

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



RNDr. Aneta Skotnicová

Nové metody pro diagnostiku poruch krvetvorby

New methods for the diagnosis of hematopoietic disorders

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Eva Froňková, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 22. listopadu 2024

Aneta Skotnicová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce doc. MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. za odborné vedení této dizertační práce, cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu z laboratoře molekulární genetiky a laboratoře průtokové cytometrie CLIP, za pomoc a přátelský přístup.

Nové metody pro diagnostiku poruch krvetvorby

Abstrakt

Detekce přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TR) hraje klíčovou roli při stanovení minimální reziduální nemoci (MRN) u hematologických malignit. Hlavním cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu pro detekci MRN a současné stanovení repertoáru přestaveb Ig/TR fyziologických lymfocytů pomocí sekvenování nové generace (NGS). Srovnání hladin MRN detekovaných pomocí současné standardní metody kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a nové metody NGS u souboru 458 pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií ukázalo, že NGS je specifitější metodou, která umožní stratifikovat více pacientů do skupiny s nízkým rizikem relapsu, a tím snížit intenzitu a toxicitu léčby. Navzdory těmto výsledkům zůstává qPCR standardem v léčebných protokolech, a to především z ekonomických důvodů. Porovnáním s výsledky NGS bylo možné upřesnit interpretační kritéria pro vyhodnocení nízké pozitivních výsledků MRN získaných pomocí qPCR. Tato kategorie hodnot bude nově rozdělena na dvě podskupiny: MRN s nízkou pozitivitou a MRN s nejistou signifikancí. Nová pravidla pro interpretaci budou zavedena do klinického použití v roce 2025 a ovlivní laboratoře v 27 zemích. Metoda NGS byla dále využita k analýze klonality repertoáru TR u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem. U 78 % pacientů byla detekována klonální přestavba TR, která by mohla sloužit jako potenciální cíl pro detekci MRN. Podrobná analýza repertoáru TR ale ukázala, že u části pacientů je obtížné odlišit nádorové buňky od velkých klonů infiltrujících lymfocytů. U tohoto typu lymfomu má detekce repertoáru TR jen výzkumný význam a měření MRN je vhodnější provádět jinou metodou, např. pomocí hladiny exprese genu *ALK*.

Klíčová slova: sekvenování nové generace, přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory, minimální reziduální nemoc, akutní lymfoblastická leukémie

New methods for the diagnosis of hematopoietic disorders

Abstract

Identification of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TR) gene rearrangements plays a crucial role in the detection of minimal residual disease (MRD) in hematologic malignancies. The main objective of this study was to develop and validate a method for MRD detection and simultaneously analyze the Ig/TR repertoire of physiological lymphocytes using next-generation sequencing (NGS). A comparison of MRD levels detected using the current standard method, real-time quantitative PCR (qPCR), and the new NGS method in a cohort of 458 patients with acute lymphoblastic leukemia demonstrated that NGS is more specific. NGS also enables the stratification of more patients into the low-risk relapse group, thereby reducing treatment toxicity and intensity. Despite these findings, qPCR remains the standard method in treatment protocols, mainly because of economic reasons. Comparison with NGS results enabled redefinition of criteria for evaluating low positive MRD results obtained using qPCR. This category will be divided into two subgroups now: low positive MRD and MRD of uncertain significance. The new guidelines will be implemented in clinical practice in 2025, impacting laboratories across 27 countries. The NGS method was further employed to analyze TR repertoire clonality in patients with anaplastic large cell lymphoma. Clonal TR rearrangements were detected in 78 % of patients, suggesting potential as a target for MRD detection. However, detailed analysis of the TR repertoire revealed that in some patients, distinguishing tumor cells from large clones of infiltrating lymphocytes is challenging. In this type of lymphoma, TR repertoire detection has value only in research, while MRD detection is more appropriately performed by assessing *ALK* gene expression levels.

Key words: next generation sequencing, immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements, minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia

Seznam použitých zkratek

AIEOP	italská skupina „Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica“
ALK	anaplastická lymfomová kináza
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ALCL	anaplastický velkobuněčný lymfom
BC	polyklonální směs DNA od nejméně pěti zdravých dárců („buffy coat“)
BCP-ALL	B-prekurzorová akutní lymfoblastická leukémie
BFM	německá skupina „Berlin-Frankfurt-Münster“
CLL	chronická lymfocytární leukémie
Ct	„threshold“ cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročí hodnotu pozadí
HL	Hodgkinův lymfom
HR	vysoké riziko
Ig	imunoglobulin
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MR	střední riziko
MRN	minimální reziduální nemoc
NGS	sekvenování nové generace
NHL	non-Hodgkinův lymfom
PEG	polyethylen glykol
pNEG	pravděpodobně negativní hodnota MRN
PnQ	pozitivní, nekvantifikovatelná hodnota MRN
pPOS	pravděpodobně pozitivní hodnota MRN
RSS	rekombinační signální sekvence
SOP	standardní operační postup
SR	standardní riziko

T _m	teplota tání
TR	T-buněčný receptor
TRA	α podjednotka T-buněčného receptoru
TRB	β podjednotka T-buněčného receptoru
TRD	δ podjednotka T-buněčného receptoru
TRG	γ podjednotka T-buněčného receptoru
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
QR	kvantifikovatelnost („quantitative range“)

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory	10
1.1.1	Vývoj B-lymfocyty a mechanismus přestavby genů pro imunoglobuliny	11
1.1.2	Vývoj T-lymfocyty a mechanismus přestavby genů pro T-buněčné receptory	14
1.1.3	Využití detekce přestaveb Ig/TR	15
1.2	Hematologické malignity	19
1.2.1	Akutní lymfoblastická leukémie	20
1.2.2	Non-Hodgkinovy lymfomy	23
2	Cíl práce	26
3	Metody	27
3.1	Analýza klonality a výběr cílů Ig/TR pro sledování MRN pomocí NGS	27
3.1.1	Příprava vzorku	27
3.1.2	Příprava sekvenačních knihoven pomocí dvoukolové PCR	28
3.1.3	Příprava sekvenačních knihoven pomocí jednokolové PCR	31
3.1.4	Sekvenování nové generace – Illumina sekvenování	32
3.2	Analýza klonality a výběr cílů Ig/TR pro sledování MRN pomocí dalších metod	33
3.3	Detekce MRN pomocí qPCR	34
3.4	Detekce MRN pomocí NGS	36
4	Výsledky	38
4.1	Optimalizace a příprava SOP pro detekci cílů Ig/TR pro sledování MRN	38
4.2	Kvantifikace MRN pomocí NGS u pacientů s ALL	39
4.3	Ověření pozitivitu u níže pozitivních vzorků pomocí qPCR.....	45
4.4	Charakterizace repertoáru TR pomocí NGS u pacientů s ALK ⁺ ALCL	48
5	Diskuze	51
6	Závěr	59
7	Souhrn	60
8	Summary	61

9	<i>Seznam publikací</i>	62
9.1	Původní vědecké práce, které jsou podkladem této dizertační práce	62
9.2	Další publikace autora, které nesouvisí s tématem práce	63
10	<i>Seznam použité literatury</i>	64
11	<i>Přílohy</i>	82

1 Úvod

Poruchy v různých fázích vývoje lymfocytů způsobují široké spektrum chorob, od malignit, především leukémií a lymfomů, po geneticky podmíněné poruchy krvetvorby a imunitního systému. Společným prvkem B- a T-lymfocytů je přestavování genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TR), které zajišťují genetickou rozmanitost v reakci na antigen. Poruchy tohoto procesu mohou vést ke vzniku chorob, mechanismus přestaveb lze ale zároveň využít jako nástroj pro sledování nádorových i fyziologických klonů. Rozvoj metod sekvenování nové generace (NGS) umožnil detailní poznání přestaveb Ig/TR a jejich využití ve výzkumu a diagnostice poruch lymfoidní řady.

Tato dizertační práce popisuje vývoj a klinické použití nové metody stanovení přestaveb Ig/TR pomocí NGS, která byla vyvinuta v rámci spolupráce s pracovní skupinou EuroClonality-NGS pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) (Příloha 1).

Tato metodika byla validována na velkém souboru dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a výsledky byly publikovány (Příloha 2). Nová metoda se ukázala jako přesnější než v současnosti používaná metoda kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). V dnešní době ale qPCR představuje cenově dostupnější alternativu a její používání není možno zcela opustit. V další studii jsme se zabývali analýzou vzorků níže pozitivních pomocí qPCR a cílem této studie bylo zlepšit kritéria pro identifikaci MRN pozitivních vzorků (Příloha 3). Dále jsme tuto metodiku uplatnili pro sledování klonality a odpovědi fyziologických T-lymfocytů u pacientů trpících anaplastickým velkobuněčným lymfomem (ALCL) (Příloha 4). Tyto publikace jsou podkladem pro předkládanou dizertační práci.

