

# Az új generációs szekvenálás jelentősége az akut mieloid leukémia precíziós onkológiai megközelítésében

ANDRIKOVICS HAJNALKA<sup>1</sup>, KÖVY PETRA<sup>1</sup>, BORS ANDRÁS<sup>1</sup>, CSABÁN DÓRA<sup>1</sup>, MEGGYESI NÓRA<sup>1</sup>, ÓRFI ZOLTÁN<sup>1</sup>, BORSY ADRIENN<sup>1</sup>, KOZMA ANDRÁS<sup>1</sup>, DOLGOS JÁNOS<sup>2</sup>, HARASZTDOMBI JÓZSEF<sup>2</sup>, MIKALA GÁBOR<sup>2</sup>, REMÉNYI PÉTER<sup>2</sup>, VÁLYI-NAGY ISTVÁN<sup>2</sup>

Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, <sup>1</sup>Molekuláris Genetikai Laboratórium, <sup>2</sup>Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály, Budapest

A munka a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP) Kiemelt halálózási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program, a „Nemzeti innovációs onkogenomikai és precíziós onkoterápiás program elindítása és kapcsolódó technológiák integrált fejlesztése” (NVKP\_16-1-2016-0005) támogatásával készült.

## Levelezési cím:

Dr. Andrikovics Hajnalka, Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Molekuláris Genetikai Laboratórium, 1097 Budapest, Albert Flórián u. 5-7., tel.: +36-1-219-6188, e-mail: andrikovics.hajnalka@dpckorhaz.hu

## Közlésre érkezett:

2019. október 16.

## Elfogadva:

2019. október 29.

A szolid tumorokkal összehasonlítva az akut mieloid leukémia (AML) háttérében a gyerekkori daganatokhoz hasonló alacsony számú genetikai eltérés, átlagosan 3–5 szomatikus mutáció áll. Bár a mutációs háttér igen heterogén, a genetikai eltérések kimutatása diagnosztikai, prognosztikai és terápiás jelentőséggel bír. Jelen tanulmányunk 2001–2019 között intézetünkben diagnosztizált 830 AML-es beteg citogenetikai, valamint a leggyakrabban előforduló mutációs eltéréseit és azok társulásait vizsgálja. A laboratóriumban nemrégiben bevezetett új generációs szekvenálás (NGS) eredményei hét beteg esetében szintén bemutatásra kerülnek. A korábban más technikával vizsgált eltérések célzott vizsgálata és az NGS megegyező eredményt hozott. Az NGS technikával azonosíthatóak mindazok a további, ritkábban előforduló genetikai eltérések, amelyek az AML diagnosztikai és prognosztikai besorolását tovább finomítják az Európai LeukémiaNet ajánlásai szerint. Az NGS technika alkalmazása a nemzetközi tapasztalatokat követően hazánkban is a rutin diagnosztikai vizsgálómódszerek közé kell, hogy beemelkedjen. *Magy Onkol* 63:282-287, 2019

**Kulcsszavak:** akut mieloid leukémia, citogenetika, molekuláris genetika, új generációs szekvenálás, prognózis

*In contrast to solid tumours, the genetic background of acute myeloid leukemia (AML) is characterized by a relatively low number of alterations per sample (average 3-5 mutations similarly to paediatric malignancies). Although the mutational background is rather heterogeneous, the detection of genetic alterations has diagnostic, prognostic and therapeutic relevance. We investigated cytogenetic and most commonly occurring molecular genetic alterations, and their co-occurrence in 830 AML patients diagnosed and treated in our institute between 2001 and 2019. Results from the recently introduced next generation sequencing for seven AML patients are also presented. Both methods (previously performed standard PCR-based tests and NGS) achieved the same results for commonly occurring mutations, but NGS technique was capable to identify further, rarely occurring mutations which bear diagnostic and prognostic importance according to the recent European LeukemiaNet recommendations. The introduction of NGS techniques to routine laboratory diagnostic applications is a required step following international expertise.*

