUM1 expressziót mutattak, 60%-os Ki67 proliferációs aktivitás és Bcl-6 negativitás mellett. A morfológia és immunfenotípus alapján a daganat a klasszikus Hodgkin-limfóma és a non-GC fenotípusú DLBCL közötti átmeneti entitásnak bizonyult (26. ábra).



26. ábra. A B5 beteg lágyéki nyirokcsomójában azonosított Richter-szindróma, amely kevert fenotípusú B-sejtes limfóma jegyeit mutatja, klasszikus Hodgkin-limfóma és DLBCL közötti átmeneti tulajdonságokkal. A diffúz limfoid infiltrátum a nyirokcsomó alapszerkezetét elmosza (hematoxin-eozin, A). Az eredeti CLL maradvány CD5 pozitív limfocitáival (B) keverten megjelenő anaplasztikus nagysejtek CD20 (C), CD30 (D) és C-MYC (E) pozitivitást mutatnak, 60%-os proliferációs aktivitással (Ki67, F). Objektív nagyítás: 20x.

A B6 beteg 18 hónapos ibrutinibterápiát követően multiplex gingivális proliferációkkal jelentkezett, amelyekből excízió történt. A szövettani vizsgálat során a szájnyálkahártya el nem szarusodó laphámborítása alatt széles mezőkbe rendeződő daganatsejtek proliferációja volt látható, amelyek prominens központi sejtmagvacskával és nagy nagyítású látóterenként legalább tíz mitotikus alakkal rendelkeztek. A Ki67 proliferációs aktivitás 90%-nak bizonyult. A tumorsejtek kifejezett LCA, CD79a, CD138 és kappa könnyűlánc pozitivitást mutattak, CD20, CD3, CD30, MPO és pan-CK negativitás mellett. A gyenge lambda festődést a háttér reaktív sejtjei adják. Az immunfenotípus alapján a plazmablasztos limfóma diagnózisa került felállításra, amely anamnesztikus adatok alapján megelőző immundeficiencia nélkül alakult ki (27. ábra).



27. ábra. A B6 beteg plazmablasztos limfóma morfológiájú Richter-szindrómája szájnyálkahártyában. A neoplasztikus sejtek immunoblasztos morfológiájúak, számos mitotikus alak látható (A, hematoxilin-eozin, 20x és B, hematoxilin-eozin, 60x). A plazmablasztos/plazmasejtes differenciáció CD20 negativitással (C) és CD138 pozitivitással (D) karakterizálható. A monoklonális daganatsejtek kappa könnyűlánc pozitivitást (E) és lambda negativitást (F) hordoznak, a Ki67 proliferációs aktivitás 90% (G). Objektív nagyítás (C-G): 20x.

IV.2.2. A transzformáció genetikai háttere

IV.2.2.1. A klonális kapcsoltság meghatározása

A CLL és RS mintapárok közötti klonális kapcsoltság (azonos átrendeződést mutató *IGHV-D-J* gének), az *IGHV* mutációs státusz, valamint a sztereotip BCR jelenléte kiemelkedő prognosztikus jelentőséggel bír RS-ben, ezért betegcsoportunkban elvégeztük ezek vizsgálatát, valamint összevetettük a klinikai adatokkal. Az *IGHV-D-J* génátrendeződés vizsgálata 4/6 mintapár mindkét tagjában sikeres eredménnyel zárult, két betegnél csak az egyik fázisú minta adott értékelhető eredményt (B4 betegből csak RS mintával rendelkezünk, míg a B6 betegből csupán a CLL minta analízise bizonyult sikeresnek). A sikeres eredményt adó mintapárok mindegyike klonálisan kapcsoltnak bizonyult, azonos átrendeződést mutató génekkel, valamint azonos *IGHV* mutációs státusszal, kivéve a B1 beteg klonálisan nem kapcsolts RS mintáját. Két beteg hordozott sztereotip BCR-t (B5 beteg – subset #6, B6 beteg – subset #1). A sikeresen vizsgált minták mindegyike *IGHV-U* státuszúnak bizonyult, kivéve a B1 beteg mindkét mintáját (13. táblázat).

13. táblázat. Az *IGHV-D-J* génátrendeződés és a klonális kapcsoltág vizsgálata.

Beteg	Entitás	Immunglobulin nehézlánc gének (CLL)						RS klonalitás	RS morfológia
		M/U	V	D	J	CDR3	Subset		
B1	CLL	M	IGHV4-34*01 F	IGHD6-13*01 F	IGHJ6*02 F	14	nem meghatározott	nem kapcsolt	"null fenotípusú" high-grade limfóma
	RS	M	IGHV1-18*01 F	IGHD2-2*01 F	IGHJ6*02 F	20	nem meghatározott		
B2	CLL	U	IGHV3-74*01 F	IGHD5-12*01 F	IGHJ6*02 F	16	nem meghatározott	kapcsolt	DLBCL
	RS	U	IGHV3-74*01 F	IGHD5-12*01 F	IGHJ6*02 F	16	nem meghatározott		
B3	CLL	U	IGHV3-33*01 F, IGHV3-33*06 F	IGHD6-13*01 F	IGHJ6*02 F	23	nem meghatározott	kapcsolt	DLBCL
	RS	U	IGHV3-33*01 F, IGHV3-33*06 F	IGHD6-13*01 F	IGHJ6*02 F	23	nem meghatározott		
B4	CLL			nincs adat				-	DLBCL
	RS	U	IGHV3-23*01 F, IGHV3-23D*01 F	IGHD1-26*01 F	IGHJ4*02 F	22	nem meghatározott		
B5	CLL	U	IGHV1-69*01 F, IGHV1-69*01D F	IGHD3-16*02 F	IGHJ3*02 F	21	CLL#6	kapcsolt	DLBCL/cHL
	RS	U	IGHV1-69*01 F, IGHV1-69*01D F	IGHD3-16*02 F	IGHJ3*02 F	21	CLL#6		
B6	CLL	U	IGHV1-3*01 F	IGHD6-19*01 F	IGHJ4*02 F	13	CLL#1	-	plazmablasztos limfóma
	RS			nincs adat					

IV.2.2.2. 17p deléciók és *TP53* mutációk

A *TP53* gént érintő aberrációk az összes betegben előfordultak, noha az egyes esetek különböztek egymástól az eltérés típusában (17p deléció és/vagy *TP53* mutáció), valamint abban, hogy a defektus CLL, vagy RS fázisban volt-e jelen. A CLL minták mindegyikét, valamint 4/6 RS mintát érintettek a *TP53* aberrációk, a B2, B4, B5 és B6 betegek egyaránt hordoztak 17p deléciót, valamint *TP53* mutációt. Az összes detektált citogenetikai aberráció közül a 17p deléció fordult elő leggyakrabban (4/6 beteg), és három betegben (B2, B4, B5) stabilnak bizonyult a kórlefolyás során, azaz mind a CLL, mind az RS fázisban kimutatható volt. A *TP53* mutációk változatos dinamikát mutattak, míg a B1 beteg CLL fázisú mintájában detektált mutációk közül egy sem jelent meg RS fázisban, a B2 és B3 betegek *TP53* mutációi eliminálódtak és új szubklónok jelentek meg helyettük az RS fázisban. A B5 beteg CLL mintája *TP53* mutációt nem hordozott, viszont a RT-hoz vezető eltérésként a későbbi fázisban már azonosíthatóvá vált (28. ábra és 14. táblázat).

	Mintapárok (CLL és RS)					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
<i>IGHV</i>	■	■	■	■	■	■
<i>TP53</i>	■	■	■	■	■	■
17p13 deléció	■	■	■	*	■	*
13q14 deléció	■	■	■	■	■	■
13q14 nyerés	■	■	■	■	■	■
11q22 deléció	■	■	■	■	■	■
12-es triszómia	■	■	■	■	■	*
9p21 deléció	■	■	■	■	■	■
4q35 deléció	■	■	■	■	■	■
2p24 nyerés	■	■	■	■	■	■
<i>NOTCH1</i>	■	■	■	■	■	■
<i>SF3B1</i>	■	■	■	■	■	■
<i>MYD88</i>	■	■	■	■	■	■
<i>BTK</i>	■	■	■	■	■	■
<i>BCL2</i>	-	■	■	-	-	-

- mutált *IGHV*
- nem mutált *IGHV*
- genetikai eltérés
- vad típusú gén/régió
- * diagnóziskori FISH vizsgálaton alapuló eltérés
- nem elérhető/nem vizsgált minta

28. ábra. Az *IGHV* mutációs státuszt, a citogenetikai eltéréseket, valamint pontmutációkat bemutató hőtérkép. Minden beteg hordoz kedvezőtlen prognózissal társuló *TP53* defektust, valamint az esetek zöme nem mutált *IGHV* génnel rendelkezik (*IGHV-U*).

14. táblázat. A mintapárokban azonosított *TP53* mutációk

Beteg	<i>TP53</i> mutáció (CLL)					<i>TP53</i> mutáció (RS)				
	cDNS csere	Aminosavcsere	VAF (%)	COSMIC	Funkcionális hatás	cDNS csere	Aminosavcsere	VAF (%)	COSMIC	Funkcionális hatás
B1	c.533delA	p.H178Pfs*69	1,8%	COSM6960219	káros					
	c.533delinsCC	p.H178Pfs*3	1,3%	új mutáció	valószínűleg káros					
	c.536A>G	p.H179R	3,2%	COSM10889	patogén			negatív		
	c.713G>A	p.C238Y	1,6%	COSM11059	patogén					
	c.814G>A	p.V272M	22%	COSM10891	patogén					
B2	c.425C>T	p.P142L	*	COSM43583	VUS	c.595G>T	p.G199*	2.9%	COSM44537	káros
						c.611A>C	p.E204A	1.1%	COSM46223	VUS
B3	c.472C>G	p.R158G	4,6%	COSM11087	káros					
	c.503A>G	p.H168R	2,1%	COSM43545	káros					
	c.652_654delGTG	p.V218del	3,7%	COSM6496	VUS	c.517G>T	p.V173L	1.6%	COSM43559	patogén
	c.747G>T	p.R249S	12%	COSM10817	patogén					
B4		nincs adat				c.466C>G	p.R156G	*	COSM45154	valószínűleg káros
B5		negatív				c.584T>C	p.I195T	*	COSM11089	patogén
B6	c.771_777delGGAAGAC	p.E258Pfs*85	8.5%	új mutáció	valószínűleg káros			negatív		

*: Kétirányú Sanger szekvenálással, jelen tanulmány keretein kívül vizsgált minták. Szemikvantitatív módszerről lévén szó, az azonosított variánsok pontos VAF-ja nem ismert, de a módszer érzékenységét (20%) meghaladja. A COSMIC azonosítók az adatbázis aktuális verzióján (v91) alapulnak. A *TP53* mutációk funkcionális hatását a Seshat adatbázis alapján határoztuk meg (verzió: 2020.05.07.).