1.1 Přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory

Schopnost imunitního systému rozpoznávat miliony antigenních struktur, dokonce i těch, se kterými se organismus nemohl evolučně ani setkat, je typická pro lidský imunitní systém. To je umožněno díky antigeně specifickým receptorům – imunoglobulinům na B-lymfocytech a T-buněčným receptorům na T-lymfocytech. Jedná se o tzv. adaptivní, neboli získanou imunitní odpověď, a jejich diverzita je pak získána díky jednomu z nejsložitějších biologických procesů – přestavbám genů pro Ig/TR, tzv. přestavbám V(D)J. Jedná se o mechanismus náhodného přeskupování genových úseků za účelem vytvoření jedinečných

kombinací pro každou lymfocytární buňku (Davis & Bjorkman, 1988; Dongen & Wolvers-Tettero, 1991; Hesslein & Schatz, 2001).

Na začátku šedesátých let minulého století bylo představeno několik rozdílných teorií vzniku diverzního antigenního repertoáru (Weill & Reynaud, 1996). Diverzita imunoglobulinů je dosažena buď přestavbami mnoha variabilních (V) a jednoho konstantního (C) genového segmentu (Dreyer & Bennett, 1965), rekombinací mezi několika geny kódujícími V segmenty (Edelman & Gally, 1967; Smithies, 1967), inzercí mini exonů ((Wu & Kabat, 1970) anebo hypermutací několika genů pro V oblast (S. Brenner & Milstein, 1966). Proces přestaveb genů pro imunoglobuliny a tvorba primárního antigenního repertoáru byly nejprve dokázány v myši kostní dřeni v sedmdesátých letech (Tonegawa, 1983) a dále potvrzeny i u většiny obratlovců. Například však u kuřat nebo králíků se diverzifikace B-buněčného repertoáru děje pomocí genové konverze, u ovcí pak dochází k hypermutacím (Knight & Crane, 1994; Reynaud et al., 1991, 1994).

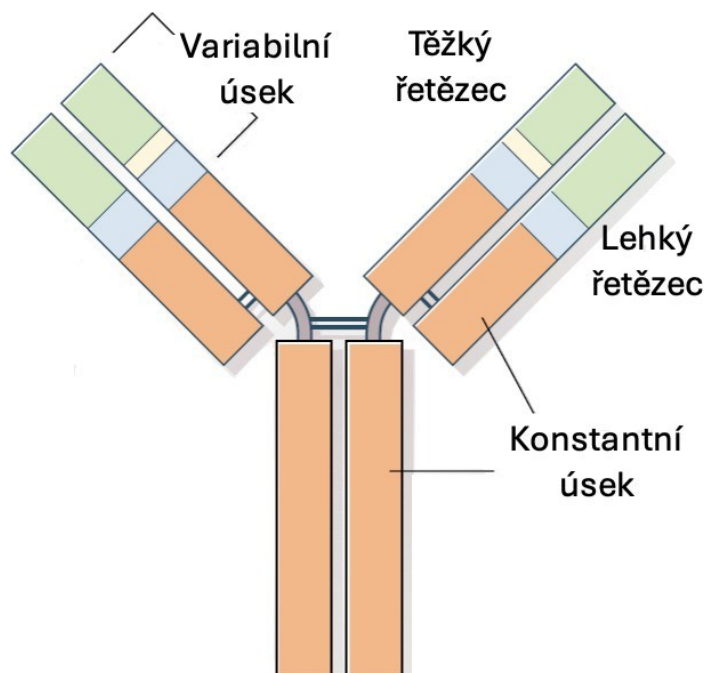
1.1.1 Vývoj B-lymfocytu a mechanismus přestavby genů pro imunoglobuliny

Vývoj B-lymfocytů začíná v kostní dřeni, kde kromě B-lymfocytů vznikají z pluripotentních kmenových buněk společné progenitory pro další krevní elementy. Další dozrávání probíhá v sekundárních lymfatických orgánech. Pro správnou funkci imunitního systému je nezbytné produkovat miliony jedinečných imunoglobulinových molekul, které jsou připraveny specificky rozpoznávat obrovské množství různých antigenů (Hesslein & Schatz, 2001). Exprese funkčního antigenního receptoru na povrchu B-lymfocytů je kriticky důležitá pro jejich vývoj a přežití (Küppers et al., 1999). U buněk s nesprávným uspořádáním V(D)J dochází k apoptóze (Lam et al., 1997).

Imunoglobuliny B-lymfocytů jsou složeny ze dvou identických lehkých řetězců (L) a dvou identických těžkých řetězců (H), které jsou spojené disulfidovou vazbou (Obrázek 1). Řetězce se skládají z variabilní a konstantní oblasti a jsou kódovány třemi nezávislými genovými lokusy. Geny *Igκ* a *Igλ* pro lehký řetězec se nachází na chromosomu 2 a chromosomu 22, gen *IgH* pro těžký řetězec je na chromosomu 14 (Erikson et al., 1981; Malcolm et al., 1982; McBride et al., 1982). Každý z těchto lokusů pokrývá od jedné do několika Mb velkou oblast DNA. Genový segment kódující těžký řetězec *Ig* obsahuje v pořadí od 5' konce přibližně 46-52 sekvenčně podobných úseků V („variability“), řadících se do sedmi rozdílných rodin (Matsuda et al., 1998; Van Dongen et al., 2003). Následuje skupina 27 funkčních úseků D („diversity“) (Corbett et al., 1997), 6 funkčních

úseků J („joining“) (Yamada et al., 1991) a na 3' konci jsou geny kódující konstantní oblast řetězce. Genové segmenty kódující lehké řetězce mají mírně odlišné uspořádání na rozdíl od segmentů pro *IgH*, neobsahují genové segmenty D a mají menší počet úseků V a J (Matsuda et al., 1998). Struktura každého lokusu se může mezi jednotlivými živočišnými druhy dramaticky lišit.

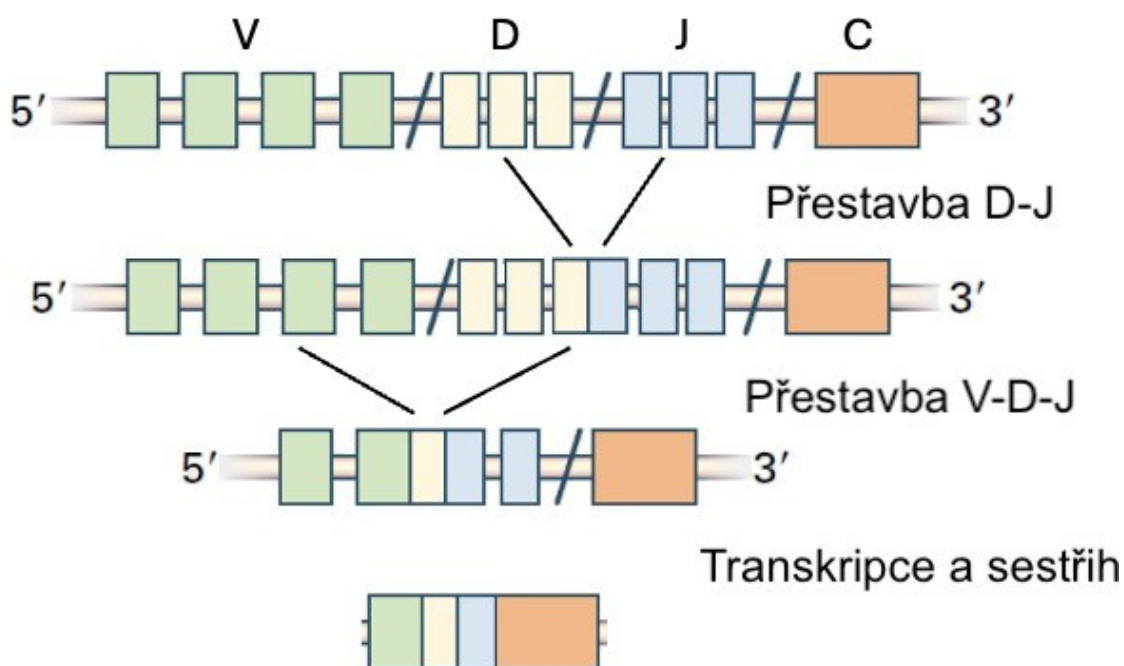
Komplex proteinů zajišťující rekombinaci V(D)J rozeznává sekvence nazývané RSS („rekombinační signální sekvence“), které jsou na koncích jednotlivých V, D a J úseků. Jedná se o vysoce konzervované sekvence heptamerů a nonamerů (Cuomo et al., 1996; Matsuda et al., 1998). Heptamery jsou pro V(D)J rekombinaci naprosto klíčové, experimentálně nebyly nalezeny žádné rekombinanty se substráty, ve kterých RSS postrádá heptamer. Na druhou stranu RSS postrádající nonamer může stále projít procesem rekombinace (Cuomo et al., 1996; Ezekiel et al., 1995). Důležitou roli dále hrají enzymy nacházející se pouze ve vyvíjejících se lymfocytech, konkrétně RAG1 a RAG2 kódované rekombinačně-aktivačními geny, které rozpoznávají právě RSS sekvence (Cuomo et al., 1996).