*Andrikovics H, Kövy P, Bors A, Csabán D, Meggyesi N, Órfi Z, Borsy A, Kozma A, Dolgos J, Harasztombi J, Mikala G, Reményi P, Vályi-Nagy I. Importance of next generation sequencing in precision oncology approach of acute myeloid leukemia. *Magy Onkol* 63:282-287, 2019*

**Keywords:** acute myeloid leukemia, cytogenetics, molecular genetics, next generation sequencing, prognosis

## BEVEZETÉS

Az akut mieloid leukémia (AML) éretlen mieloid prekursorok felszaporodásával járó, magas mortalitású hematológiai malignitás. A közel harminc éve alig változott intenzív kemoterápiás kezeléssel és hematopoetikus őssejtek transzplantációjával (HSCT) jelenleg a 60 évnél fiatalabb felnőtt, AML-ben szenvedő betegek mintegy 35–40%-a, az idősebb betegek 5–15%-a gyógyítható (1). A betegség klasszifikációjában és prognózisbecslésében hamar felismerésre került a citogenetikai, majd a molekuláris genetikai eltérések jelentősége (2). Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation, WHO) legújabb, 2016-ban megjelent klasszifikációja (3) külön AML-kategóriának tekinti a következő transzlokációkat/inverziókat: t(15;17), t(8;21), inv(16) vagy t(16;16), t(9;11), t(6;9), inv(3) vagy t(3;3), t(1;22) *de novo* AML-ben, és elkülöníti a mielodiszplázia talaján kialakult szekunder AML citogenetikai jellemzőit (pl. -7/del(7q); -5/del(5q); i(17q)/t(17p); több mint három kromoszómaeltéréssel járó komplex kariotípus). A citogenetikai eltérések közül a három gyakran előforduló transzlokáció/inverzió kedvező prognózisú: t(15;17), t(8;21), inv(16) vagy t(16;16), a ritkábban előforduló transzlokációk közül a t(6;9), inv(3) vagy t(3;3), t(1;22), valamint a legtöbb mielodiszplázia talaján kialakult citogenetikai eltérés kedvezőtlen prognózisú. Az egyéb citogenetikai eltérések és az AML-es betegek 40–45%-ánál előforduló normális kariotípus (NK) az intermedier rizikójú csoportba sorolható. A betegek prognosztikai besorolása befolyásolja az első indukciós kezelést követően választandó terápiát: kedvező prognózis esetén fenntartó kemoterápiás, intermedier és kedvezőtlen prognózis esetén hematopoetikus őssejtek transzplantációja javasolt (1).

Az új generációs szekvenálási technikáknak (NGS) köszönhetően az AML genetikai hátterében álló szomatikus mutációkat az elmúlt évtizedben felderítették (4–6). Teljesexom-szekvenálással, illetve 68–111 gént tartalmazó génpanellel a vizsgált AML-es betegek 96–99%-ában azonosítottak aminosavsorrendet/mikroRNS-szekvenciát módosító genetikai eltérést. Egy beteg esetében átlagosan 2–5 különböző szomatikus mutáció mutatható ki (tartomány: 0–9). A betegek >1%-ában előforduló mutációk 25–40 gént érinthetnek, amelyek nyolc funkcionális csoportba sorolhatóak: mieloid transzkripciós faktorok (RARA, RUNX1, CBFβ, CEBPA), nukleofoszmin (NPM1), jelátviteli útvonalak génjei (FLT3, KIT, JAK2), tumorszuppresszor gének (TP53), DNS-metilációt befolyásoló gének (DNMT3A, TET2, IDH1/IDH2), kromatinmódosításért felelős gének (KMT2A, ASXL1, EZH2), mRNS-érés-„spliceszóma” (SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1), kohezinkomplex kialakításában szerepet játszó gének (STAG2, RAD21). Az azonosított mutációs spektrum és az AML citogenetikai eltérései közösen klasszifikációs és prognosztikai szereppel bírnak, amelyek a 2016-os WHO-besorolás (3) és a 2017-es European LeukemiaNet (ELN) rizikóbecslés (7) alapját képezik.