IV.2.2.3. További genetikai eltérések és klinikai asszociációk

A második és harmadik leggyakoribb kromoszóma-aberrációnak a 13q deléció (3/6 beteg), valamint a 12-es triszómia (2/6 beteg) bizonyult. A citogenetikai eltérések a B2 beteg biállélikus 2p és 13q nyérése kivételével monoallélikusak voltak. A SALSIA P038 CLL-2 (MRC-Holland) MLPA szondakeverék a citogenetikai eltérések vizsgálatán kívül három, CLL-ben gyakran előforduló pontmutáció vizsgálatára is alkalmas. Két-két betegben azonosítottuk az *SF3B1* c.2098A>G (p.K700E), valamint a *NOTCH1* c.7541_7542delCT (p.P2514fs*4) mutációkat, míg a *MYD88* c.794T>C (p.L265P) mutáció egy betegben sem fordult elő. Az *SF3B1* és *NOTCH1* mutációk együttesen fordultak elő a B3 beteg RS mintájában. Noha a *NOTCH1* mutációk a 12-es triszómiával rendelkező esetekben dúsulnak fel, betegcsoportunkban ez a két, RT-re hajlamosító genetikai eltérés egymástól függetlenül fordult elő. A legtöbb aberrációt a B2 beteg hordozta (hat eltérést a CLL, míg tízet az RS fázisban), a kimutatott komplex kariotípus és genomikai instabilitás hozzájárult a beteg rendkívül agresszív nagysejtes transzformációjához, amely akut leukémiához hasonló klinikai képpel és kórlefojlyással járt. Az RT-re hajlamosító 9p21.3 deléciót (*CDKN2A/B* vesztés) is egyedül a B2 beteg hordozta, az eltérést mindkét mintájában azonosítottuk (28. ábra).

A betegek kórlefojlyásában markáns különbségeket tapasztaltunk, amelyek összefüggésben állnak a genetikai háttérrel. A B1, B5 és B6 betegek CLL mintáiban a *TP53* defektuson kívül csupán egy genetikai eltérést azonosítottunk (13q deléció, *SF3B1* mutáció és 12-es triszómia, a fenti sorrendben). Míg a B1 és B6 betegek 355, illetve 53 hónapos teljes követési időt követően RS-ben exitáltak, a B5 beteg 70 hónapos teljes követési idővel, 29 hónappal a transzformációt követően remisszióban van. A B6 beteg rendelkezett betegcsoportunkban a legrövidebb teljes túléléssel (53 hónap), a beteg a CLL diagnózisát követően azonnal kezelésre szorult, és az ibrutinibterápia bevezetését követően 18 hónappal transzformált PBL-be. Noha a betegben kimutatott 12-es triszómia intermedier prognózissal társul, az *IGHV-U* mutációs státusz, a sztereotíp BCR subset #1, valamint a PBL morfológiájú RT különösen kedvezőtlen kimenetelt eredményeztek. A B1 beteg kedvező prognózist jelentő 13q delécióval, valamint *IGHV-M* (csíravonali homológia: 96,14%) mutációs státusszal rendelkezett, és a CLL diagnózisát követően 12 évig nem igényelt kezelést. A kialakult RS klonális kapcsoltságot nem, viszont *IGHV-M* (csíravonali homológia: 93,51%) mutációs státuszt mutatott. A B5 beteg CLL mintájában *IGHV-U* mutációs státuszt, valamint egy RT-re hajlamosító *SF3B1* K700E mutációt azonosítottunk

alacsony VAF-fal (3%). Noha a sztereotip BCR-ek jelenléte általánosságban még kedvezőtlenebb prognózist hordoz az *IGHV-U* alcsoporton belül, a B5 betegnél kimutatott subset #6 a subset #1-hez képest kevésbé jelent kedvezőtlen kimenetelt. A klonálisan kapcsolt RT-t követően a beteg hat ciklus RB terápiában részesült az ibrutinib folyamatos szedése mellett, és 29 hónappal a RT után remisszióban van.

IV.2.2.4. Ibrutinib/venetoclax-indukált rezisztenciamutációk

A rezisztenciamutációk elsősorban a CLL progressziójában, és nem a RT-ban bírnak patogenetikai szereppel. A *BTK* C481S mutáció jelenlétét az ibrutinibkezelt betegek mintapárjaiban, míg a *BCL2* G101V és D103Y rezisztenciamutációk jelenlétét a venetoclaxkezelt betegek körében vizsgáltuk. A B1 betegből nem rendelkezünk megfelelő mennyiségű RS mintával a ddPCR elvégzéséhez, valamint a B4 beteg CLL mintája nem volt elérhető. Rezisztenciamutációkat egy betegnél sem azonosítottunk a célzott terápia bevezetése előtt. A B3, B5 és B6 ibrutinibkezelt betegek kezelés alatti (RS) mintáiban nem detektáltunk *BTK* mutációt. A B4 beteg *BTK* C481S mutációját 22 hónappal az ibrutinibkezelés bevezetését követően mutattuk ki, 0,21%-os VAF-fal. A B2 beteg negyven hónappal az ibrutinibterápia bevezetését követően progrediált, ekkor 11,9%-os VAF-fal detektáltuk *BTK* C481S mutációját. A progressziót követően 12 hónappal lépett fel RT, ezt megelőzően rituximab-ibrutinib-venetoclax hármas kombinációs kezelésben részesült. A RT idején a *BTK* C481S VAF-ja 0,95%-ra csökkent, míg a venetoclaxterápia által indukált *BCL2* G101V rezisztenciamutációt 4,6%-os VAF-fal azonosítottuk.

V. ÚJ MEGFIGYELÉSEK

1. CLL-ben a *BTK* és *TP53* mutációk alternáló klonális dinamikával jellemezhetők, ibrutinibkezelés hatására a rezisztenciamutációk megjelenésével párhuzamosan eliminálódnak a *TP53* mutációi.
2. A rezisztenciamutációk térbeli heterogenitást mutathatnak, és akár egy évvel a klinikai relapszust megelőzően már kimutathatók szenzitív módszerekkel, így többféle lokalizációban történő tesztelésük kritikus a terápiaváltásra való felkészülés szempontjából.
3. A kanonikus mutációs forrópontokon kívül négy, korábban le nem írt *BTK* mutációt (R28, G164, R490, Q516) és három *PLCG2* mutációt (F82, R694, S1192) azonosítottunk, amelyek ibrutinibkezelés hatására jelentek meg.
4. A célzott terápiák talaján kialakuló Richter-szindrómás (RS) esetek mindegyikében igazoltunk egy vagy több, transzformációra hajlamosító genetikai eltérést. Venetoclax-kezelés talaján kialakult RS-ben tudomásunk szerint elsőként írtunk le klasszikus *BCL2* G101V rezisztenciamutációt.
5. A célzott terápiák mellett kialakuló RS morfológiailag sokszínű, plazmablasztos limfómát, „null fenotípusú” high-grade limfómát és DLBCL/cHL kevert fenotípusú limfómát is azonosítottunk.

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1. Ibrutinib-indukált klonális evolúció vizsgálata

A BTK inhibitor ibrutinib forradalmasította a CLL kezelését, legfőképp a R/R, illetve a TP53 defektussal bíró betegekben(182). Mivel az ibrutinibkezelés hatására létrejövő klonális dinamikáról és az átalakuló mutációs összetételről kevés adat állt rendelkezésre a szakirodalomban, munkánk során célul tűztük ki ezek vizsgálatát ultramély NGS-sel, klinikai tanulmány keretein kívül kezelt húszfős betegpopulációban.

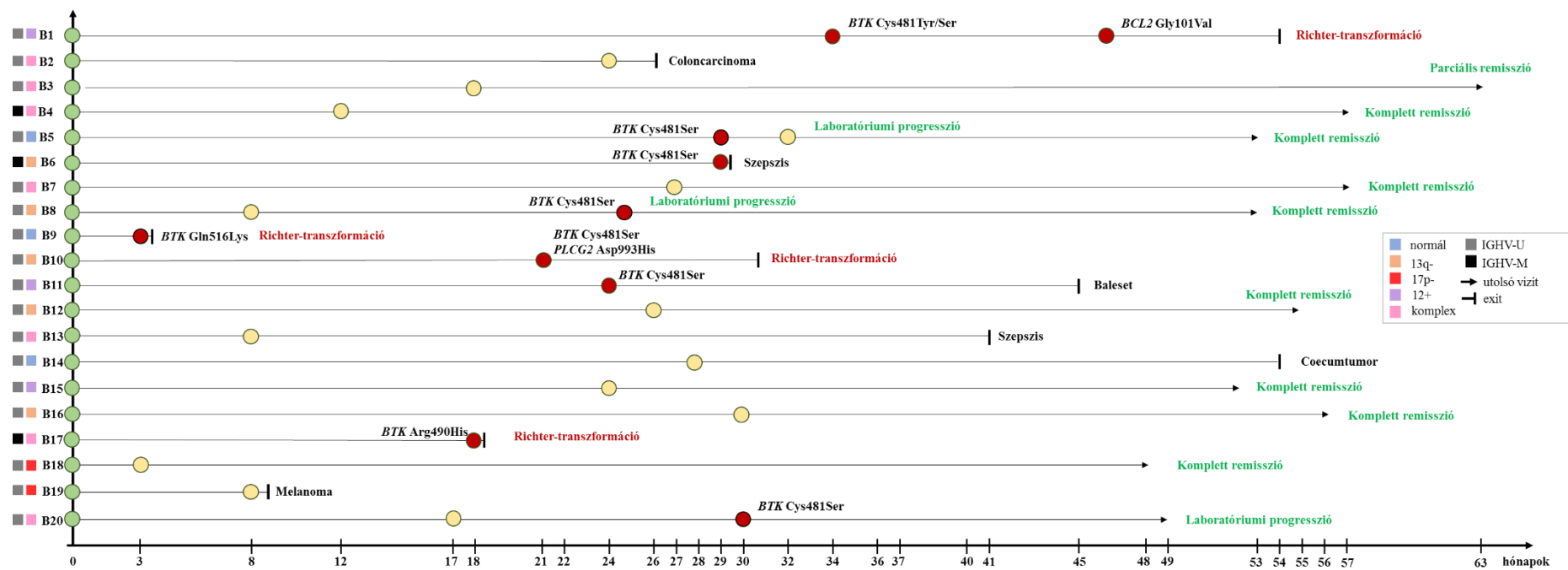
Az ibrutinibkezelés hatására betegenként eltérő, egyedi mutációs mintázatokat és szubklonális dinamikát figyeltünk meg. Míg a kemoimmunoterápia hatására a CLL patogenezisében szerepet játszó fő driver gének mutációi (*TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*) dúsulnak fel, az ibrutinibkezelt betegek körében hasonló jelenség nem volt azonosítható. A BTK inhibitorral kezelt körében detektált mutációk háromnegyede szubklonális variánsnak bizonyult, ami egybecseng mások eredményeivel, miszerint a szubklonális mutációk CLL-ben a klonálisaknál gyakoribbak, és a nagyfokú szubklonális heterogenitás rontja a betegek prognózisát(90). Kemorefrakter esetekben szintén összetettebb szubklonális heterogenitást és kedvezőtlenebb kimenetelt figyeltünk meg, a korábban nem kezelt betegekkel összehasonlítva(183).