Obrázek 1: Schématické znázornění imunoglobulinu. Převzato (Küppers et al., 1999) a upraveno, Copyright Massachusetts Medical Society.

Přestavování genů pro Ig začíná v progenitorech lymfocytů, kdy nejdříve dochází k vyšťepování úseku genového komplexu mezi určitým náhodným D segmentem a některým J segmentem – přestavba DJ. Poté následuje vyšťepování rozsáhlého úseku mezi některým V segmentem a DJ segmentem vzniklým v předchozím kroku. Tím dochází ke kompletní

přestavbě V(D)J (Obrázek 2) (Alt et al., 1984; Kraj et al., 1997; Rao et al., 1999). Dále jsou při této specifické rekombinaci DNA klíčové další enzymy, například DNA ligasa IV, Ku70 a Ku80, důležité pro opravy DNA (Grawunder et al., 1998; Nussenzweig et al., 1996; Ouyang et al., 1997) a enzymy terminální deoxynukleotidyl transferázy, jejichž působením dochází k prodlužování odštěpených konců o krátké náhodné úseky N, které nejsou původně přítomny v zárodečné linii genu a dále zvyšují variabilitu vznikajících antigenních receptorů (Baltimore, 1974; Desiderio et al., 1984; Gangi-Peterson, 1997).



Obrázek 2: Schéma přestavby genů pro imunoglobuliny. Převzato (Küppers et al., 1999) a upraveno, Copyright Massachusetts Medical Society.

Všechny tyto výše popsané kroky probíhají paralelně na obou chromosomech do chvíle, kdy na jednom z nich nedojde k vytvoření správné produktivní přestavby V(D)J. To je taková přestavba, ze které se z odpovídající mRNA může začít přepisovat kompletní těžký řetězec. Díky tzv. alelické exkluzi se přestavování na druhém chromosomu v tuto chvíli zastaví a naprostá většina B-lymfocytů produkuje pouze jeden těžký řetězec. Stává se z ní preB-lymfocyt. Dále si buňka syntetizuje tzv. náhradní lehký řetězec, jehož přítomnost je signálem pro začátek přeskupování genů lehkých řetězců. Nejprve dochází k přeskupování genů pro *Igκ* a následně pro *Igλ*. Pokud na žádném z chromosomů nedojde k úspěšnému přeskupování genů, buňka umírá řízenou buněčnou smrtí. PreB-lymfocyt se dostává do dalšího stádia exprese povrchového imunoglobulinu (IgM), kdy se z něj stává nezralý B-lymfocyt (Bassing et al., 2002; Hesslein & Schatz, 2001; Weill & Reynaud, 1996).

Při setkání buňky s antigenem dochází nejen k diverzifikaci Ig repertoáru, ale také ke zvyšování afinity imunoglobulinů ke konkrétním rozpoznávaným antigenům. To se děje především díky procesu zvanému afinitní maturace, který zahrnuje biologické děje, jako somatickou hypermutaci, izotypový přesmyk a následně klonální selekci (Tonegawa, 1983). Somatická hypermutace je proces, který za účelem vytvoření variant s vyšší afinitou vkládá do variabilního úseku imunoglobulinu bodové mutace. Důležitou roli zde hraje enzym zvaný aktivací indukovaná cytidin deamináza. B-lymfocyty poté musí soutěžit o dostupnost antigenu, a pouze buňky vážící antigen s nejvyšší afinitou přežívají a stávají se paměťovými (Rajewsky, 1996; Teng & Papavasiliou, 2007).

Všechny výše popsané procesy sice zvyšují diverzitu imunitního repertoáru, ale současně mohou vést i k tvorbě B-lymfocytů nesoucích autoreaktivní receptory. Nově vytvořené autoreaktivní receptory B-lymfocytů prochází buď řízenou buněčnou smrtí nebo dochází k úpravám tzv. sekundární přestavbou V(D)J. Po tomto procesu, kdy se obvykle nahrazuje jeden lehký řetězec jiným, dochází k expresi receptoru již bezproblémového, a B-lymfocyt opouští kostní dřev a stává se zralým, naivním (Küppers et al., 1999).

1.1.2 Vývoj T-lymfocytu a mechanismus přestavby genů pro T-buněčné receptory

Antigenní receptory T-lymfocytů jsou svou primární sekvencí, genovou organizací a procesem rekombinace podobné imunoglobulinům. T-buněčné receptory jsou složeny ze dvou řetězců spojených disulfidovou vazbou, přičemž každý řetězec se skládá z variabilního a konstantního úseku. TR jsou složeny ze čtyř různých polypeptidů α (TRA), β (TRB), δ (TRD) a γ (TRG), které tvoří dva různé heterodimery ($\alpha:\beta$ a $\gamma:\delta$) (Davis & Bjorkman, 1988). Receptory typu $\gamma:\delta$ jsou přítomny například na většině dendritických epidermálních T-buněk v kůži, avšak pouze na malém množství T-lymfocytů v periferní krvi (Kuziel et al., 1987; Stingl et al., 1987). Na rozdíl od imunoglobulinů B-lymfocytů jsou T-buněčné receptory neustále přítomny na povrchu buňky a antigeny rozeznávají pouze díky hlavnímu histokompatibilnímu komplexu (MHC) (Davis & Bjorkman, 1988).

Základní organizace genových lokusů pro TR je podobná jako pro imunoglobuliny. Obecně platí, že variabilní řetězec TRB a TRD je kódován náhodnou kombinací genových segmentů V, D a J, jako je tomu u těžkých řetězců imunoglobulinů, a naopak variabilní řetězec TRA a TRG je kódován náhodnou kombinací pouze dvou genových segmentů V a J, jako je tomu u lehkých řetězců Ig. Geny pro TR mají například podstatně méně genových

segmentů V, než je tomu u imunoglobulinů. Samotný mechanismus přestavby V(D)J genů pro TR i komplex enzymů je podobný jako přeskupování genů pro Ig. První výjimkou je umístění genového lokusu pro TRA a TRD, které jsou oproti ostatním unikátně umístěným úsekům promíchané (Bassing et al., 2002; Davis & Bjorkman, 1988; Hesslein & Schatz, 2001). Druhou výjimkou je samotná přestavba V(D)J genů pro TRD, kdy nejdříve dochází k vyštěpování úseku genového komplexu mezi určitým náhodným V segmentem a některým D segmentem – přestavba VD. Poté následuje vyštěpování úseku mezi náhodným J segmentem a VD segmentem vzniklým v předchozím kroku – přestavba V(D)J. Navíc se do výsledného složení podjednotky TRD mohou vmezeřit další dva až tři segmenty D (přestavba VDDJ, VDDDJ), čímž se zvyšuje variabilita tohoto T-buněčného receptoru (Dongen & Wolvers-Tettero, 1991).

Vývoj T-lymfocytů probíhá až na pár výjimek v thymu, kam prekurzory T-lymfocytů, tzv. pro-thymocyty, migrují z kostní dřeně. Zjednodušeně se může rozdělit do tří stádií: vývoj T-buněčného receptoru (viz výše), selekce a zrání. Při selekci je testováno, s jakou afinitou se nově vyvíjející se T-lymfocyty prostřednictvím jejich TR a MHC komplexu váží na antigeny. Pokud se thymocyt váže s podprahovou afinitou na MHC proteiny, nebo naopak pokud váže příliš silně komplex MHC proteinů s peptidy, které jsou tělu vlastní, dostává signál, který vede k apoptóze. Thymocyty rozeznávající v thymu s nízkou afinitou MHC proteiny jsou pozitivně selektovány a jako zralé T-lymfocyty opouští thymus a migrují do sekundárních lymfatických orgánů (Dongen & Wolvers-Tettero, 1991; Fowlkes & Pardoll, 1989; Germain, 2002; Spits et al., 1995).