Az AML heterogén genetikai háttere olyan nagy számú gént érint, amelynek analízise klasszikus Sanger-szekve-

nálási módszerekkel költséghatékonyan nem oldható meg, emiatt a nemzetközi ajánlások már javasolják az NGS technikák bevezetését a rutindiagnosztikába az AML esetében (8). A pályázat segítségével lehetőség nyílt intézetünkben az NGS technika bevezetésére az AML-ben, a kéziratban első eredményeinkről számolunk be.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### Betegcsoport

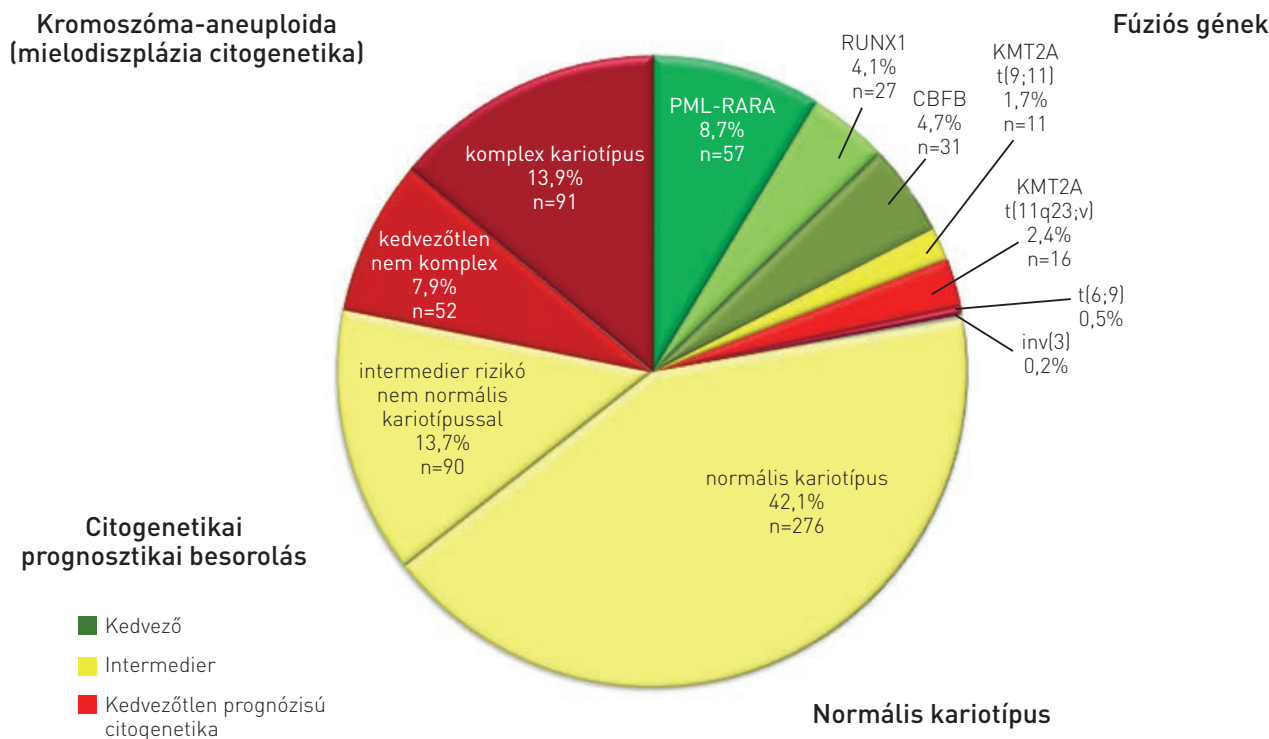
A Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Hematológiai és Őssejt-transzplantációs Osztályán (korábban Országos Hematológiai és Immunológiai Intézet, Országos Gyógyintézeti Központ, Egyesített Szent István és Szent László Kórház) 2001. január és 2019. május között 830, AML-ben szenvedő beteget diagnosztizáltak és kezeltek. A betegek 48,6%-a (n=403) férfi és 51,4%-a (n=427) nő, az átlagéletkor (±szórás) a diagnózis időpontjában: 51,1±15,4 év (tartomány: 16–93 év). A vizsgált betegek adatai csoportunk korábbi közleményeiben már részben ismertetésre kerültek (9).