Noha az ibrutinib a *TP53* defektust hordozó betegekben is nagyon jó terápiás választ hoz létre(110), amely a *TP53* aberrációt nem hordozó esetekét megközelíti, az előbbi csoportba tartozók mégis gyakrabban relabálnak, amely a *TP53* dereguláció hátterében komplex biológiai mechanizmust sejtet. Tanulmányunkban a *TP53* mutációk sokszínű klonális dinamikáját figyelhettük meg, amely magában foglalta egyes mutációk redukcióját vagy eliminációját, expanszióját, illetve az eliminált szubklon helyében egy, a korábitól eltérő mutáció expanszióját. A megfigyelés az egyes *TP53* mutációk eltérő ibrutinibérzékenységére és nagy evolúciós potenciáljára utal. A szubklonális összetétel vizsgálata során a *BTK* és *TP53* mutációk új, ellentétes irányú mintázatát azonosítottuk. A *BTK* mutációk többsége a *TP53* mutáns szubklonok redukcióját vagy eliminációját követően jelent meg, illetve perzisztáló vagy expandáló *TP53* mutáns szubklon mellett nem figyeltünk meg *BTK* mutációt. Noha ezen megfigyelés kiterjedtebb betegpopuláción való megerősítése szükséges, feltételezésünk alapján egyrészt a *TP53* mutáns szubklonok eliminációja a *BTK* mutáns szubklonok expansziójának előfeltétele lehet, másrészt a hosszú ideig tartó ibrutinibterápia (betegcsoportunkban 2,5-3 év) során a *TP53* mutáns szubklonok fokozatosan

eliminálódnak az ibrutinib hatására, miközben a *BTK* mutáns szubklónok egyre inkább teret nyernek.

Betegeink 35%-a (7/20) relabált *BTK* vagy *PLCG2* mutációval 36,5 hónapos medián követési idő alatt. Tanulmányunkban megerősítettük a *BTK* és *PLCG2* mutációk központi szerepét az ibrutinibrezisztenciában, valamint két ibrutinibrezisztens és gyorsan progrediáló betegben két új, korábban le nem írt *BTK* mutációt (R490H és Q516K) azonosítottunk. Igazoltuk, hogy a rezisztenciamutációk a klinikai relapszus előtt több hónappal, akár egy évvel is már kimutathatók, ezért kiemelt jelentőséggel bír a korai és érzékeny módszerrel (például ddPCR-rel) történő detektálásuk. A *BTK* és *PLCG2* gének mutációs forrópontjainak teljes exomszekvenáláson alapuló első leírását követően(113, 184) számos, ún. nem kanonikus mutációt is azonosítottak a két génben, zömmel alacsony allélaránnyal(169, 185). Mivel a későbbi tanulmányok gyakran csak a mutációs forrópontok vizsgálatára szorítkoztak, illetve alacsony mélységű NGS-t használtak, az ibrutinibrezisztencia háttérében álló komplex mutációs összetétel alábecsülhető. A tanulmányunkban azonosított két új, feltehetőleg a rezisztenciában szerepet játszó *BTK* mutáció mutatja, hogy a mutációs forrópontok vizsgálata helyett a gének teljes kódoló régiójának nagy mélységű szekvenálása további értékes, klinikailag releváns információt nyújthat. Továbbá, mivel az eltérő kompartmentek (perifériás vér, nyirokcsomó, csontvelő) gyakran térbeli heterogenitást mutatnak genetikai szempontból, részletes vizsgálatuk a CLL-es betegek még precízebb jellemzését teheti lehetővé(180). Az általunk közölt betegben azonosított térbeli heterogenitás a CLL progressziójához és transzformációjához vezetett, amely alátámasztja a jelentőségét a perifériás véren kívüli egyéb érintett lokalizációk vizsgálatának és így a rezisztencia pontosabb előrejelzésének.

A betegcsoport kórlefolyását a tanulmányban szereplő, bővített követési időn túl is vizsgáltuk. Ötvenegy hónapos medián követési idő (intervallum: 3-63 hónap) alatt a betegek fele hunyt el. Négyen a CLL progressziójaként fellépő RT miatt, hatan pedig a stabil CLL mellett fellépő egyéb halálok (szepszis, baleset, illetve másodlagos malignitás) miatt veszítették életüket. Ibrutinibrezisztencia-mutációt kilenc betegben azonosítottunk. A mutáció kimutatását követően az alapbetegségtől függetlenül bekövetkezett elhalálozások, valamint a B5 beteg kivételével klinikai relapszus lépett fel, és megtörtént, illetve hamarosan megtörténik a venetoclaxterápiára való váltás. Rezisztenciamutációt nem hordozó betegekben nem tapasztaltunk CLL progressziót, illetve RT-t (29. ábra).



29. ábra. A betegcsoport mintavételi időpontjait és alapvető genetikai, valamint klinikai jellemzőit bemutató, bővített idővonal. A zöld körök jelölik az ibrutinibkezelés 0. napján vett mintákat, a sárga, illetve piros körök pedig az ibrutinibkezelés során vett mintákat. A piros körök jelölik az ibrutinib- és/vagy venetoclaxrezisztencia-mutációkat.

VI.2. Ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegek Richter-transzformációjának vizsgálata

A BTK inhibitor ibrutinibbel, valamint a BCL2 gátló venetoclaxszal elért kimagasló eredmények ellenére ezen terápiák szelekciós nyomására is bekövetkezik a daganatsejtek klonális evolúciója, a hagyományos kemoimmunoterápiához hasonlóan. Ez a klonális evolúció progresszió, relapszus, valamint transzformáció képében nyilvánulhat meg. A kemoimmunoterápia alatt kialakuló RS genetikai háttere széleskörű irodalommal bír, viszont az ibrutinib- és venetoclax-indukált RS háttérben álló genetikai változások kevésbé ismertek.

Noha a RS molekuláris és radiológiai jellemzőiről egyre több ismerettel rendelkezünk, a szövettani elemzés elengedhetetlen az RS diagnózisának felállításához. Továbbá, az immunmorfológia gyakran összefügg az RS molekuláris és klinikai tulajdonságaival. A citotoxikus terápiák korszakában a PBL irányú transzformáció különösen ritkán fordult elő CLL-ben(186). Ezzel szemben négy, ibrutinibkezelés alatt RT-n átesett beteg fele mutatott PBL morfológiát(187), valamint egy további esetet mások is leírtak(169). Az ibrutinibkezelés alatt CLL-es betegek PBL irányú transzformációjának háttérben álló molekuláris mechanizmusok nem tisztázottak. A PBL esetek nagy része extranodális megjelenésű, és *de novo* alakulnak ki immundeficiencia, illetve EBV-pozitivitás talaján. A szekunder módon kialakuló esetek monoklonális *IGH*(145), valamint *MYC*(188) átrendeződést mutatnak, illetve 12-es triszómia is előfordul(189), az általunk bemutatott B6 beteghez hasonlóan. Mivel a BTK expresszió plazmasejtekben downregulált(190), az ibrutinibkezelés alatt CLL-ben megfigyelhető plazmablasztos transzformáció a BTK gátlás alól történő menekülést jelenthet, rezisztenciamutáció kialakulása nélkül. Ezen feltételezésnek megfelelően, a B6 beteg, valamint egyéb, közölt esetek sem hordoznak *BTK* C481S mutációt(187).

A *BTK* és *PLCG2* génekben kialakuló rezisztenciamutációk állnak leggyakrabban a CLL progressziójának a háttérben(130, 169). Az ibrutinibterápia alatt a betegek 5-7,3%-ában alakul ki RS, általában 17-24 hónappal a terápia kezdetét követően(191). Az általunk vizsgált betegpopulációban az irodalmi adatokkal egyezően ez az időtartam medián 20 hónapnak bizonyult. Míg a CLL progressziójának a háttérben az esetek 80%-ában állnak rezisztenciamutációk, a RT betegek között csupán 40%-ban fordulnak elő(177, 192). A jelenség magyarázatául szolgálhat, hogy a transzformációt mutató szövetek (nyirokcsomó, illetve extranodális szervek) mintavétel céljából a perifériás vérnél nehezebben hozzáférhetők, továbbá az, hogy

a CLL progresszió és RT háttérében eltérő biológiai mechanizmusok is állnak. Betegcsoportunkban az ibrutinibkezelés alatt transzformált betegek 40%-ában (2/5) azonosítottunk *BTK* C481S mutációt, amely gyakoriság a szakirodalomnak megfelel. Nem kizárható azonban a gyakoriság alulbecslése, ugyanis tanulmányunkban egyéb *BTK*, valamint *PLCG2* mutációk jelenlétét nem vizsgáltuk.

Venetoclaxkezelt betegeink körében a terápia bevezetésétől számított medián 8,5 hónap alatt alakult ki RT. Ehhez hasonlóan 41, többszörösen előkezelt és progresszív CLL-es beteg közül 18-an transzformáltak venetoclaxterápia alatt, közülük 11-en a kezelés első évében(120). A magas transzformációs ráta kevésbé előkezelt betegcsoportban viszont nem volt megfigyelhető(124). A venetoclaxkezelt betegek korai progressziójának kockázati tényezői a fludarabin-refrakteritás, valamint a komplex kariotípus. Az általunk vizsgált B2 betegnél szintén a komplex kariotípus járulhatott hozzá a korai transzformációhoz és az agresszív kórlefofolyáshoz. Továbbá, venetoclaxterápia alatti CLL progresszió és RT háttérében számos aberrációt azonosítottak, amelyek a *BTG1*, *TP53*, *CDKN2A/B*, *SF3B1* és *BRAF* génekben fordulnak elő(193). Legjobb tudásunk szerint napjainkig mindössze egy RS eset háttérében azonosítottak rezisztenciát okozó *BCL2* mutációt (R107_R110dup), az általunk azonosított G101V mutáció a szakirodalomban RS-ben nem, csupán CLL progresszió háttérében került leírásra(128).

Több eltérés, amelyet CLL mintáinkban azonosítottunk, nem volt jelen a kapcsolódó RS mintákban, melynek oka az lehet, hogy a transzformációs potenciállal bíró szubklónok növekedési előnyre tettek szert az egyéb szubklónokkal szemben. Míg a B3 betegben CLL fázisban azonosított, kedvező prognózissal társuló 13q deletált szubklón eliminálódott, a transzformációra hajlamosító *SF3B1* K700E mutációt hordozó szubklón megjelent az RS fázisban. Továbbá, a jelen tanulmányunkban szereplő összes beteg (6/6) hordozott *TP53* defektust (17p deléción és/vagy *TP53* mutáció formájában), körükben a *TP53* mutációk változó szubklonális dinamikáját azonosítottuk, ibrutinibkezelt CLL-es betegcsoportban tett korábbi megfigyeléseinkhez hasonlóan(130). Ibrutinibkezelt betegekben a *TP53* mutációk gyakoriak, de nem elengedhetetlenek a CLL progressziójának és transzformációjának háttérében, különösen akkor, amikor rezisztenciamutáció is azonosítható(177).