1.1.3 Využití detekce přestaveb Ig/TR

Molekulární analýza specifických přestaveb genů pro Ig/TR je v dnešní době používána jak v diagnostice některých hematologických onemocnění, tak v průběhu léčby ke stanovení prognózy, sledování remise či k detekci relapsu u těchto chorob. Jako vhodné diagnostické markery sloužící k detekci nádorových buněk jsou používány právě přestavby Ig/TR. Lymfocyt procházející nádorovou transformací dává vznik malignímu klonu, který nese stejnou sekvenci Ig/TR. Častým diagnostickým postupem je nejdříve analýza klonality vzorku. U maligní nádorové populace buněk je typickým znakem právě jejich monoklonalita, která může tuto populaci odlišit od oligoklonálních či polyklonálních populací reaktivních lymfocytů. To však nemusí být pravidlem a monoklonální populace lymfocytů nemusí vždy naznačovat maligní proces. Pro správnou interpretaci dat je klíčová

především znalost biologie přestaveb (Dongen & Wolvers-Tettero, 1991; Groenen et al., 2008; Van Dongen et al., 2003). Nekompletní přestavby DJ se vyskytují nejčastěji u malignit v časných vývojových stádiích. Jedná se o tzv. neproduktivní přestavby, tedy takové, které nevedou k tvorbě proteinu. Naopak u malignit pocházejících z vyžrálejších stádií se vyskytují přestavby kompletní a produktivní, specifické proti konkrétnímu antigenu (Tsakou et al., 2012). Dále je znalost biologie přestaveb důležitá také například pro určení prognózy u chronické lymfocytární leukémie (CLL). Pokud se lymfocyt nachází ve zralejším vývojovém stádiu a již prošel procesem afinitní maturace, pacient má lepší prognózu, než by tomu bylo u méně vyvinutých buněk (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999).

Analýza klonality

K analýze klonality u lymfoproliferativního onemocnění se nejprve využívala metoda Southern blot, později, koncem devadesátých let minulého století, konsorcium 45 evropských laboratoří (EuroClonality) iniciovalo vytvoření standardizované polymerázové řetězové reakce, která spolu s dalšími vyšetřeními slouží k upřesnění správné diagnózy (Beishuizen et al., 1993, 1994; Breit et al., 1993; Pongers-Willemse et al., 1999; Van Dongen et al., 2003). Problém případné falešné negativy byl vyřešen navržením kompletního setu primerů, který zahrnul všechny možné přestavby V(D)J, a vyhodnocením několika cílů na vzorek. Možnost falešné positivity eliminovalo především zavedení standardizovaných metod pro vyhodnocení produktů PCR, jako je heteroduplexní analýza, analýza fragmentů GeneScan, případně následné Sangerovo sekvenování (Bottaro et al., 1994; Germano et al., 2003; Kneba et al., 1995; Langerak et al., 1997; Pongers-Willemse et al., 1999; Van Dongen et al., 2003). Tato technika, která využívá přes stovku různých primerů, byla úspěšně aplikována na lymfoproliferativní onemocnění, ukázala vysokou frekvenci maligních případů vykazujících klonalitu, a stala se tak celosvětovým standardem (Bruggemann et al., 2007; Evans et al., 2007; Groenen et al., 2008; Langerak et al., 2007; Van Dongen et al., 2003). V posledních letech se však do popředí dostává sekvenování nové generace, které postupně nahrazuje dosud používané metody. Používá se multiplexní PCR, pro kterou byly nově navrženy primery pokrývající většinu kombinací přestaveb segmentů V(D)J. Dále se vnášejí sekvenační adaptory a amplikony se sekvenují s nižším pokrytím, nejčastěji na přístrojích firmy Illumina (Kapitola 3.1.4) (Bruggemann et al., 2019; Knecht et al., 2019; Scheijen et al., 2019; Van Dongen et al., 2003).

Určení správné diagnózy u některých maligních onemocnění lymfoidní řady je obtížné. Detekce přestaveb Ig/TR jakožto analýzy molekulární klonality je možno využít u jakýchkoliv suspektních B- a T-buněčných proliferací, k určení rozsahu infiltrace

lymfomů, u lymfoproliferací imunosuprimovaných pacientů, včetně těch po transplantaci. Tuto metodu lze také použít pro stanovení klonálního vztahu mezi dvěma malignitami u jednoho pacienta v průběhu času či k rozeznání mezi relapsem a druhou malignitou (Metzler et al., 2008; Van Dongen et al., 2003; Zuna et al., 2007). Sledování evoluce klonů je důležitým aspektem, jelikož nám umožňuje monitorovat vývoj a dynamiku malignity a její odpověď na terapii a případně dále přizpůsobovat léčbu změnám v průběhu onemocnění (Slamova et al., 2014; Tsakou et al., 2012).

Sledování minimální reziduální nemoci

Výše popsané klonální přestavby a jejich sekvence lze dále využít pro sledování minimální reziduální nemoci, tedy k detekci velmi nízkých počtů leukemických buněk (Coustan-Smith et al., 2000).

U leukemických pacientů se nejčastěji využívají tři způsoby detekce MRN. Nejprve je to průtoková cytometrie. Tato metoda využívá schopnost identifikovat a kvantifikovat leukemické buňky na základě jejich specifického povrchového fenotypu. Její velkou výhodou je rychlost a jednoduchost (Campana & Coustan-Smith, 1999). Průtoková cytometrie umožňuje detekovat kombinaci abnormálně exprimovaných markerů, a tím odlišit leukemické klony od zdravých buněk imunitního systému. Mezi často používané povrchové markery pro B-ALL patří například CD19, CD10, CD20, CD34, CD45, CD81, CD66c nebo CD123, CD73 nebo CD304 a pro T-ALL CD3, CD5, CD7, CD4, CD8, CD45, CD48, CD99, CD1a a jejich kombinace. Například pro pacienty s B-prekurzorovou ALL (BCP-ALL) se v současné době v klinické praxi používá standardizovaný osmi-barevný panel protilátek, který zajišťuje vysokou senzitivitu a specifitu. Citlivost této metody dosahuje hranice 10^{-5} , což je srovnatelné s metodou qPCR využívající detekci přestaveb Ig/TR (Kowarsch et al., 2024; Theunissen et al., 2017).

Dalším způsobem stanovení hladiny MRN je právě detekce přestaveb Ig/TR. Nejčastěji se využívá qPCR, která je 400–4000 senzitivnější, než dříve používaný Southern blot (Van der Velden et al., 2002), a jedna leukemická buňka může být detekována mezi 10^4 – 10^5 zdravých buněk kostní dřeně (Feroni et al., 1999; Van der Velden et al., 2002). Detekce s citlivostí 10^{-6} je teoreticky možná, ale pouze při adekvátním množství buněčných ekvivalentů v reakci.

Detekce specifických klonálních přestaveb Ig/TR určená ke sledování MRN u pacientů s ALL pomocí qPCR je laboratorně pracná a časově náročná metoda, která přináší hned několik úskalí (Pongers-Willems et al., 1999; Van der Velden et al., 2002). Prvním důležitým krokem je správný výběr vhodného cíle, především pokud již v době diagnózy

pozorujeme další subklony (Beishuizen et al., 1994). Část klonů může v průběhu času vymizet, čímž by mohlo docházet k falešně pozitivním výsledkům (Langlands et al., 1993). Oligoklonalita imunoglobulinového těžkého řetězce se například objevuje až u 40 % pacientů s BCP-ALL (Kitchingman et al., 1986; Szczepański et al., 1999; Van der Velden et al., 2002). Spolehlivé rozlišení přestaveb Ig/TR spojených s ALL od jiných klonálně expandovaných populací lymfocytů je složité nejen kvůli možnosti oligoklonality, ale také kvůli přítomnosti tzv. liniové promiskuity („cross-lineage“) přestaveb Ig/TR. Jedná se o proces, kdy jsou přestavovány geny TR u B-ALL a naopak geny pro imunoglobulinové receptory B-lymfocytů jsou detekovány u T-ALL (Szczepański et al., 1999). Například u BCP-ALL dochází poměrně často k přestavbám TRD v počátečních fázích diferenciaci, nejčastěji se jedná o nekompletní přestavby VD (TRDV2-TRDD3, TRDD2-TRDD3) (Bruggemann et al., 2019; Brumpton et al., 2000; Kelm et al., 2023; Kotrova et al., 2018; Meleshko et al., 2006; Szczepański et al., 1999). V nové studii byly dále u BCP-ALL popsány expandované kompletní TRDV-TRDJ klonotypy, které pravděpodobně představují fyziologické $\gamma\delta$ T-lymfocytární subpopulace, které nejsou leukemické a neřadí se mezi typické „cross-lineage“ TRD. Tyto přestavby by neměly být využívány jako cíle pro sledování MRN (Kelm et al., 2023).