### Genetikai laboratóriumi módszerek

A klasszikus citogenetikai vizsgálat, a kariotipizálás és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) standard laboratóriumi eljárásoknak megfelelően történt. Az NPM1 (10) és az *fms*-szerű tirozinkináz 3 internal tandem duplikáció (FLT3-ITD) (11) mutációkat fluoreszcens polimeráz láncreakciót (PCR) követően kapilláriselektroforézis, az FLT3 tirozinkináz doménje (FLT3-TKD) (12) mutációját restriktív fragmens hossz polimorfizmus vizsgálattal végeztük. Az izocitrát-dehidrogenáz 1 vagy 2 (IDH1/IDH2) mutációi jelenlétét high resolution melting (HRM) módszerrel szűrtük, ezt követően allélspecifikus PCR-rel vagy Sanger-szekvenálással erősítettük meg. Citogenetikai eredmény a vizsgált csoportban 654 esetben, FLT3-ITD- vagy TKD-, valamint NPM1-mutáció 830 esetben, IDH1/IDH2 mutáció 743, illetve 732 esetben állt rendelkezésünkre.

Az NGS módszer bevezetését a laboratóriumba a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP\_16-1-2016-0005) keretében 2019 májusában megvalósult műszerfejlesztés tette lehetővé. A fenti betegcsoportból 7 fiatal, kuratív céllal intenzív kemoterápiás kezelésben részesülő beteg esetében történt meg eddig az elemzés. A könyvtárkészítés Illumina TruSight™ Myeloid Sequencing Panellel történt, amely 54, mieloid malignitásokban gyakran érintett gén teljes kódolórégióját vagy mutációs forrópontjait fedi le. A szekvenálás Illumina MiSeq® Sequencing System készüléken történt.

A szekvenálás monitorozásához és analíziséhez az Illumina Local Run Manager szoftverét használtuk. Az azonosított eltérések elemzése a következő munkafolyamat szerint történt: elsőként kizártuk az elemzésből a nem megfelelő minőségi mutatókkal rendelkező régiókat, majd a megmaradt variánslistát különböző szűrési feltételek szerint szűkítettük.



**1. ÁBRA.** Citogenetikai eltérések és prognosztikai besorolásuk a vizsgált betegcsoportunkban (n=654). A kedvező prognosztikai csoport zöld, az intermedier sárga, a kedvezőtlen prognosztizú eltérések pirossal jelöltek

Lokalizáció, illetve mutációtípus szerint az exoni és a splice-régióban található non-szinonim eltéréseket vizsgáltuk. A variánsokat populációs adatbázisok és *in silico* predikciós szoftverek segítségével a nemzetközi ajánlások szerint klasszifikáltuk (13, 14).

## EREDMÉNYEK

Citogenetikai szempontból kedvező prognosztizú csoportba a betegek 18%-a (n=115), az intermedier csoportba 57%-a (n=376), míg a kedvezőtlen csoportba 25%-a (n=163) tartozott (1. ábra). A betegek 42%-a (n=276) normális kariotípusú (NK) volt. Leggyakoribb genetikai eltérésnek az NPM1 gén mutációja bizonyult csoportunkban (a betegek 28,3%-a [235/830] pozitív). Az aktiváló jelátviteli útvonalat eredményező FLT3-ITD gyakorisága 23,7% (197/830), az FLT3-TKD gyakorisága 7,7% (64/830). Az IDH1-mutációk a betegek 8,1%-ában (60/743), az IDH2-mutációk a betegek 11,0%-ában (81/732) voltak megfigyelhetők. A molekuláris genetikai eltérések társulásait egyes citogenetikai eltérésekkel az 1. táblázat mutatja. Az NPM1-mutáció a 2016-os WHO-besorolás (3) szerint önálló NPM1 entitás, egyéb WHO-entitással nem társul (legtöbb fúziós gént eredményező kromoszóma-transzlokációk/-inverziók), előfordulási gyakorisága a normális kariotípusú AML-ben 52,5% (145/276), egyéb inter-