Tanulmányunk alátámasztja a célzott terápia talaján kialakuló RS morfológiai és molekuláris vizsgálatának jelentőségét. Betegeink mindegyike hordozott legalább egy, RT-re hajlamosító eltérést, amelyek megegyeztek a kemoimmunoterápia során kialakuló RS kockázati tényezőivel (*IGHV-U*, sztereotip BCR, *TP53* defektus,

12-es triszómia, *CDKN2A/B* vesztés, *MYC* aberrációk, *NOTCH1* és *SF3B1* mutációk). A *BTK* és *PLCG2* génekben kialakuló rezisztenciamutációk RT-hez vezethetnek, viszont asszociációjuk nem olyan kifejezett, mint CLL progressziója, illetve relapszus során. Legjobb tudásunk szerint jelen tanulmányban azonosítottuk az első *BCL2* G101V mutációt venetoclaxkezelt betegben kialakuló RS háttérében(194).

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az ibrutinibkezelt CLL klonális evolúciójának vizsgálata során a mutációk betegenként eltérő klonális dinamikáját azonosítottuk, a detektált variánsok háromnegyede szubklonálisnak bizonyult.
2. A leggyakrabban mutációt hordozó gének a *NOTCH1*, az *ATM* és a *TP53* voltak.
3. Ibrutinibkezelés hatására feldúsultak a *BIRC3* és *SF3B1* gének mutációi, míg a *BTK* és *PLCG2* gének rezisztenciamutációi kizárólag a poszt-ibrutinib mintákban jelentek meg, és a CLL progressziójával jártak együtt.
4. A *BTK* és *TP53* mutációk alternáló klonális dinamikával jellemezhetők, ibrutinibkezelés hatására a rezisztenciamutációk megjelenésével párhuzamosan eliminálódnak a *TP53* mutációi.
5. A rezisztenciamutációk térbeli heterogenitást mutathatnak, és akár egy évvel a klinikai relapszust megelőzően már kimutathatók szenzitív módszerekkel, így többféle lokalizációban történő, rendszeres vizsgálatuk kritikus fontosságú a későbbi terápiaváltásra való felkészülés szempontjából.
6. Az ibrutinib/venetoclax-kezelt CLL-es betegekben kialakuló Richter-szindróma többségében klonálisan kapcsolt az *IGHV-D-J* átrendeződés alapján.
7. A célzott terápiák talaján kialakuló Richter-szindróma esetek mindegyike hordozott egy vagy több, transzformációra hajlamosító genetikai eltérést.
8. A rezisztenciamutációk szerepe kevésbé jelentős a Richter-transzformációban, mint a CLL progressziójában.
9. Venetoclaxkezelt CLL talaján kialakuló Richter-szindrómában azonosítottuk tudomásunk szerint elsőként a klasszikus *BCL2* G101V rezisztenciamutációt.
10. A célzott terápiák mellett kialakuló Richter-szindróma morfológiailag sokszínű, plazmablasztos limfómát, „null fenotípusú” high-grade limfómát és DLBCL/cHL kevert fenotípusú limfómát is azonosítottunk.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus limfocitás leukémia (CLL) a fejlett világ leggyakoribb felnőttkori leukémiája, amely rendkívül heterogén klinikai lefolyással bír. Az elmúlt évek új generációs szekvenálási (NGS) tanulmányainak köszönhetően a CLL genetikai hátterét nagyrészt megismertük, viszont az innovatív, célzott terápiák (ibrutinib, venetoclax) által indukált genetikai változások felderítése további vizsgálatokat igényel.

Tanulmányunkban húsz, klinikai vizsgálat keretein kívül a BTK inhibitor ibrutinibbel kezelt beteg kezelés előtti és alatti mintáit vizsgáltuk NGS-sel. Kifejezett szubklonális heterogenitást és betegenként eltérő mutációs összetételt azonosítottunk. A mutációk többsége szubklonálisnak bizonyult, a leggyakrabban mutációt hordozó gének az *ATM*, a *TP53* és a *NOTCH1* voltak. A CLL progressziójának hátterében a *BTK* és *PLCG2* gének rezisztenciamutációit azonosítottuk, két betegben írtunk le új, korábban nem publikált *BTK* mutációt. Az ibrutinibkezelés hatására a rezisztenciamutációk feldúsultak, miközben az eredetileg jelenlévő *TP53* mutációk redukcióját, illetve eliminációját figyeltük meg. A rezisztenciamutációknak az igen szenzitív droplet digitális PCR módszerrel történő korai kimutatása előjelzi a későbbi klinikai relapszust, és lehetőséget nyújt a célzott terápiaváltás előkészítésére.

A CLL-es betegek egy részében agresszív lefolyású, nagysejtes transzformáció (Richter-szindróma, RS) lép fel, amely nagy terápiás kihívással és kedvezőtlen kimenetellel jár. A kemoimmunoterápia mellett kialakuló RS kockázati tényezői között több genetikai eltérés ismert, viszont a célzott terápiák talaján kialakuló RS genetikai összetétele számos megválaszolatlan kérdést hordoz. Tanulmányunkban genetikai, valamint morfológiai szempontból vizsgáltuk az ibrutinib- és a BCL2-gátló venetoclaxterápia mellett fellépő RS-t hat beteg alapján. Az összes esetben azonosítottunk legalább egy, RS-re hajlamosító genetikai eltérést. A rezisztenciamutációk asszociációja a transzformációval kevésbé kifejezett, mint CLL progressziója során. A vizsgált négy esetből három klonális kapcsoltságot mutatott, a kedvezőtlen prognózissal járó *IGHV-U* mutációs státusz mellett. A transzformációt morfológiailag elemezve, az esetek felében a leggyakrabban előforduló diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) morfológiától eltérő szövettani típusokat azonosítottunk, valamint tudomásunk szerint elsőként írtuk le RS-ben a *BCL2* G101V venetoclax-rezisztenciamutációt.

IX. SUMMARY

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent adulthood leukemia in the developed countries, characterized by a highly heterogeneous clinical course. The genetic background of CLL has been revealed by the next-generation sequencing studies of recent years, however, genetic changes induced by new, targeted therapies (e.g. ibrutinib and venetoclax) should be further elucidated.

In our study we analyzed the pre-treatment and post-treatment samples of twenty patients treated with the BTK inhibitor ibrutinib outside the setting of a clinical trial. Marked subclonal heterogeneity and individual patterns of mutational composition were identified. The majority of detected variants proved to be subclonal, with *ATM*, *TP53* and *NOTCH1* genes being the most frequently mutated. We strengthened the role of ibrutinib resistance mutations in *BTK* and *PLCG2* genes in CLL progression, and described two novel, previously unreported *BTK* mutations associated with progression. During ibrutinib therapy, *TP53* mutations were reduced or eliminated simultaneously with the emergence of resistance mutations. The early and sensitive detection of *BTK* and *PLCG2* mutations by droplet digital PCR predates the following clinical relapse and gives an opportunity to switch therapeutic modalities in time.

Richter syndrome (RS) means the large cell transformation of CLL, occurring only in a small fraction of patients, but leading to aggressive clinical course, therapeutic challenges and unfavourable outcome. The genetic risk factors of RS development under chemoimmunotherapy is well-known, but the molecular background of RS developing during targeted therapies needs to be clarified. We analyzed the genetic and morphologic patterns of Richter transformation in six patients treated with ibrutinib or with the BCL2-inhibitor venetoclax. Genetic lesions predisposing to RS were identified in every case, resistance mutations occurred less frequently in transformation compared to CLL progression. Three out of four cases with successful analysis of *IGHV-D-J* rearrangement proved to be clonally related and *IGHV* unmutated, meaning an unfavorable prognosis. We detected non-DLBCL morphologic subtypes in 3/6 cases. To our best knowledge, we identified the *BCL2* G101V venetoclax resistance mutation in RS for the first time.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343: 1910-1916.
2. Matolcsy A, Udvardy M, Kopper L. Hematológiai betegségek atlasza. Medicina, Budapest, 2006: 49-50.
3. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffman R, Rosenberg N, Tonegawa S, Baltimore D. (1984) Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J*, 3: 1209-1219.
4. Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302: 575-581.
5. van der Burg M, Barendregt BH, Szczepański T, van Wering ER, Langerak AW, van Dongen JJ. (2002) Immunoglobulin light chain gene rearrangements display hierarchy in absence of selection for functionality in precursor-B-ALL. *Leukemia*, 16: 1448-1453.
6. van der Burg M, Tümkaya T, Boerma M, de Bruin-Versteeg S, Langerak AW, van Dongen JJ. (2001) Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood*, 97: 1001-1008.
7. Basso K, Dalla-Favera R. (2015) Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, 15: 172-184.
8. Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Köchert K, Sleckman BP, de Alborán IM, Janz M, Rodig S, Rajewsky K. (2012) The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol*, 13: 1092-1100.
9. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R. (2012) The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol*, 13: 1083-1091.
10. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, Elemento O. (2010) EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*, 116: 5247-5255.
11. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*, 15: 160-171.

12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127: 2391-2405.
13. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127: 2375-2390.
14. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 341: 1520-1529.
15. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-511.
16. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. (2012) Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, 120: 2240-2248.
17. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. (2018) Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 391: 1524-1537.
18. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. (2009) Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 94: 647-653.
19. Hallek M. (2015) Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 90: 446-460.
20. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C. (2015) Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 26 Suppl 5: 78-84.
21. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai KR, Byrd JC, Eichhorst B, O'Brien S, Robak T, Seymour JF, Kipps TJ. (2018) iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131: 2745-2760.

22. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D, Brown J, Chanan-Khan AA, Chavez JC, Coutre SE, Davis RS, Fletcher CD, Hill B, Kahl BS, Kamdar M, Kaplan LD, Khan N, Kipps TJ, Lim MS, Ma S, Malek S, Mato A, Mosse C, Shadman M, Siddiqi T, Stephens D, Sundaram S, Wagner N, Dwyer M, Sundar H. (2020) Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 4.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 18: 185-217.
23. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. (1998) Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*, 51: 364-369.
24. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. (1998) The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8: 1640-1645.
25. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. (1997) Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, 108: 378-382.
26. Hallek M. (2019) Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, 94: 1266-1287.
27. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de Tute R, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. (2008) Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 359: 575-583.
28. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, Marti GE, Caporaso NE. (2009) B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 360: 659-667.
29. García-Muñoz R, Roldan Galiacho V, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. (2012) *Ann Hematol*, 91: 981-996.
30. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. (2011) Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 20: 246-259.
31. Chiorazzi N, Ferrarini M. (2011) Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*, 117: 1781-1791.

32. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. (2011) Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70. *J Exp Med*, 208: 67-80.
33. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. (2012) The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120: 1175-1184.
34. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M, Chevalier N, Vallat L, Timmer J, Gribben JG, Jumaa H, Veelken H, Dierks C, Zirlik K. (2009) Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, 69: 5424-5432.
35. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. (2005) Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*, 115: 369-378.
36. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, Cassuto JP, Ticchioni M, Deckert M. (2009) The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene*, 28: 3261-3273.
37. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, Jones J, Andritsos L, Puri KD, Lannutti BJ, Giese NA, Zhang X, Wei L, Byrd JC, Johnson AJ. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*, 116: 2078-2088.
38. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C, Decker T. (2002) Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood*, 100: 3741-3748.
39. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, Flynn J, Jones J, Blum KA, Buggy JJ, Hamdy A, Johnson AJ, Byrd JC. (2011) Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*, 117: 6287-6296.
40. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. (1990) Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*, 323: 720-724.

41. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Böttcher S, Carter SL, Cibulskis K, Mertens D, Sougnez CL, Rosenberg M, Hess JM, Edelman J, Kless S, Kneba M, Ritgen M, Fink A, Fischer K, Gabriel S, Lander ES, Nowak MA, Döhner H, Hallek M, Neuberg D, Getz G, Stilgenbauer S, Wu CJ. (2015) Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526: 525-530.
42. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 13944-13949.
43. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R. (2010) The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 17: 28-40.
44. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, Li J, Li C, Shedden K, Malek SN. (2011) The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 17: 6778-6790.
45. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, Arcaini L, Lucioni M, Rocque GB, Xu-Monette ZY, Visco C, Chang J, Chigrinova E, Forconi F, Marasca R, Besson C, Papadaki T, Paulli M, Larocca LM, Pileri SA, Gattei V, Bertoni F, Foa R, Young KH, Gaidano G. (2011) The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*, 117: 3391-3401.
46. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, Buhler A, Edelman J, Bergmann M, Hopfinger G, Hensel M, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. (2010) TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 28: 4473-4479.
47. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, et al. (1995) p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 85: 1580-1589.
48. Bosch F, Dalla-Favera R. (2019) Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*, 16: 684-701.
49. Yu L, Kim HT, Kasar S, Benien P, Du W, Hoang K, Aw A, Tesar B, Impropgo R, Fernandes S, Radhakrishnan S, Klitgaard J, Lee C, Getz G, Setlur SR, Brown JR.

(2017) Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation. *Clin Cancer Res*, 23: 735-745.

50. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AM, Fegan C, Moss P, Stankovic T. (2005) Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*, 106: 3175-3182.

51. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, Chiaretti S, Del Giudice I, Fabbri G, Brusca A, Spina V, Deambrogi C, Marinelli M, Famà R, Greco M, Daniele G, Forconi F, Gattei V, Bertoni F, Deaglio S, Pasqualucci L, Guarini A, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. (2012) Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119: 2854-2862.

52. Stankovic T, Skowronska A. (2014) The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 55: 1227-1239.

53. Santos FP, O'Brien S. (2012) Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they the same disease? *Cancer J*, 18: 396-403.

54. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, Tsanousa A, Scarfò L, Davis Z, Yan XJ, Shanafelt T, Plevova K, Sandberg Y, Vojdeman FJ, Boudjogra M, Tzenou T, Chatzouli M, Chu CC, Veronese S, Gardiner A, Mansouri L, Smedby KE, Pedersen LB, van Lom K, Giudicelli V, Francova HS, Nguyen-Khac F, Panagiotidis P, Juliusson G, Angelis L, Anagnostopoulos A, Lefranc MP, Facco M, Trentin L, Catherwood M, Montillo M, Geisler CH, Langerak AW, Pospisilova S, Chiorazzi N, Oscier D, Jelinek DF, Darzentas N, Belessi C, Davi F, Rosenquist R, Ghia P, Stamatopoulos K. (2014) Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol*, 1: 74-84.

55. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, Laurenti L, Marasca R, Rasi S, Fangazio M, Guarini A, Gaidano G, Foa R. (2012) NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*, 97: 437-441.

56. Tsagiopoulou M, Chapaprieta V, Duran-Ferrer M, Moysiadis T, Psomopoulos F, Kollia P, Papakonstantinou N, Campo E, Stamatopoulos K, Martin-Subero JI. (2020)

Chronic lymphocytic leukemias with trisomy 12 show a distinct DNA methylation profile linked to altered chromatin activation. *Haematologica*, 105: 2864-2867.

57. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, Davi F, Pospisilova S, Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Oscier D. (2014) Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*, 89: 249-255.

58. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. (2007) Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, 21: 2442-2451.

59. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Buhler A, Zenz T, Bullinger L, Kuhn MW, Gerhardinger A, Bloehdorn J, Radtke I, Su X, Ma J, Pounds S, Hallek M, Lichter P, Korbel J, Busch R, Mertens D, Downing JR, Stilgenbauer S, Dohner H. (2012) High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 120: 4783-4794.

60. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM, Strefford JC, Oscier D, Stamatopoulos K, Papadaki T, Berger F, Young KH, Murray F, Rosenquist R, Greiner TC, Chan WC, Orlandi EM, Lucioni M, Marasca R, Inghirami G, Ladetto M, Forconi F, Cogliatti S, Votavova H, Swerdlow SH, Stilgenbauer S, Piris MA, Matolcsy A, Spagnolo D, Nikitin E, Zamo A, Gattei V, Bhagat G, Ott G, Zucca E, Gaidano G, Bertoni F. (2013) Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*, 122: 2673-2682.

61. Jarosova M, Hrubá M, Oltová A, Plevová K, Kruzová L, Kriegová E, Fillerová R, Koritáková E, Doubek M, Lysák D, Procházka V, Mraz M, Indrak K, Papajik T. (2017) Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*, 92: 604-607.

62. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicelli V, Lefranc MP, Langerak AW, Belessi C, Davi F, Stamatopoulos K. (2017) Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*, 31: 1477-1481.

63. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjoghrah M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F,

Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Béral H, Ghia P, Davi F. (2007) Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, 109: 259-270.

64. Condoluci A, Rossi D. (2019) Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment. *Exp Rev Hematol*, 12: 89-98.

65. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152: 714-726.

66. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JM, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjose S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, Campo E (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475: 101-105.

67. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco EG, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. (2011) SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 365: 2497-2506.

68. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, Pekarsky Y, Croce CM. (2012) NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*, 119: 329-331.

69. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foá R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G. (2011) Analysis of the

chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*, 208: 1389-1401.

70. Landau DA, Wu CJ. (2013) Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med*, 5: 47.

71. Leroy B, Anderson M, Soussi T. (2014) TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*, 35: 672-688.

72. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250: 1233-1238.

73. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14: 359-370.

74. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, Kater AP, Niemann CU, Gonzalez D, Davi F, Gonzalez Diaz M, Moreno C, Gaidano G, Stamatopoulos K, Rosenquist R, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S, European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) - TP53 network. (2018) ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*, 32: 1070-1080.

75. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, Donehower LA, El-Deiry WS, Fenaux P, Gaidano G, Langerød A, Hellstrom-Lindberg E, Iggo R, Lehmann-Che J, Mai PL, Malkin D, Moll UM, Myers JN, Nichols KE, Pospisilova S, Ashton-Prolla P, Rossi D, Savage SA, Strong LC, Tonin PN, Zeillinger R, Zenz T, Fraumeni JF, Jr., Taschner PE, Hainaut P, Soussi T. (2017) Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice. *Cancer Res*, 77: 1250-1260.

76. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JI, Munar M, Rubio-Perez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpi JL, Gonzalez B, Gonzalez S, Gonzalez M, Gut M, Hernandez-Rivas JM, Lopez-Guerra M, Martin-Garcia D, Navarro A, Nicolas P, Orozco M, Payer AR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queiros AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russinol N, Salaverria I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, Lopez-Bigas

- N, Torrents D, Gut I, Lopez-Guillermo A, Lopez-Otin C, Campo E. (2015) Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526: 519-524.
77. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, Bühler A, Böttcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jäger U, Patten N, Wu L, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner CM, Fink AM, Fischer K, Busch R, Hallek M, Döhner H. (2014) Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*, 123: 3247-3254.
78. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, Böttcher S, Staib P, Kiehl M, Eckart MJ, Kranz G, Goede V, Elter T, Bühler A, Winkler D, Kneba M, Döhner H, Eichhorst BF, Hallek M, Wendtner CM. (2011) Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, 29: 3559-3566.
79. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jager U, Pospisilova S, Rosenquist R, Schuh A, Stilgenbauer S. (2018) TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica*, 103: 1956-1968.
80. Marosvari D, Alpar D, Kiraly AP, Rajnai H, Reiniger L, Bodor C. (2016) [The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia]. *Magy Onkol*, 60: 118-125.
81. Gaidano G, Foà R, Dalla-Favera R. (2012) Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 122: 3432-3438.
82. Wan Y, Wu CJ. (2013) SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121: 4627-4634.
83. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. (2011) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478: 64-69.
84. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Bea S, Pinyol M, Martinez-Trillos A, Lopez-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Gine E, Hernandez JM, Gonzalez-Diaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubio JM, Royo R, Gelpi JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vazquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayes M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, Lopez-Guillermo A, Puente XS, Campo E, Lopez-

- Otin C. (2011) Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 44: 47-52.
85. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambrogi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. (2011) Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 118: 6904-6908.
86. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. (2017) Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 31: 282-291.
87. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabani H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. (2013) Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121: 1403-1412.
88. Group TIC-IW. (2016) An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 17: 779-790.
89. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. (2014) SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, 28: 108-117.
90. Nadeu F, Clot G, Delgado J, Martín-García D, Baumann T, Salaverria I, Beà S, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Suárez-Cisneros H, Aymerich M, Rozman M, Villamor N, Colomer D, González M, Alcoceba M, Terol MJ, Navarro B, Colado E, Payer Á R, Puente XS, López-Otín C, López-Guillermo A, Enjuanes A, Campo E. (2018) Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 32: 645-653.
91. Leukemia TFCGoCL. (1990) Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 75: 1414-1421.
92. Bhat SA, Woyach JA. (2020) Changing landscape of frontline therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 61: 525-535.

93. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S. (2010) Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 376: 1164-1174.
94. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ. (2016) Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127: 303-309.
95. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, Lange E, Köppler H, Kiehl M, Sökler M, Schlag R, Vehling-Kaiser U, Köchling G, Plöger C, Gregor M, Plesner T, Trneny M, Fischer K, Döhner H, Kneba M, Wendtner CM, Klapper W, Kreuzer KA, Stilgenbauer S, Böttcher S, Hallek M. (2016) First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*, 17: 928-942.
96. Eichhorst BF, Bahlo J, Maurer C, Lange E, Köppler H, Kiehl MG, Sökler M, Schlag R, Vehling-Kaiser U, Köchling G, Plöger C, Gregor M, Plesner T, Herling M, Fischer K, Döhner H, Kneba M, Wendtner C, Klapper W, Kreuzer K-A, Böttcher S, Stilgenbauer S, Fink AM, Hallek M. (2016) Favorable Toxicity Profile and Long Term Outcome of Elderly, but Physically Fit CLL Patients (pts) Receiving First Line Bendamustine and Rituximab (BR) Frontline Chemoimmunotherapy in Comparison to Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab (FCR) in Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Update Analysis of an International, Randomized Study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 Study). *Blood*, 128: 4382.
97. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LFC, Montillo M, Fegan C, Asikanius E, Humphrey K, Fingerle-Rowson G, Hallek M. (2015) Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*, 29:1602-1604.
98. Bruton OC. (1952) Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9: 722-728.
99. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, Sparkes RS, Kubagawa H, Mohandas T, Quan S, Belmont JW, Cooper MD, Conley ME, Witte

- ON. (2012) Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. 1993. *J Immunol*, 188: 2936-2947.
100. Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, Hammarström L, Kinnon C, Levinsky R, Bobrow M, Smith CIE, Bentley DR. (1993) The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361: 226-233.
101. Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, Largaespada DA, Grimaldi JC, Cohen L, Mohr RN, Bazan JF, Howard M, Copeland NG, et al. (1993) Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, 261: 358-361.
102. Kerner JD, Appleby MW, Mohr RN, Chien S, Rawlings DJ, Maliszewski CR, Witte ON, Perlmutter RM. (1995) Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity*, 3: 301-312.
103. Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore BF, Smith CI. (2009) Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev*, 228: 58-73.
104. Maddocks K, Jones JA. (2016) Bruton tyrosine kinase inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 43: 251-259.
105. Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, Mendonca RV, Sweeney MD, Scott KC, Grothaus PG, Jeffery DA, Spoerke JM, Honigberg LA, Young PR, Dalrymple SA, Palmer JT. (2007) Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem*, 2: 58-61.
106. Roskoski R, Jr. (2019) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res*, 144: 19-50.
107. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, Keating MJ, O'Brien S, Chiorazzi N, Burger JA. (2012) The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119: 1182-1189.
108. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA, Smith LL, Dubovsky JA, Towns WH, MacMurray J, Harrington BK, Davis ME, Gobessi S, Laurenti L, Chang BY, Buggy JJ, Efremov DG, Byrd JC, Johnson AJ. (2014) Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*, 123: 1207-1213.
109. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, Johnson AJ,

Sukbuntherng J, Chang BY, Clow F, Hedrick E, Buggy JJ, James DF, O'Brien S. (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 369: 32-42.

110. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, Herman SE, Tian X, Marti G, Soto S, Hughes TE, Jones J, Lipsky A, Pittaluga S, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Lee YS, Pedersen LB, Geisler CH, Calvo KR, Arthur DC, Maric I, Childs R, Young NS, Wiestner A. (2015) Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 16: 169-176.

111. Chanan-Khan A, Cramer P, Demirkan F, Fraser G, Silva RS, Grosicki S, Pristupa A, Janssens A, Mayer J, Bartlett NL, Dilhuydy MS, Pylypenko H, Loscertales J, Avigdor A, Rule S, Villa D, Samoiloova O, Panagiotidis P, Goy A, Mato A, Pavlovsky MA, Karlsson C, Mahler M, Salman M, Sun S, Phelps C, Balasubramanian S, Howes A, Hallek M. (2016) Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 17: 200-211.

112. Fraser G, Cramer P, Demirkan F, Silva RS, Grosicki S, Pristupa A, Janssens A, Mayer J, Bartlett NL, Dilhuydy MS, Pylypenko H, Loscertales J, Avigdor A, Rule S, Villa D, Samoiloova O, Panagiotidis P, Goy A, Pavlovsky MA, Karlsson C, Hallek M, Mahler M, Salman M, Sun S, Phelps C, Balasubramanian S, Howes A, Chanan-Khan A. (2019) Updated results from the phase 3 HELIOS study of ibrutinib, bendamustine, and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leukemia*, 33: 969-980.

113. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, Jaglowski SM, Blum KA, Lozanski A, Lozanski G, James DF, Barrientos JC, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy JJ, Chang BY, Johnson AJ, Byrd JC. (2014) Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*, 370: 2286-2294.

114. Liu L, Shi B, Wang X, Xiang H. (2018) Strategies to overcome resistance mutations of Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *Future Med Chem*, 10: 343-356.

115. Fama R, Bomben R, Rasi S, Dal Bo M, Ciardullo C, Monti S, Rossi F, D'Agaro T, Zucchetto A, Gattei V, Gaidano G, Rossi D. (2014) Ibrutinib-naive chronic

lymphocytic leukemia lacks Bruton tyrosine kinase mutations associated with treatment resistance. *Blood*, 124: 3831-3833.

116. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

117. Yalniz FF, Wierda WG. (2019) Targeting BCL2 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Other Hematologic Malignancies. *Drugs*, 79: 1287-1304.

118. Scheffold A, Jebaraj BMC, Stilgenbauer S. (2018) Venetoclax: Targeting BCL2 in Hematological Cancers. *Recent Results Cancer Res*, 212: 215-242.

119. Anderson MA, Deng J, Seymour JF, Tam C, Kim SY, Fein J, Yu L, Brown JR, Westerman D, Si EG, Majewski IJ, Segal D, Heitner Enschede SL, Huang DC, Davids MS, Letai A, Roberts AW. (2016) The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*, 127: 3215-3224.

120. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF. (2016) Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 374: 311-322.

121. Coutre S, Choi M, Furman RR, Eradat H, Heffner L, Jones JA, Chyla B, Zhou L, Agarwal S, Waskiewicz T, Verdugo M, Humerickhouse RA, Potluri J, Wierda WG, Davids MS. (2018) Venetoclax for patients with chronic lymphocytic leukemia who progressed during or after idelalisib therapy. *Blood*, 131: 1704-1711.

122. Davids MS, Hallek M, Wierda W, Roberts AW, Stilgenbauer S, Jones JA, Gerecitano JF, Kim SY, Potluri J, Busman T, Best A, Verdugo ME, Cerri E, Desai M, Hillmen P, Seymour JF. (2018) Comprehensive Safety Analysis of Venetoclax Monotherapy for Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*, 24: 4371-4379.

123. Jones JA, Mato AR, Wierda WG, Davids MS, Choi M, Cheson BD, Furman RR, Lamanna N, Barr PM, Zhou L, Chyla B, Salem AH, Verdugo M, Humerickhouse RA, Potluri J, Coutre S, Woyach J, Byrd JC. (2018) Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19: 65-75.

124. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, Owen C, Gerecitano J, Robak T, De la Serna J, Jaeger U, Cartron G, Montillo M, Humerickhouse R, Punnoose EA, Li Y, Boyer M, Humphrey K, Mobasher M, Kater

AP. (2018) Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 378: 1107-1120.

125. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Hillmen P, Seymour JF, Coutre S, Jurczak W, Mulligan SP, Schuh A, Assouline S, Wendtner CM, Roberts AW, Davids MS, Bloehdorn J, Munir T, Bottcher S, Zhou L, Salem AH, Desai M, Chyla B, Arzt J, Kim SY, Verdugo M, Gordon G, Hallek M, Wierda WG. (2018) Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*, 36: 1973-1980.

126. Blombery P, Anderson MA, Gong JN, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, Teh CE, Nguyen T, Xu Z, Flensburg C, Lew TE, Majewski IJ, Gray DHD, Westerman DA, Tam CS, Seymour JF, Czabotar PE, Huang DCS, Roberts AW. (2019) Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov*, 9: 342-353.

127. Tausch E, Close W, Dolnik A, Bloehdorn J, Chyla B, Bullinger L, Dohner H, Mertens D, Stilgenbauer S. (2019) Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104: 434-437.

128. Lucas F, Larkin K, Gregory CT, Orwick S, Doong TJ, Lozanski A, Lozanski G, Misra S, Ngankeu A, Ozer HG, Sampath D, Thangavadivel S, Yilmaz SA, Rogers KA, Byrd JC, Woyach JA, Blachly JS. (2020) Novel BCL2 mutations in venetoclax-resistant, ibrutinib-resistant CLL patients with BTK/PLCG2 mutations. *Blood*, 135: 2192-2195.

129. Blombery P. (2020) Mechanisms of intrinsic and acquired resistance to venetoclax in B-cell lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma*, 61: 257-262.

130. Gango A, Alpar D, Galik B, Marosvari D, Kiss R, Fesus V, Aczel D, Eyupoglu E, Nagy N, Nagy A, Krizsan S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Adam E, Tasnady S, Reti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Matrai Z, Bodor C. (2020) Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Int J Cancer*, 146: 85-93.

131. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, editors. *World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon, France, 2017: 180-182.

132. Richter MN. (1928) Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am J Pathol*, 4: 285-292.

133. Lortholary P, Boiron M, Ripault P, Levy JP, Manus A, Bernard J. (1964) [CHRONIC LYMPHOID LEUKEMIA SECONDARILY ASSOCIATED WITH A MALIGNANT RETICULOPATHY: RICHTER'S SYNDROME]. *Nouv Rev Fr Hematol*, 4: 621-644.
134. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Habermann TM, Ding W, Leis JF, Schwager SM, Hanson CA, Macon WR, Kay NE, Slager SL, Shanafelt TD. (2013) Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol*, 162: 774-782.
135. Rossi D, Gaidano G. (2009) Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*, 27: 1-10.
136. Jain P, O'Brien S. (2012) Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park)*, 26: 1146-1152.
137. Agbay RL, Loghavi S, Medeiros LJ, Khoury JD. (2016) High-grade Transformation of Low-grade B-cell Lymphoma: Pathology and Molecular Pathogenesis. *Am J Surg Pathol*, 40: 1-16.
138. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, Richter M, Krugmann J, Burek C, Hartmann E, Rudiger T, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Fend F, Rosenwald A. (2007) IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol*, 31: 1605-1614.
139. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bertoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Lucioni M, Martini M, Magni M, Deaglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. (2009) Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*, 15: 4415-4422.
140. Bockorny B, Codreanu I, Dasanu CA. (2012) Hodgkin lymphoma as Richter transformation in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective analysis of world literature. *Br J Haematol*, 156: 50-66.
141. Tsimberidou AM, O'Brien S, Kantarjian HM, Koller C, Hagemester FB, Fayad L, Lerner S, Bueso-Ramos CE, Keating MJ. (2006) Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*, 107: 1294-1302.

142. Ohno T, Smir BN, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Hinrichs SD, Chan WC. (1998) Origin of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells in chronic lymphocytic leukemia with "Hodgkin's transformation". *Blood*, 91: 1757-1761.
143. van den Berg A, Maggio E, Rust R, Kooistra K, Diepstra A, Poppema S. (2002) Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma. *Blood*, 100: 1425-1429.
144. de Leval L, Vivario M, De Prijck B, Zhou Y, Boniver J, Harris NL, Isaacson P, Du MQ. (2004) Distinct clonal origin in two cases of Hodgkin's lymphoma variant of Richter's syndrome associated With EBV infection. *Am J Surg Pathol*, 28: 679-686.
145. Martinez D, Valera A, Perez NS, Sua Villegas LF, Gonzalez-Farre B, Sole C, Gine E, Lopez-Guillermo A, Roue G, Martinez S, Sant F, Warzocha K, Robak T, Czader M, Villamor N, Colomo L, Campo E, Martinez A. (2013) Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases. *Am J Surg Pathol*, 37: 272-281.
146. Gounari M, Ntoufa S, Apollonio B, Papakonstantinou N, Ponzoni M, Chu CC, Rossi D, Gaidano G, Chiorazzi N, Stamatopoulos K, Ghia P. (2015) Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood*, 125: 3580-3587.
147. Rossi D, Spina V, Gaidano G. (2018) Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood*, 131: 2761-2772.
148. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, Omede P, Novero D, Morabito F, Carbone A, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. (2008) CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood*, 111: 5646-5653.
149. Parikh SA, Shanafelt TD. (2014) Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 9: 294-299.
150. Rasi S, Spina V, Brusca A, Vaisitti T, Tripodo C, Forconi F, De Paoli L, Fangazio M, Sozzi E, Cencini E, Laurenti L, Marasca R, Visco C, Xu-Monette ZY, Gattei V, Young KH, Malavasi F, Deaglio S, Gaidano G, Rossi D. (2011) A variant of the LRP4 gene affects the risk of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*, 152: 284-294.
151. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Brusca A, Cerri M, Monti S, Cresta S, Fama R, De Paoli L, Bulian P, Gattei V, Guarini A, Deaglio S, Capello D, Rabadan R, Pasqualucci L, Dalla-Favera R,

Foa R, Gaidano G. (2012) Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119: 521-529.

152. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, Ciardullo C, Fama R, Cresta S, Brusca A, Laurenti L, Martini M, Musto P, Forconi F, Marasca R, Larocca LM, Foa R, Gaidano G. (2012) Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol*, 158: 426-429.

153. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Bea S, Lopez C, Colomer D, Pinyol M, Aymerich M, Rozman M, Abrisqueta P, Baumann T, Delgado J, Gine E, Gonzalez-Diaz M, Hernandez JM, Colado E, Payer AR, Rayon C, Navarro B, Jose Terol M, Bosch F, Quesada V, Puente XS, Lopez-Otin C, Jares P, Pereira A, Campo E, Lopez-Guillermo A. (2013) NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*, 27: 1100-1106.

154. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM, Strefford JC, Oscier D, Stamatopoulos K, Papadaki T, Berger F, Young KH, Murray F, Rosenquist R, Greiner TC, Chan WC, Orlandi EM, Lucioni M, Marasca R, Inghirami G, Ladetto M, Forconi F, Cogliatti S, Votavova H, Swerdlow SH, Stilgenbauer S, Piris MA, Matolcsy A, Spagnolo D, Nikitin E, Zamo A, Gattei V, Bhagat G, Ott G, Zucca E, Gaidano G, Bertoni F. (2013) Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*, 122: 2673-2682.

155. Fabbri G, Khiabanian H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R. (2013) Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med*, 210: 2273-2288.

156. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A, Pasqualucci L, Capello D, Gaidano G. (2006) Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 91: 1405-1409.

157. Rinaldi A, Mensah AA, Kwee I, Forconi F, Orlandi EM, Lucioni M, Gattei V, Marasca R, Berger F, Cogliatti S, Cavalli F, Zucca E, Gaidano G, Rossi D, Bertoni F. (2013) Promoter methylation patterns in Richter syndrome affect stem-cell maintenance and cell cycle regulation and differ from de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 163: 194-204.

158. Van Roosbroeck K, Bayraktar R, Calin S, Bloehdorn J, Dragomir MP, Okubo K, Bertilaccio MTS, Zupo S, You MJ, Gaidano G, Rossi D, Chen SS, Chiorazzi N, Thompson PA, Ferrajoli A, Bertoni F, Stilgenbauer S, Keating MJ, Calin GA. (2019) The involvement of microRNA in the pathogenesis of Richter syndrome. *Haematologica*, 104: 1004-1015.
159. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. (2016) microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine*, 12: 34-42.
160. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. (2008) Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Hematol*, 142: 202-215.
161. Allan JN, Furman RR. (2018) Current trends in the management of Richter's syndrome. *Int J Hematol Oncol*, 7: IJH09.
162. Duong T, Grange F, Auffret N, Aractingi S, Bodemer C, Brousse N, Hermine O, Fraitag S. (2010) Cutaneous Richter's syndrome, prognosis, and clinical, histological and immunohistological patterns: report of four cases and review of the literature. *Dermatology*, 220: 226-233.
163. Michallet AS, Sesques P, Rabe KG, Itti E, Tordot J, Tychyj-Pinel C, Baseggio L, Subtil F, Salles G, Dupuis JM, Conte MJ. (2016) An 18F-FDG-PET maximum standardized uptake value > 10 represents a novel valid marker for discerning Richter's Syndrome. *Leuk Lymphoma*, 57: 1474-1477.
164. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, Wen S, Do KA, Smith SC, Lerner S, Freireich EJ, Keating MJ. (2006) Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*, 24: 2343-2351.
165. Tsimberidou AM, Wierda WG, Wen S, Plunkett W, O'Brien S, Kipps TJ, Jones JA, Badoux X, Kantarjian H, Keating MJ. (2013) Phase I-II clinical trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab therapy in aggressive relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia or Richter syndrome. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 13: 568-574.
166. Mauro FR, Galieni P, Tedeschi A, Laurenti L, Del Poeta G, Reda G, Motta M, Gozzetti A, Murru R, Caputo MD, Campanelli M, Frustaci AM, Innocenti I, Raponi S, Guarini A, Morabito F, Foa R, Gentile M. (2017) Factors predicting survival in chronic

lymphocytic leukemia patients developing Richter syndrome transformation into Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 92: 529-535.

167. Connors JM, Jurczak W, Straus DJ, Ansell SM, Kim WS, Gallamini A, Younes A, Alekseev S, Illés Á, Picardi M, Lech-Maranda E, Oki Y, Feldman T, Smolewski P, Savage KJ, Bartlett NL, Walewski J, Chen R, Ramchandren R, Zinzani PL, Cunningham D, Rosta A, Josephson NC, Song E, Sachs J, Liu R, Jolin HA, Huebner D, Radford J. (2018) Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*, 378: 331-344.

168. Cwynarski K, van Biezen A, de Wreede L, Stilgenbauer S, Bunjes D, Metzner B, Koza V, Mohty M, Remes K, Russell N, Nagler A, Scholten M, de Witte T, Sureda A, Dreger P. (2012) Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed chronic lymphocytic leukemia (Richter's syndrome): A retrospective analysis from the chronic lymphocytic leukemia subcommittee of the chronic leukemia working party and lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*, 30: 2211-2217.

169. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, Lozanski A, Davis M, Gordon A, Smith LL, Mantel R, Jones JA, Flynn JM, Jaglowski SM, Andritsos LA, Awan F, Blum KA, Grever MR, Johnson AJ, Byrd JC, Woyach JA. (2015) Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol*, 1: 80-87.

170. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Lih CJ, Williams PM, Shaffer AL, Gerecitano J, de Vos S, Goy A, Kenkre VP, Barr PM, Blum KA, Shustov A, Advani R, Fowler NH, Vose JM, Elstrom RL, Habermann TM, Barrientos JC, McGreivy J, Fardis M, Chang BY, Clow F, Munneke B, Moussa D, Beaupre DM, Staudt LM. (2015) Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*, 21: 922-926.

171. Giri S, Hahn A, Yaghmour G, Martin MG. (2015) Ibrutinib has some activity in Richter's syndrome. *Blood Cancer J*, 5: e277.

172. Lamar Z, Kennedy L, Kennedy B, Lynch M, Goad A, Hurd D, McIver Z. (2015) Ibrutinib and rituximab induced rapid response in refractory Richter syndrome. *Clin Case Rep*, 3: 615-617.

173. Tsang M, Shanafelt TD, Call TG, Ding W, Chanan-Khan A, Leis JF, Nowakowski GS, Bowen D, Conte M, Schwager SM, Slager SL, Kay NE, Hanson CA, Parikh SA. (2015) The efficacy of ibrutinib in the treatment of Richter syndrome. *Blood*, 125: 1676-1678.

174. Hillmen P, Schuh A, Eyre TA, Pagel JM, Brown JR, Ghia P, Allan JN, Wierda W, Hamdy A, Huang J, Izumi R, Patel P, Wang MH, Byrd JC. (2016) Acalabrutinib Monotherapy in Patients with Richter Transformation from the Phase 1/2 ACE-CL-001 Clinical Study. *Blood*, 128: 60.
175. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, Kipps TJ, Anderson MA, Salem AH, Dunbar M, Zhu M, Peale F, Ross JA, Gressick L, Desai M, Kim SY, Verdugo M, Humerickhouse RA, Gordon GB, Gerecitano JF. (2017) Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*, 35: 826-833.
176. Khan M, Siddiqi R, Thompson PA. (2018) Approach to Richter transformation of chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. *Ann Hematol*, 97: 1-15.
177. Kadri S, Lee J, Fitzpatrick C, Galanina N, Sukhanova M, Venkataraman G, Sharma S, Long B, Petras K, Theissen M, Ming M, Kobzev Y, Kang W, Guo A, Wang W, Niu N, Weiner H, Thirman M, Stock W, Smith SM, Nabhan C, Segal JP, Lu P, Wang YL. (2017) Clonal evolution underlying leukemia progression and Richter transformation in patients with ibrutinib-relapsed CLL. *Blood Adv*, 1: 715-727.
178. Anderson MA, Tam C, Lew TE, Juneja S, Juneja M, Westerman D, Wall M, Lade S, Gorelik A, Huang DCS, Seymour JF, Roberts AW. (2017) Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*, 129: 3362-3370.
179. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, Larrayoz M, Kminkova J, Agathangelidis A, Davis Z, Tausch E, Stalika E, Kantorova B, Mansouri L, Scarfo L, Cortese D, Navrkalova V, Rose-Zerilli MJ, Smedby KE, Juliusson G, Anagnostopoulos A, Makris AM, Navarro A, Delgado J, Oscier D, Belessi C, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S, Gaidano G, Campo E, Strefford JC, Stamatopoulos K, Rosenquist R. (2015) Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29: 329-336.
180. Kiss R, Alpar D, Gango A, Nagy N, Eyupoglu E, Aczel D, Matolcsy A, Csomor J, Matrai Z, Bodor C. (2019) Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104: e38-e41.
181. Rossi D, Gaidano G. (2016) Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*, 43: 311-319.
182. Ahn IE, Farooqui MZH, Tian X, Valdez J, Sun C, Soto S, Lotter J, Housel S, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Maric I, Calvo KR, Nierman P, Hughes TE, Saba NS, Marti GE, Pittaluga S, Herman SEM, Niemann CU, Pedersen LB, Geisler CH, Childs