Dále je třeba navrhnout pacient-specifické primery a spolu s univerzálními reverzními primery a sondami pro jednotlivé dané přestavby optimalizovat tento systém pomocí qPCR. Kvantifikace MRN se následně provádí podle ředící řady připravené z DNA diagnostického vzorku. Jako negativní kontrola reakce slouží DNA zdravých dárců, která pomáhá stanovit rozmezí falešné positivity (Bruggemann et al., 2004; Van der Velden et al., 2007). Pravidla pro správnou interpretaci výsledků stanovuje konsorcium EuroMRD na základě mnohanásobných kontrol kvality napříč evropskými laboratořemi (Van der Velden et al., 2007). Vždy se také musí zvážit, v jaké fázi léčby je MRN měřena. Studie ukazují, že například po transplantaci kostní dřeně, kdy dochází k regeneraci imunitního systému, můžeme pozorovat nízké pozitivní hodnoty MRN, přestože pacienti zůstávají v remisi a skutečně se jedná pouze o falešně pozitivní výsledky, způsobené nespecifickou vazbou primerů (Fronkova et al., 2008; Kotrova et al., 2017). Naopak u některých malignit dochází k dalším přestavbám sledovaného klonu a ke změně sekvence, což vede k falešné negativitě (Bruggemann et al., 2010; Van der Velden et al., 2007). Stejně jako se k analýze klonality Ig/TR již využívá NGS, tak se i u kvantifikace MRN pomocí detekce Ig/TR dostává tato metoda do popředí. Jedná se o laboratorně jednodušší a specifitější metodu. Pro stanovení hladiny MRN pomocí NGS se opět využívá multiplexní PCR reakce. Ke každému vzorku

pacienta je dále přidána standardizovaná kontrola DNA, která je důležitá pro samotnou kvantifikaci MRN (Kapitola 3.4) (Bruggemann et al., 2019; Knecht et al., 2019; Kotrova et al., 2014, 2017). V současnosti je snaha zavést tuto metodu do klinické praxe. K tomu bylo nutné upravit stávající protokoly pro detekci klonality pro dosažení dostatečné senzitivity, porovnat její výpovědní hodnotu se stávajícími metodami (především qPCR) a provést její standardizaci. První dva kroky byly cílem této disertační práce.

Poslední způsob detekce MRN zahrnuje analýzu fúzních genů nebo delecí, čehož může být využito v případě, kdy až u 5 % pacientů nejsou přestavby Ig/TR nalezeny nebo nejsou vhodné ke sledování (Bruggemann et al., 2010; Fronkova et al., 2005; Kuiper et al., 2021; Pieters et al., 2016; Van der Velden et al., 2002; Van der Velden & van Dongen, 2009). Tyto genetické změny jsou často považovány za primární spouštěče leukemogeneze a zůstávají stabilní během postupné progresse onemocnění. Díky tomu jsou ideálními kandidáty jako alternativní cíle pro sledování MRN. Při použití postupu založeném na DNA je důležité identifikovat genomické zlomy, které jsou unikátní pro každého pacienta. To může být zjištěno například celogenomovým sekvenováním nebo speciálně navrženým panelovým NGS (De Vree et al., 2014; Hottentot et al., 2017; Kuiper et al., 2021). Často jsou pro tyto účely využívány fúzní geny *ETV6::RUNX1*, *BCR::ABL*, *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::MLLT1*. Následně je navržena specifická reakce qPCR. Pokud využíváme RNA, je nutný přepis genetické informace a využívá se kvantitativní, reverzně transkriptázová PCR. Studie ukazují, že tato data mají srovnatelné výsledky s detekcí MRN pomocí přestaveb Ig/TR (Kuiper et al., 2021; Peham et al., 2004; Venn et al., 2012; Zuna et al., 2022).

1.2 Hematologické malignity

Při normální funkci organismu se díky přestavbám genů pro Ig/TR vytváří obrovské množství unikátních lymfocytů. Především pak s rozvojem sekvenování nové generace se ukázalo, že mezi jednotlivci se významně liší nejen množství jednotlivých přestavovaných úseků ale i samotné sekvence (Gadala-Maria et al., 2015; Hou et al., 2016; Kidd et al., 2012). Fyziologický stav přestaveb Ig/TR však může být narušen v případě infekcí, kdy dochází k masivnímu nárůstu klonů, které mají největší afinitu k danému antigenu, nebo u širokého spektra nejrozličnějších onemocnění (Davis & Bjorkman, 1988; Langerak et al., 2017; Tonegawa, 1983). Jedná se o různé poruchy imunitního systému, například imunodeficity, kdy je podstatně nebo pouze částečně sníženo množství lymfocytů, autoimunitní poruchy,

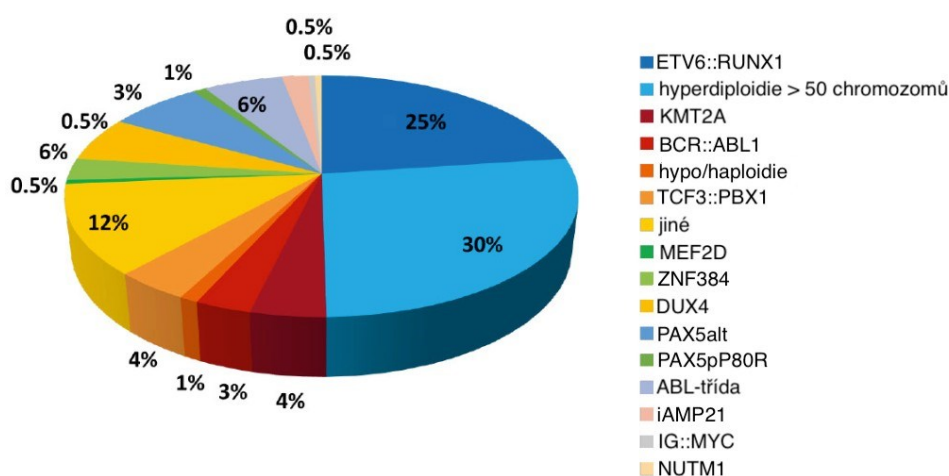
kdy nedochází k eliminaci autoreaktivních klonů, a hematologické malignity, kdy při vývoji lymfocytu dochází k maligní transformaci (Cunningham-Rundles & Ponda, 2005; Fischer, 2004; Goodnow, 2007). Pokud v průběhu procesu krvetvorby dochází k nádorové transformaci, vznikají různé typy leukémií a lymfomů. Ty mohou být rozděleny na základě rychlosti progresu a podle typu postižených buněk. Z progenitorů lymfoidní linie vzniká akutní lymfoblastická leukémie, z myeloidních progenitorů akutní myeloidní leukémie (AML), a ze zralých lymfocytů různé typy lymfomů a chronická lymfocytární leukémie. Zvláštním typem je pak chronická myeloidní leukémie, která vzniká nádorovou transformací kmenové krevní buňky (Foon & Todd, 1986; Gambacorti-Passerini et al., 2011; Hope et al., 2004; Munir & Khan, 2019; Stevenson et al., 2021; Vadillo et al., 2018).

1.2.1 Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní leukémie je nejčastějším dětským maligním nádorovým onemocněním, kdy tvoří téměř 30 % dětských zhoubných nádorů. Nejčastějším typem je pak akutní lymfoblastická leukémie, která tvoří až 80 % všech leukémií, druhým nejčastějším typem je akutní myeloidní leukémie, dalšími pak myelodysplastický syndrom, chronická myeloidní leukémie a juvenilní myelomonocytární leukémie. V České republice je incidence ALL tři až pět nových případů na sto tisíc dětí ve věku 0–18 let, přičemž nejvíce případů je mezi 2–5 lety života. Přesné příčiny vzniku ALL nejsou zcela známy, významnou roli zde mohou hrát genetické predispozice, získané genetické mutace a následně nepřiměřená imunitní odpověď na mnohdy běžné virové a bakteriální infekce. Incidence onemocnění je vyšší ve vyspělých zemích než v rozvojových. Pětileté celkové přežití pacientů se za poslední dekádu zvýšilo a nyní dosahuje více než 90 %. To odráží pokroky v celkovém chápání tohoto onemocnění, ke kterému přispívá prudký vývoj metod a experimentálních modelů pro sledování molekulárních mechanismů. Dalším pokrokem je přesná riziková stratifikace a zapojení nové cílené léčby v léčebných protokolech (Hrusak et al., 2002; Inaba & Mullighan, 2020; Jeha et al., 2019). Podstatně horší celkové přežití dětských pacientů je u AML, které se pohybuje zhruba kolem 70 % (Rasche et al., 2018). U dospělých pacientů s ALL jsou tato čísla ještě nižší a prognóza závisí na věku a dalších rizikových faktorech. Zatímco prognóza pacientů standardního rizika s dobrou odpovědí na léčbu může být až 70–80 %, u pacientů vysokého rizika je pětileté přežití bez události v současnosti v rozmezí 30–40 % (Jabbour et al., 2015; Stabellini et al., 2023). Současné klinické studie se již nezaměřují na celkové přežití, ale stále větší důraz kladou na kvalitu života pacientů (Pui et al., 2011).