medier rizikójú citogenetika esetén 23,6% (21/89), ritkán kedvezőtlen kariotípusú AML-ben is előfordul (4,9%, 7/142). Az NPM1-mutációkkal szemben az FLT3- és az IDH1/IDH2 mutációk többféle kariotípus-alcsoportban és WHO-kategorióval társulhatnak. Az FLT3-ITD és TKD mutációk t(15;17) esetén 22,8% és 8,8%, inv(16) esetén 12,9% és 19,4%, valamint NK-AML-ben 37,0% és 10,1%-ban fordulnak elő, az átlagos előfordulási gyakoriságnál gyakrabban. Az IDH1/IDH2 mutációk, bár mindhárom citogenetikai prognosztikai alcsoportban előfordultak, leggyakrabban intermedier citogenetikai rizikójú, ezen belül NK-AML-lel társultak. Az IDH1-mutáció gyakorisága 10,9% (37/338), az IDH2-mutációé 17,0% (57/335) intermedier citogenetikai prognosztikai csoportban.

Az NGS vizsgálatokat hét olyan frissen diagnosztizált, kezelés előtt álló AML-es beteg esetében végeztük el, akiknél diagnóziskor a citogenetikai vizsgálat normális kariotípust igazolt (n=6), vagy nem volt informatív (n=1). A betegeknél az 54 gént tartalmazó panel 12 génje volt érintett, betegenként 0–7 mutáció volt azonosítható 0–5 génben (2. ábra). Azoknál a betegeknél, ahol a génpanel diagnóziskor 0–1 mutációt igazolt, progressziókor, relapszuskor a citogenetikai vizsgálattal kedvezőtlen citogenetikai eltérést azonosítottunk. Az NPM1-, FLT3 ITD és

**1. TÁBLÁZAT.** Citogenetikai eltérések társulása egyes gyakran előforduló molekuláris genetikai eltérésekkel

Citogenetikai eltérés	Prognózis	NPM1	FLT3-ITD	FLT3-TKD	IDH1	IDH2
t(15;17)(q22;q11-12)	kedvező	0,0% (0/57)	22,8% (13/57)	8,8% (5/57)	0,0% (0/54)	1,9% (1/53)
t(8;21)(q22;q22.1)	kedvező	0,0% (0/27)	3,7% (1/27)	3,7% (1/27)	4,0% (1/25)	0,0% (0/25)
inv(16)(p13.1q22) t(16;16)(p13.1;q22)	kedvező	0,0% (0/31)	12,9% (4/31)	19,4% (6/31)	3,6% (1/28)	0,0% (0/27)
Normális kariotípus	intermedier	52,5% (145/276)	37,0% (102/276)	10,1% (28/276)	9,7% (25/259)	14,5% (37/256)
Egyéb intermedier	intermedier	23,6% (21/89)	30,3% (27/89)	5,6% (5/89)	15,2% (12/79)	25,3% (20/79)
Komplex kariotípus és egyéb kedvezőtlen	kedvezőtlen	4,9% (7/142)	5,6% (8/142)	3,5% (5/142)	3,8% (5/132)	5,4% (7/129)

NPM1: nukleofoszmin 1, FLT3-ITD: fms-szerű tirozinkináz 3 internal tandem duplikáció; FLT3-TKD: fms-szerű tirozinkináz 3 tirozinkináz domén mutáció, IDH1/IDH2: izocitrát-dehidrogenáz 1/2

IDH1/IDH2 mutációk eredményei minden esetben egyeztek a korábban célzott vizsgálatokkal meghatározottakkal. A hét betegből kettő esetében a korábban nem vizsgált ASXL1- vagy RUNX1-mutációk jelenléte az ELN prognosztikai besorolást az intermedier besorolásból a kedvezőtlen kategóriába sorolta.