- R, Aue G, Wiestner A. (2018) Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase 2 study. *Blood*, 131: 2357-2366.
183. Leeksma AC, Taylor J, Wu B, Gardner JR, He J, Nahas M, Gonen M, Alemayehu WG, Te Raa D, Walther T, Hullein J, Dietrich S, Claus R, de Boer F, de Heer K, Dubois J, Dampmann M, Durig J, van Oers MHJ, Geisler CH, Eldering E, Levine RL, Miller V, Mughal T, Lamanna N, Frattini MG, Heaney ML, Zelenetz A, Zenz T, Abdel-Wahab O, Kater AP. (2019) Clonal diversity predicts adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 33: 390-402.
184. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Perez AR, Guo A, Racchumi J, Xu G, Wu H, Ma J, Steggerda SM, Coleman M, Leslie C, Wang YL. (2014) Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 370: 2352-2354.
185. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A, Herman SE, Tian X, Maric I, Arthur DC, Wake L, Pittaluga S, Yuan CM, Stetler-Stevenson M, Soto S, Valdez J, Nierman P, Lotter J, Xi L, Raffeld M, Farooqui M, Albitar M, Wiestner A. (2017) Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 129: 1469-1479.
186. Evans AG, Rothberg PG, Burack WR, Huntington SF, Porter DL, Friedberg JW, Liesveld JL. (2015) Evolution to plasmablastic lymphoma evades CD19-directed chimeric antigen receptor T cells. *Br J Haematol*, 171: 205-209.
187. Chan KL, Blombery P, Jones K, Lade S, Carney D, Tran H, Seymour JF, Tam CS. (2017) Plasmablastic Richter transformation as a resistance mechanism for chronic lymphocytic leukaemia treated with BCR signalling inhibitors. *Br J Haematol*, 177: 324-328.
188. Pan Z, Xie Q, Repertinger S, Richendollar BG, Chan WC, Huang Q. (2013) Plasmablastic transformation of low-grade CD5+ B-cell lymphoproliferative disorder with MYC gene rearrangements. *Hum Pathol*, 44: 2139-2148.
189. Gasljevic G, Grat M, Kloboves Prevodnik V, Grcar Kuzmanov B, Gazic B, Lovrecic L, Podgornik H. (2020) Chronic Lymphocytic Leukemia with Divergent Richter's Transformation into a Clonally Related Classical Hodgkin's and Plasmablastic Lymphoma: A Case Report. *Case Rep Oncol*, 13: 120-129.
190. de Weers M, Verschuren MC, Kraakman ME, Mensink RG, Schuurman RK, van Dongen JJ, Hendriks RW. (1993) The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol*, 23: 3109-3114.

191. Lampson BL, Brown JR. (2018) Are BTK and PLCG2 mutations necessary and sufficient for ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia? *Exp Rev Hematol*, 11: 185-194.
192. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, Heerema NA, Zhao W, Coleman J, Jones D, Abruzzo L, Gordon A, Mantel R, Smith LL, McWhorter S, Davis M, Doong TJ, Ny F, Lucas M, Chase W, Jones JA, Flynn JM, Maddocks K, Rogers K, Jaglowski S, Andritsos LA, Awan FT, Blum KA, Grever MR, Lozanski G, Johnson AJ, Byrd JC. (2017) BTK(C481S)-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*, 35: 1437-1443.
193. Herling CD, Abedpour N, Weiss J, Schmitt A, Jachimowicz RD, Merkel O, Cartolano M, Oberbeck S, Mayer P, Berg V, Thomalla D, Kutsch N, Stiefelhagen M, Cramer P, Wendtner CM, Persigehl T, Saleh A, Altmuller J, Nurnberg P, Pallasch C, Achter V, Lang U, Eichhorst B, Castiglione R, Schafer SC, Buttner R, Kreuzer KA, Reinhardt HC, Hallek M, Frenzel LP, Peifer M. (2018) Clonal dynamics towards the development of venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*, 9: 727.
194. Gángó A, Kiss R, Farkas P, Hanna E, Demeter J, Deák B, Lévai D, Kotmayer L, Alpár D, Matolcsy A, Bődör C, Mátrai Z, Timár B. (2021) Morphologic and molecular analysis of Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib or venetoclax. *Pathology*, <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.04.008>.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Gango A*, Alpar D*, Galik B*, Marosvari D, Kiss R, Fesus V, Aczel D, Eyupoglu E, Nagy N, Nagy A, Krizsan S, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Adam E, Tasnady S, Reti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Matrai Z, Bodor C. (2020) Dissection of subclonal evolution by temporal mutation profiling in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *Int J Cancer*, 146: 85-93. **IF 7.396**
2. Kiss R, Alpar D, Gango A, Nagy N, Eyupoglu E, Aczel D, Matolcsy A, Csomor J, Matrai Z, Bodor C. (2019) Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 104: e38-e41. **IF 9.941**
3. Gángó A, Kiss R, Farkas P, Hanna E, Demeter J, Deák B, Lévai D, Kotmayer L, Alpár D, Matolcsy A, Bödör C, Mátrai Z, Timár B. (2021) Morphologic and molecular analysis of Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib or venetoclax. *Pathology*, <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.04.008>. **IF 5.306**

Egyéb témában megjelent közlemények

1. Bödör C, Gángó A, Schneider T. (2017) Diffúz nagy B-sejtes lymphoma: úton a személyre szabott terápia felé. *Klinikai Onkológia*, 4: 33-41.
2. Kiss R, Király PA, Gaál-Weisinger J, Marosvári D, Gángó AP, Demeter J, Bödör C. (2017) A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. *Magy Onkol*, 61: 57-66.
3. Mózes R, Gángó A, Boha Z, Csomor J, Bödör C. (2017) A driver és szubklonális mutációk szerepe a primer mielofibrózis patogenezisében. *Magy Onkol*, 61: 36-45.

4. Bártai B, Lévai D, Gaál-Weisinger J, Balogh A, Gángó A, Bödör C, Nagy N. (2018) A személyre szabott terápia új lehetősége follicularis lymphomában – Az EZH2 hiszton metil-transzferáz gátlása. *Hematológia-Transzfuziológia*, 51: 61-70.
5. Gángó A*, Bártai B*, Varga M, Kapczár D, Papp G, Marschalkó M, Kuroli E, Schneider T, Csomor J, Matolcsy A, Bödör C, Szepesi Á. (2018) Concomitant 1p36 deletion and TNFRSF14 mutations in primary cutaneous follicle center lymphoma frequently expressing high levels of EZH2 protein. *Virchows Arch*, 473: 453-462. **IF 4.064**
6. Gángó A, Mózes R, Boha Z, Kajtár B, Timár B, Király PA, Kiss R, Fésüs V, Nagy N, Demeter J, Körösmezey G, Borbényi Z, Marton I, Szőke A, Masszi T, Farkas P, Várkonyi J, Plander M, Pósfai É, Egyed M, Pál K, Radványi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpár D, Bödör C. (2018) Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*, 65: 42-48. **IF 3.156**
7. Király AP, Kállay K, Gángó A, Kellner Á, Egyed M, Szőke A, Kiss R, Vályi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, Bödör C. (2018) Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 24: 83-88. **IF 3.201**
8. Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, Szuhai K, Bödör C, Alpár D. (2018) [Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research]. *Orv Hetil*, 159: 583-592. **IF 0.540**
9. Kiss R, Papp G, Krizsán S, Kotmayer L, Gángó A, Nagy N, Bártai B, Mátrai Z, Bödör C, Alpár D. (2018) Genomikus kópiaszám-eltérések szűrése krónikus limfoid leukémiában multiplex ligációfüggő szondaamplifikációval. *Hematológia-Transzfuziológia*, 51: 31-40.
10. Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, de Groot K, Steenkamer M, Jáksó P, Matolcsy A, Kajtár B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. (2018) High-Throughput Copy Number Profiling by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Multiple Myeloma. *J Mol Diagn*, 20: 777-788. **IF 5.553**

11. Gángó A, Alpár D, Bödör C. (2019) Új módszerek az onkohematológiai betegségek molekuláris diagnosztikájában. *Magyar Tudomány*, 180: 645-655.

12. Krizsán S, Dénes Z, Gángó A, Gerecs B, Demeter J, Nagy Z, Tárkányi I, Masszi T, Farkas P, Masszi A, Szombath G, Benedek S, Várkonyi J, Horváth L, Nagy Z, Radványi G, Takács I, Hamed A, Lázár Z, Süveges E, Kárpáti Á, Plander M, Szendrei T, Pál K, Gurzó M, Jakucs J, Egyed M, Bödör C. (2019) Visszatérő genetikai eltérések vizsgálata akut myeloid leukémiában az új célzott terápiák tükrében. *Hematológia-Transzfuziológia*, 52: 96-105.

13. Mózes R, Gángó A, Sulák A, Vida L, Reiniger L, Timár B, Krenács T, Alizadeh H, Masszi T, Gaál-Weisinger J, Demeter J, Csomor J, Matolcsy A, Kajtár B, Bödör C. (2019) Calreticulin mutation specific CAL2 immunohistochemistry accurately identifies rare calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Pathology*, 51: 301-307.

IF 5.306

14. Nagy B, Gángó A, Rejtő L, Krizsán S, Ujfalusi A, Antal-Szalmás P. (2019) CEBPA-mutációk vizsgálata és prognosztikai jelentőségük akut myeloid leukémiában. *Hematológia-Transzfuziológia*, 52: 11-17.

15. Bátai B, Krizsán S, Gángó A, Hegyi L, Csóka M, Erdélyi DJ, Csomor J, Kállay K, Bödör C. (2020) Juvenile myelomonocytic leukaemia presentation after preceding juvenile xanthogranuloma harbouring an identical somatic PTPN11 mutation. *Pediatr Blood Cancer*, 67: e28368. **IF 3.167**

16. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, de Groot K, Király PA, Krizsán S, Kajtár B, Pikó H, Pajor L, Vojcek Á, Matolcsy A, Kovács G, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. (2020) Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol*, 33: 812-824. **IF 5.988**

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm feleségem és lányaim odaadó támogatását, és köszönöm egész családomnak, hogy tanulmányaim során végig mellettem álltak.

Köszönöm Matolcsy András Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett Intézetben végezhettem kutatómunkámat.

Köszönöm Bödör Csabának, hogy a munkacsoportjába TDK-hallgatóként befogadott, és legyen bármilyen kérdésem, töretlen szakmai és emberi odaadással fordult felém.

Köszönöm Király Péter Attilának, hogy bevezetett a laboratóriumi módszerek világába, és nagy lelkesedéssel végeztük kutatásainkat.

Köszönöm Alpár Donátnak, hogy az új generációs szekvenálási technikák kapcsán bármikor fordultam hozzá, mindig készségesen segített.

Köszönöm a közös kutatómunka szépségét Mózes Rékának, Marosvári Dórának, Kiss Richárdnak, Nagy Noéminek, Nagy Ákosnak, Krizsán Szilviának, Aczél Dórának, Bedics Gábornak, Fésüs Viktóriának, Batai Bencének, Kotmayer Lilinek, valamint a sok segítséget Bárányné Pallag Adrienne-nek, Hegyi Lajosnak, Zajta Eriknek, Gulácsi Edinának, Gróf Stefániának, Kremper Zsanettnek, Juhász-Nagy Laurának, Kovács Andreának és Lévay Lucának.

Köszönöm Csomor Juditnak, Timár Botondnak, Szepesi Ágotának, Rajnai Hajnalkának és Csernus Balázsnak a segítségüket és a közös munkát.

Köszönöm Krenács Tibor kutatóprofesszornak, hogy alapos bírálatával a dolgozat színvonalát jelentősen emelte.

Köszönöm Laczik Cecíliának a sok segítséget, amelyet PhD tanulmányaim során, valamint a disszertáció benyújtásakor tőle kaptam.