Genetické znaky

Diagnostické postupy u akutní lymfoblastické leukémie zahrnují morfologická, cytogenetická a imunologická vyšetření periferní krve a kostní dřeně. ALL se na základě imunofenotypu dělí na ALL z B-řady, která tvoří většinu případů a zahrnuje podle zralosti typy pro-B, „common B“, pre-B a vzácně zralou B-ALL/Burkittův lymfom a na T-buněčnou ALL, která představuje asi 15 % případů a bývá spojena s horší prognózou. Téměř všechny dětské případy ALL mohou být dále rozděleny podle specifických genetických abnormalit do několika subtypů (Obrázek 3), což má významný vliv na prognózu a volbu léčebného postupu (Hrusak et al., 2002; Mullighan et al., 2007; Pui et al., 2011).



Obrázek 3: Frekvence genetických subtypů u dětských pacientů s ALL. Převzato (Steinemann et al., 2024) a upraveno.

Mezi nejčastější podtypy ALL patří hyperdiploidní ALL, charakterizovaná více než 50 chromozomy v leukemické buňce, a leukémie s fúzním genem *ETV6::RUNX1*, způsobená chromozomální translokací $t(12;21)(p13;q22)$. Tyto dva podtypy tvoří přibližně 50 % všech případů ALL a jsou spojeny s příznivou prognózou, s méně než 15 % pacientů, kteří prodělají relaps (Ito et al., 1999; Pui, 2000; Pui & Evans, 1998; Rubnitz, Pui, et al., 1999). Dalším podtypem, který hraje zásadní roli ve stratifikaci pacientů a je spojen se špatnou prognózou, je ALL s chromozomální translokací $t(9;22)(q34;q11)$, která vede ke vzniku fúzního genu *BCR::ABL*. Tento gen kóduje protein s abnormální tyrosinkinázovou aktivitou, což vede k nekontrolované proliferaci buněk. Tato translokace je typická pro chronickou myeloidní leukémii a u ALL u dětských pacientů se vyskytuje zhruba u 3 % případů (Hunger et al., 2011; Zuna et al., 2022). Dalším důležitým subtypem ALL jsou translokace spojené s genem *KMT2A* (MLL „mixed lineage leukemia“) na dlouhém raménku 11. chromozomu, který se může translokovat s několika desítkami různých genů, přičemž

nejčastěji se jedná o translokaci *KMT2A::AFF1* (dříve *MLL-AF4*), která je významná u kojeneckých ALL a je spojená s velmi nepříznivou prognózou (Pui & Campana, 2007). Podtyp *KMT2A::MLLT1* (dříve *MLL-ENL*), který může být přítomný jak u B-ALL, tak u T-ALL, je také charakteristický horší prognózou, zejména u mladších pacientů, kde je jeho výskyt častější (Rubnitz et al., 1999). Další subtypy ALL zahrnují například případy s nadměrnou expresí genu *CRFL2*, vedoucí k aktivaci signální dráhy JAK-STAT nebo leukémie s fokální delecí genu *ERG* (Öfverholm et al., 2013; Roll & Reuther, 2010).

Léčba

Mezi hlavní rizikové faktory dětské ALL patří kromě různých podtypů leukémie také časná odpověď na léčbu, kterou lze monitorovat pomocí detekce MRN, dále věk, pohlaví a iniciální počet leukocytů ($WBC < 50 \times 10^9/l$). Klinické studie ukazují, že i v rámci jednoho subtypu ALL mohou být odpovědi na léčbu značně heterogenní. Z toho důvodu je nezbytné individualizovat léčebné strategie na základě specifické reakce každého pacienta. Díky současným chemoterapeutickým protokolům dosahuje kompletní remise až 99 % dětských pacientů (Carroll et al., 2003; Pui et al., 2011). Pediatričtí pacienti jsou v České republice léčeni podle protokolu AIEOP-BFM ALL 2017, který je iniciálně vypracován v široké mezinárodní spolupráci koordinované italskou asociací „Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica“ a německou skupinou „Berlin-Frankfurt-Münster“. Stratifikace pacientů do jednotlivých léčebných skupin vychází v současné době nejen z přítomnosti určitých genetických aberací, ale nově také především z hodnot minimální reziduální nemoci.

Minimální reziduální nemoc u pacientů s ALL

Minimální reziduální nemoc je definována jako přítomnost velmi malého množství leukemických buněk, které nejsou detekovatelné běžnými cytologickými metodami. Pokud je hladina leukemických blastů v kostní dřeni nižší než 5 %, je pacient v klinické remisi. Historicky byla detekce MRN založena na morfologických metodách, které byly značně subjektivní a největší limitací byla jejich senzitivita (Campana & Pui, 1995). Současné metody, jak již bylo zmíněno výše, využívají detekci specifických přestaveb Ig/TR za použití qPCR nebo pomocí průtokové cytometrie. Tyto přístupy umožňují přesnější monitorování MRN a přispívají k optimalizaci léčby (Campana & Coustan-Smith, 1999; Van Dongen et al., 2003).

Hodnota MRN hraje klíčovou roli v prognóze pacienta z několika hledisek. Hladina MRN má prediktivní hodnotu již v časných fázích léčby, má klinický význam v remisi, a na

základě jejích hodnot v různých časových bodech terapie lze vytvořit individualizovaná pravidla pro cílenou léčbu (Borowitz et al., 2015; Campana & Pui, 2017).

Podle různých klinických léčebných protokolů se pravidla stratifikace pacientů mohou mírně lišit. Tato práce se zaměřuje na předchozí i současný protokol AIEOP-BFM ALL 2017, který se používá pro léčbu dětské ALL v ČR (Campana & Pui, 2017). Stratifikace pacientů do rizikových skupin je v současné době založena primárně na odpovědi na léčbu a hodnotách MRN. Všichni pacienti jsou stratifikováni do tří rizikových skupin: standardního rizika (SR), středního rizika (MR) a vysokého rizika (HR). Do skupiny s vysokým rizikem jsou zařazováni pacienti s nedostatečnou odpovědí na prednisonovou léčbu, která je hodnocena osmý den od diagnózy (7 dní léčby prednisonem a jedna dávka metotrexátu) pomocí průtokové cytometrie z periferní krve. Dále sem patří pacienti, u kterých byla detekována přítomnost fúzních genů *BCR::ABL* nebo *KMT2A::AFF1*, a také pacienti s hodnotou MRN $\geq 5 \times 10^{-4}$ v den 33 a ve 12. týdnu, stanovenou pomocí detekce přestaveb Ig/TR. Pacienti ve skupině s nejnižším rizikem (SR) jsou naopak ti, kteří mají negativní hodnotu MRN v obou časových bodech. U těchto pacientů se spíše dbá na snížení terapeutických dávek, aby se předešlo zbytečnému zatížení organismu.

1.2.2 Non-Hodgkinovy lymfomy

Maligní lymfomy představují velmi diverzní skupinu nádorových onemocnění. Vznikají klonální proliferací v různých stádiích vývoje především T- a B-lymfocytů a nejčastěji postihují orgány lymfatického systému. Existuje více než 30 unikátních typů lymfomů, které se velmi liší jak v epidemiologii, klinických vlastnostech, tak v optimální strategii léčby, přičemž hlavní rozdělení je na Hodgkinovy (HL) a non-Hodgkinovy lymfomy (NHL) (Matasar & Zelenetz, 2008).

První zmínka o Hodgkinově nemoci pochází z roku 1832, kdy britský patolog Thomas Hodgkin popsal případy pacientů s lymfadenopatií a zvětšenou slezinou (Hodgkin, 1832; Shanbhag & Ambinder, 2018). Až koncem devadesátých let začal být termín Hodgkinův lymfom chápán jako zhoubný nádor (Jaffe, 2001; Shanbhag & Ambinder, 2018). Na základě rozdílného složení nádorových buněk a okolního buněčného mikroprostředí se HL dělí na několik histologických podtypů. Charakteristické mikroprostředí se skládá většinou z reaktivních buněk imunitního systému a je klíčové pro přežití nádorových buněk. Hlavní nádorové buňky, označované jako Hodgkinovy a Reedovy-Sternbergovy buňky, typicky odvozené z B-lymfocytů, jsou v těchto podtypech zastoupeny v různých poměrech, což

ovlivňuje volbu léčebného postupu a samotnou prognózu onemocnění. Přibližně 10 % nově diagnostikovaných lymfomů jsou právě HL, přičemž pětileté přežití dosahuje 85 %. Významná je jeho spojitost s EBV infekcí, kdy virová DNA byla nalezena až u 50 % případů. HL onemocnění má dvouvrcholový výskyt, kdy nejčastěji postihuje pacienty ve věku 20–30 let a poté starší nad 50 let (Alaggio et al., 2022; Inghirami et al., 1994; Koshy et al., 2016; Küppers, 2009; Küppers et al., 2012; Levine et al., 1971; Shanbhag & Ambinder, 2018; Swerdlow et al., 2016).