**MEGBESZÉLÉS**

Vizsgált betegeink csoportjában a citogenetikai eltérések, FLT3-, NPM1- és IDH1/IDH2 mutációk gyakorisága megfelelt az irodalmi gyakoriságnak, e mutációk vizsgálata azonban önmagában nem teszi lehetővé a jelenlegi WHO 2016 szerinti

genetikai AML-klasszifikációt (CEBPA és RUNX1 gének szekvenálásának hiánya) és a betegség ELN 2017 prognosztikai besorolását (ASXL1, RUNX1, TP53 gének szekvenálásának hiánya). További gének vizsgálata azonban még tovább finomíthatja a genetikai klasszifikációt.

A genetikai adatok felhasználása az egyénre szabott, célzott orvoslásban egyre nagyobb szerepet tölt be világszerte, ennek részeként a precíziós genomikai, ezen belül az onkogenomikai programok terjedése világméretűvé vált (15, 16). A genetikai eltérések feltárása daganatos betegségek esetén pontosítja a diagnózist, egyénre szabott prognosztikai előrejelzést ad, és terápiás döntést támo-

Gén	Funkcionális csoport	F (38)	N (43)	F (21)	N (62)	N (41)	N (65)	F (58)
Kariotípus		NK	NK	NK	NK	NK	NK	inv(3), komplex
RUNX1	transzkripció faktor							
NPM1	nukleofoszmin							
FLT3	aktivált jelátvitel							
NRAS	aktivált jelátvitel							
DNMT3A	DNS-metiláció							
TET2	DNS-metiláció							
IDH1	DNS-metiláció							
IDH2	DNS-metiláció							
WT1	DNS-metiláció							
ASXL1	kromatinmódosítás							
BCOR	kromatinmódosítás							
STAG2	kohezinkomplex							

**2. ÁBRA.** Új generációs szekvenálással azonosított genetikai eltérések és társulásuk hét, AML-ben szenvedő beteg esetében. Az ábra egyes oszlopai egy-egy beteg esetében azonosított mutációkat mutatnak. Az 54 gént tartalmazó panel a vizsgált betegek esetében 12 génben azonosított patogén, valószínűleg patogén, illetve ismeretlen jelentőségű genetikai variánst. A betegeknél azonosított citogenetikai eltérések és gének külön sorokban kerültek feltüntetésre. Az azonos funkcionális csoportba sorolható gének ugyanazzal a színnel lettek jelölve. Az oszlopok azonosítója a beteg neve (F: férfi; N: nő) és életkora az AML diagnózisakor. NK: normális kariotípus

gathat. Az AML a malignus hematológiai betegségek egyik modellbetegsége, genetikai háttere a könnyű mintavétel következtében már részben a citogenetikai hátterének felderítésekor ismertté vált. A szolid tumoroktól eltérően gyakran a hematológiai betegségek hátterében, beleértve az AML-t is, viszonylag kevés számú driver mutáció áll (a gyermekkori malignus betegségekhez hasonlóan) [17]. A kevés számú genetikai eltérés azonban meglehetősen heterogén: több száz citogenetikai és több tucat olyan génerintettséget azonosítottak, amelyek a betegek több mint egy százalékában visszatérően előfordulnak. Az érintett kromoszómák, gének magas számából és a társulások kombinációs lehetőségeiből adódó heterogenitás AML esetében is szükségessé teszi az elektronikus onkohematológiai döntéstámogató rendszerek kifejlesztését és alkalmazását a mindennapi gyakorlatban.