Non-Hodgkinovy lymfomy se na rozdíl od Hodgkinova lymfomu vyznačují jasně daným buněčným původem a morfologickým subtypem, který odpovídá konkrétní vývojové fázi lymfocytu. Prognóza pacientů závisí na konkrétním subtypu lymfomu a při léčbě tohoto onemocnění je tak důležitá jeho klasifikace. NHL lze rozdělit podle původu buněk na lymfomy vycházející z B-lymfocytů, které mají obvykle lepší prognózu, a na lymfomy z T nebo NK buněk, jež jsou spojeny s horší prognózou (Armitage, 1993, 2005; Freedman & Nadler, 1991).

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) byl velmi často mylně diagnostikován. Řádně popsán byl v roce 1985 jako nová kategorie lymfomů spadající do skupiny NHL. ALCL je nejčastějším podtypem T-buněčného lymfomu, tvoří až 8 % NHL u dospělých a až 30 % velkobuněčných lymfomů u dětí. Vychází z T-buněk nebo tzv. „null-buněk“, buněk bez jednoznačných B nebo T znaků. Je definován proliferací velkých pleomorfních blastů, které na povrchu exprimují antigen CD30. EBV infekce nádorových buněk je u tohoto typu lymfomu velmi vzácná (Harris et al., 1994; Mora et al., 2000; Nakagawa et al., 1997; Stein et al., 1985, 2000). Další dělení ALCL na základě morfologických a imunofenotypových znaků je velmi komplikované. Typicky se dělí na primární systémový ALCL, primární kožní ALCL a sekundární ALCL. Významným faktorem je také přítomnost proteinu anaplastické lymfomové kinázy (ALK), který je důležitý ve vývoji a růstu buněk. Gen *ALK* je často přestavěn fúzí s jinými geny. ALK^{-} ALCL je v porovnání s ALK^{+} ALCL častější u starších dospělých, s nejvyšší incidencí kolem 60. roku života, a má obecně horší prognózu. Přítomnost ALK je specifická pro primární systémový ALCL, zatímco primární kožní a sekundární ALCL jsou téměř vždy ALK negativní. Klonální přestavby genů pro TR, konkrétně TRB a TRG, mohou být identifikovány až v 90 % případů ALK^{+} ALCL (Irshaid & Xu, 2020; Turner et al., 2007). Až u 80 % ALK^{+} ALCL dochází k chromosomální translokaci $t(2;5)(p23;q35)$ vedoucí k fúznímu proteinu *NPM1::ALK* (Falini et al., 1999; Irshaid & Xu, 2020; Turner et al., 2007). U zbývajících 20 % případů ALK^{+} ALCL se objevují různé další chromozomální přestavby vedoucí k alternativním fúzním proteinům.

Mezi tyto vzácnější translokace patří například *AT1C::ALK*, *TPM3::ALK*, *TFG::ALK*, které stejně jako *NPM1::ALK* podporují nádorový růst prostřednictvím signální ALK dráhy. Tato genetická různorodost ovlivňuje biologii nádoru a může mít dopad na citlivost k různým léčebným postupům (Colleoni et al., 2000; Hernandez et al., 1999; Irshaid & Xu, 2020; Lawrence et al., 2000).

Minimální reziduální nemoc u pacientů s lymfomy

K detekci minimální reziduální nemoci u lymfomů se využívá několika metod, z nichž každá má specifické výhody v senzitivitě a specifitě, jak už některé z nich byly diskutovány výše. Vhodná metoda ke sledování MRN závisí na konkrétním subtypu lymfomu a jeho molekulárních charakteristikách. Pro hodnocení odpovědi na léčbu se taktéž využívají zobrazovací metody, jako je pozitronová emisní tomografie a výpočetní tomografie. Ačkoliv tyto techniky poskytují přehled o rozsahu onemocnění, jsou velmi nákladné a nedostatečně senzitivní (D. J. Brenner & Hall, 2007; Herrera & Armand, 2017; Huntington et al., 2015).

Ke stanovení MRN je tak u mnoha subtypů lymfomů klíčová detekce cirkulujících nádorových buněk nebo bezbuněčné cirkulující nádorové DNA, která může být uvolňována během nekrózy či apoptózy nebo přímo sekretována nádorovými buňkami. K tomu se využívá průtokové cytometrie nebo qPCR, kdy jsou navrženy specifické primery na nádorově specifické sekvence, jako jsou mutace nebo chromosomální translokace (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Diaz Jr & Bardelli, 2014; Herrera & Armand, 2017; Roschewski et al., 2016). U B-buněčných lymfomů lze MRN sledovat pomocí klonálních genových přestaveb Ig (Hoster & Pott, 2016). Nové techniky, jako je především sekvenování nové generace, poskytují lepší výsledky detekce MRN u řady subtypů lymfomů, což by mohlo umožnit detailní sledování MRN v klinické praxi u většiny pacientů s tímto onemocněním (Herrera & Armand, 2017).

Také u ALK⁺ ALCL byl prokázán prognostický význam MRN, která je typicky detekována pomocí fúzního genu *NPM1::ALK* využitím qPCR (Damm-Welk et al., 2020). Dosud nebyla zkoumána možnost detekce MRN u ALCL pomocí přestaveb TR.

2 Cíl práce

Cílem předkládané dizertační práce bylo vyvinout metodu pro detekci MRN a fyziologického antigenního repertoáru lymfocytů pomocí přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory, validovat tuto metodu srovnáním se stávajícími postupy u vybraných malignit lymfoidní řady a zjistit, jaký je její klinický potenciál. Pro dosažení těchto cílů bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- vyvinout v mezinárodní spolupráci metodu pro detekci MRN pomocí nejčastějších typů přestaveb Ig/TR založenou na NGS, která bude vycházet ze současných postupů skupiny EuroClonality-NGS pro detekci klonality,
- zjistit, jak se liší stratifikace do rizikových skupin u dětské ALL provedená s použitím nové metody a stávajícího postupu založeném na qPCR,
- na základě porovnání s NGS stanovit nová kritéria pro interpretaci nízké pozitivní hodnoty MRN detekované pomocí qPCR s cílem omezit možnost falešné positivity,
- zjistit, zda použití detekce přestaveb TR pomocí NGS u pacientů s ALK⁺ ALCL přináší benefit oproti stávajícím metodám (například v podobě detekce fyziologických klonů reagujících na neoantigen).

3 Metody

Tato kapitola poskytuje přehled metod souvisejících s cílem disertační práce, které prováděla nebo optimalizovala autorka. Ostatní metody jsou popsány v příložených publikacích.

3.1 Analýza klonality a výběr cílů Ig/TR pro sledování MRN pomocí NGS

Princip stanovení klonality maligního vzorku a vhodný výběr cíle Ig/TR pro následné sledování minimální reziduální nemoci byly popsány výše (Kapitola 1.1.3).

3.1.1 Příprava vzorku

Izolace DNA

Princip metody izolace DNA pomocí QIAamp DNA Kit (QIAGEN) spočívá v následujících krocích: nejprve dochází k lýze buněk a uvolnění DNA, která se v dalším kroku váže na kolonu s křemičitým membránovým nosičem za přítomnosti vysoké koncentrace solí. DNA je dále několikrát promyta speciálními pufrů, a nakonec je čistá DNA eluována z křemičité membrány pomocí pufru s nízkou koncentrací solí.

Nejprve byl diagnostický vzorek periferní krve nebo kostní dřeně odebrán do protisrážlivé zkumavky a následně byla pomocí hustotního gradientu (Ficoll-Paque, Pharmacia) provedena izolace mononukleárních buněk. DNA byla následně izolována podle návodu QIAamp DNA Blood Mini/Micro Kitu v závislosti na množství buněk (QIAamp DNA Blood Mini Kit – určen pro více než dva miliony buněk). Z diagnostických vzorků ALK⁺ ALCL pacientů byla DNA izolována z 8–10 5 µm silných FFPE řezů nebo čerstvé zmrazené tkáně pomocí QIAamp FFPE Tissue Kit.