A heterogenitás következtében egyes adatbázisok a számításokat több ezer AML-es beteg adatait felhasználva kell, hogy végezzék. Mintegy 1500 AML-es beteg klinikai és genomikai adatainak segítségével (10 klinikai paraméter, 26 citogenetikai eltérés és 58 gén szekvenciaadatainak ismeretében) létrehoztak egy „tudásbankot” klinikai döntéstámogatásra 2017-ben. Az online hozzáférhető, egyelőre kutatási célokot szolgáló alkalmazás előre jelzi a remisszió, a relapszus és a mortalitás valószínűségét AML-ben [18] HSCT kezelés alkalmazása nélkül, HSCT kezeléssel az első teljes remisszióban, illetve a relapszust követően. A szerzők állítása szerint a tudásbank elősegíti az egyénre szabott terápiás döntést a nagy mortalitással járó HSCT kezelés mérlegelésében. Az alkalmazás hátránya, hogy nem veszi figyelembe az elérhető új célzott kezelési lehetőségeket, és azoknak a terápia kimenetelét befolyásoló hatását.

A genomikai fejlesztések ellenére az AML kezelésének alapelve az elmúlt harminc évben nem változott, csak az elmúlt években vezették be az FLT3- és IDH-inhibitorokat a mindennapi gyakorlatba [19–21]. A kezelés alapja a megfelelő remisszió elérése indukciós kemoterápiával, melyet konszolidáció követ, illetve a döntés a transzplantáció szükségességéről. Egyes AML-alcsoportok esetén a relapszust követő HSCT hasonló mortalitást mutat a mentő kemoterápiához képest [18]. A tudásbank alapú prognosztikai besorolás egy független betegcsoport esetén is hatékonyan előrejelezte a hároméves összesített túlélést, valamint a relapszusban, illetve a remisszióban bekövetkező mortalitási mutatókat [22]. Bár jelenleg az ELN ajánlása a négy fúziós transzkriptum kimutatása mellett csak 6 gén (NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1) vizsgálatát tartja diagnosztikai és prognosztikai szempontból jelentősnek, már e gének vizsgálata sem oldható meg egyszerűen Sanger-szekvenálással, így az NGS technika bevezetése indokolt.

A jelenleg legelterjedtebben alkalmazott mieloid génpanelek egyik hátránya, hogy a gyakori diagnosztikai, prognosztikai csoportokra jellemző fúziós géneket, cito-

genetikai eltéréseket nem detektálják, így alkalmazásukat mindenképpen a citogenetikai vizsgálatok kiegészítőjeként kell kivitelezni. A molekuláris genetikai eltérések a citogenetikai alcsoportok alapján megállapított esetek jelentős százalékában módosítást eszközölnek [23]. Az RNS-alapú NGS technikák bevezetése megoldást kínál mind célzottan a fúziós gének kimutatására, mind teljesexom-szekvenálással, azonban ezek a metodikák még kevésbé elterjedtek és standardizációra szorulnak [8]. Amennyiben a munkafolyamat egyszerűsödik és költséghatékonyá válik, elképzelhető, hogy a teljes exom szekvenálása válik szükségessé az AML diagnózisakor, amely lehetővé teszi olyan szomatikus mutációk kimutatását, amelyek prognosztikai vagy célzott terápiás jelentőséggel bírnak, de ritkán fordulnak elő. Egyes gének szekvenálása génpanelek alkalmazásakor nehézségekbe ütközhet. A kedvező prognosztikai csoportba sorolható CEBPA gén GC-gazdag szekvenciaregiói miatt több génpanel esetén amplifikációs nehézséget mutatott. A kedvezőtlen prognosztikai FLT3-ITD változó mérete miatt a szekvenálás vagy az annotálás eredményezhet álnegatív eredményt [8]. A mintaátfordulási idő az NGS összetett laboratóriumi kivitelezése és a bioinformatikai kiértékelése miatt problémás lehet azokban az esetekben, ahol a célzott kezelés már első vonalban módosul a mutációk jelenléte miatt (pl. FLT3-, IDH1/IDH2 inhibitorok).

Technikai fejlesztésekkel az NGS alkalmasnak bizonyulhat AML-ben a mérhető reziduális betegség követésére, a klonális evolúció, vagy újonnan megjelenő mutációk előrejelzésére. Jelenleg molekuláris genetikai technikákkal csak az AML egy szűk csoportja követhető, amelyben forrópont-transzlokációk vagy -mutációk fordulnak elő. Az NGS lehetővé teszi az összes beteg esetében az MRD kimutatását. Az AML patomechanizmusának ismerete segít a preleukémiás, az AML kialakulásáért felelős alapító, és az AML progressziójáért felelős mutációtípusokat elkülöníteni. Egyes mutációk remisszióban magas variánsallél-frekvenciával perzisztálnak (pl. DNMT3A, TET2, ASXL1 gének, azaz DTA mutációk érintettsége), kimutatásuk nem a relapszust jelzi előre [8]. A DTA mutációk egészséges egyénekben is előfordulnak idős korban (clonal hematopoiesis of unknown significance, CHIP) [24]. Az MRD követésekor a DTA mutációk elemzésből történő kizárásával hatékonyan előre lehet jelezni a relapszust [25, 26]. Az NGS technikával mért MRD az áramlási citometriás MRD-értékhez additív prognosztikus információt biztosít [25]. Az MRD követése NGS technikával allogén HSCT előtt is értékes információt szolgáltat, ismeretében módosítható a transzplantáció, és a transzplantáció utáni immunszuppressziós kezelés [27]. Az ELN MRD Munkacsoportja jelenleg az NGS-MRD metodikák javítását és harmonizációját tűzte ki célul AML-ben [28]. NGS alapú, multigénes célzott génpanellel történő MRD-követéssel felismerhető az AML-ben gyakran előforduló klonális evolúció, valamint az új szekunder leukémia megjelenése [29].

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az NGS technikák rutinszerű alkalmazása az AML diagnózisakor elkerülhetetlen a 2017-es ELN-ajánlások szerint, és napjainkban egyre inkább terjedőben van a rutindiagnosztikai laboratóriumokban. A pályázati támogatás lehetőségét nyújtott a tech-

nika bevezetésére laboratóriumunkban. A jövőben az NGS technika érzékenységének és specifitásának fejlesztésével, a munkafolyamatok egyszerűsítésével és árának csökkenésével feltehetően szerepet játszhat a mérhető reziduális betegség követésében is.

## IRODALOM

- Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 373:1136–1152, 2015
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116:354–365, 2010
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391–2405, 2016
- Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368:2059–2074, 2013
- Metzeler KH, Herold T. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 128:686–698, 2016
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 374:2209–2221, 2016
- Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129:424–447, 2017
- Levine RL, Valk PJM. Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 104:868–871, 2019
- Kövy P, Kozma A, Bors A, et al. Új terápiás célpont akut myeloid leukémiában: izocitrát dehidrogenáz 1 és 2 mutációk. *Hematológia-Transzfuziológia* 52:106–114, 2019
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107:4011–4020, 2006
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98:1752–1759, 2001
- Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 100:2393–2398, 2002
- Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 19:4–23, 2017
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424, 2015
- Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* 372:793–795, 2015
- Manolio TA, Abramowicz M, Al-Mulla F, et al. Global implementation of genomic medicine: We are not alone. *Sci Transl Med* 7:290ps213, 2015
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science* 339:1546–1558, 2013
- Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *49:332–340*, 2017
- DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med* 378:2386–2398, 2018
- Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood* 133:676–687, 2019
- Stone RM, Manley PW, Larson RA, et al. Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood Adv* 2:444–453, 2018
- Huet S, Paubelle E, Lours C, et al. Validation of the prognostic value of the knowledge bank approach to determine AML prognosis in real life. *Blood* 132:865–867, 2018
- Lin PH, Li HY, Fan SC, et al. A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice. *Cancer Med* 6:349–360, 2017
- Klco JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 314:811–822, 2015
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 378:1189–1199, 2018
- Morita K, Kantarjian HM, Wang F, et al. Clearance of somatic mutations at remission and the risk of relapse in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 36:1788–1797, 2018
- Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood* 132:1703–1713, 2018
- Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor flow cytometry and multigene next-generation sequencing are complementary and highly predictive for relapse in acute myeloid leukemia after allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 23:1064–1071, 2017
- Cocciardi S, Dolnik A, Kapp-Schwoerer S, et al. Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation. *Nat Commun* 10:2031, 2019