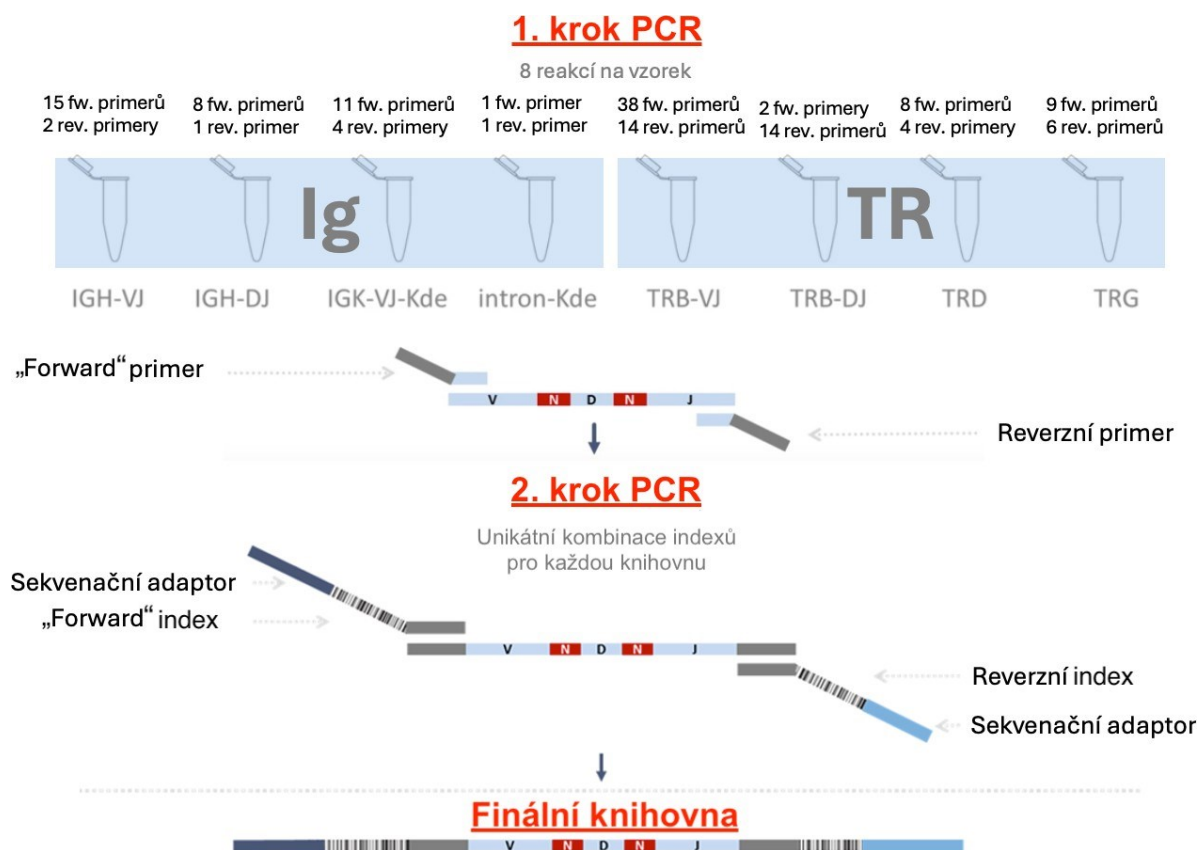
Vyšetření kontrolního genu pro albumin

Vyšetření kontrolního genu je důležité jak pro zjištění kvality a koncentrace DNA, tak pro následnou přesnou kvantifikaci. Normalizace vůči kontrolnímu genu snižuje variabilitu v kvalitě a kvantitě DNA, způsobenou rozdíly v množství biologického materiálu a použitými izolačními metodami. K tomuto účelu se využívá kontrolní gen pro albumin.

3.1.2 Příprava sekvenačních knihoven pomocí dvoukolové PCR

Přehled

Zkrácený postup dvoukolové přípravy sekvenačních knihoven za účelem analýzy klonality leukemického vzorku a následného výběru vhodného cíle pro sledování minimální reziduální nemoci je následující (Obrázek 4).



Obrázek 4: Schématické znázornění postupu přípravy dvoukolových sekvenačních knihoven.

Převzato (Bruggemann et al., 2019) a upraveno.

Nejprve pomocí prvního kroku PCR amplifikujeme specifické úseky DNA. K detekci přestaveb Ig/TR jako potenciálních cílů byly použity kombinace primerů EuroClonality-NGS: IGH-VJ; IGH-DJ; IGK-VJ-Kde; IGK-intron-Kde; TRB-VJ; TRB-DJ; TRG; TRD (Příloha 1). Jako kontrola kvality a následný kalibrátor se do každé reakce přidávají tzv. „spike-ins“. Jedná se o směs DNA vybraných buněčných linií, u kterých známe

přesné přestavby Ig/TR. Slouží tak ke kontrole amplifikace přestaveb u jednotlivých systémů a následně ke kvantifikaci specifických cílů ve vzorku. Tyto kalibrátory byly vyvinuty a validovány v rámci pracovní skupiny EuroClonality-NGS (Knecht et al., 2019).

Úspěšnost amplifikace pomocí PCR ověříme pomocí jedné z elektroforetických technik.

Bioanalyzátor je alternativou k tradiční metodě gelové elektroforézy. Jedná se

o kapilární elektroforézu, kdy jednotlivé separované molekuly prochází detekčním bodem, což zaznamenává fluorescenční detektor. Výsledkem je elektroferogram. Na základě tohoto výsledku buď pokračujeme dalším krokem PCR, přečišťujeme pomocí kuliček SPRIselect (Beckman Coulter) nebo produkty naředíme. Při purifikaci využíváme magnetické kuličky, které za přítomnosti polyethylen glykolu (PEG) s vysokou koncentrací solí reverzibilně vážou nukleové kyseliny na základě jejich velikosti a typu. Při rozdílných koncentracích PEG a solí lze preferenčně vybrat kratší nebo delší fragmenty DNA.

Ve druhém kroku PCR přidáváme sekvenační adaptory pro sekvenátory typu Illumina a tzv. indexy, které nám umožní sekvenaci více vzorků v jednom experimentu. Následně opět ověřujeme výsledné produkty pomocí jedné z elektroforetických technik. Posledním krokem je purifikace pomocí kuliček SPRIselect.

Standardní operační postup (SOP) pro detekci klonality byl vytvořen ve spolupráci s pracovní skupinou EuroClonality-NGS a je dostupný na oficiálních stránkách EuroClonality (www.euroclonality.org) (Bruggemann et al., 2019). Naším úkolem bylo adaptovat tento postup pro detekci MRN a optimalizovat ho k dosažení dostatečné senzitivity (minimálně 10^{-4}) a spolehlivé kvantifikovatelnosti výsledků.

Postup

Tabulka 1: Složení reakčního mixu prvního kroku PCR. *Výrobce Applied Biosystems.

	Zásobní koncentrace	IGH-VJ		IGH-DJ		IGK-VJ-Kde		intron-Kde	
		Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek
PCR pufr II*	10x	1x	2,5	1x	2,5	1x	2,5	1x	2,5
MgCl ₂ *	25 mM	2.5 mM	2,5	3 mM	3	1.5 mM	1,5	1.5 mM	1,5
dNTP-Mix*	10 mM	0.2 mM	0,5	0.4 mM	1	0.2 mM	0,5	0.2 mM	0,5
Primer MIX			1		1		1		1
Spike-ins			2		2		2		2
AmpliTaQ Gold*	5 U/μl	1U/rxn	0,2	1.5U/rxn	0,3	1U/rxn	0,2	1U/rxn	0,2
	Zásobní koncentrace	TRB-VJ		TRB-DJ		TRG		TRD	
		Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek
PCR pufr II*	10x	1x	2,5	1x	2,5	1x	2,5	1x	2,5
MgCl ₂ *	25 mM	4 mM	4	4 mM	4	4 mM	4	2 mM	2
dNTP-Mix*	10 mM	0.2 mM	0,5	0.2 mM	0,5	0.2 mM	0,5	0.2mM	0,5
Primer MIX			1		1		1		1
Spike-ins			2		2		2		2
AmpliTaQ Gold*	5 U/μl	1U/rxn	0,2	1U/rxn	0,2	1U/rxn	0,2	1 U/rxn	0,2

Nejdříve naředíme diagnostickou DNA na koncentraci 100 ng/μl. Následně připravíme do PCR stripu 8 reakčních mixů, pro každý jednotlivý systém (Tabulka 1). Do každé reakce dále přidáme 1 μl DNA. Doplníme vodou do finálního objemu 25 μl. Lehce zvortexujeme a stočíme. Na thermocycleru iCycler™ BIO-RAD, GeneAmp® PCR System 2700 a 2720 (Applied Biosystems) nebo SimplyAmp™ Thermal Cycler (Life Technologies) nastavíme následující program (Tabulka 2).

Tabulka 2: Termální program prvního kroku PCR. *Pro systém TRB-VJ je teplota hybridizace 65°C.

1 cyklus	počáteční denaturace	94°C	10 min
35 cyklů	denaturace	94°C	1 min
	hybridizace	63°C*	1 min
	elongace	72°C	30 sec
1 cyklus	finální extenze	72°C	10 min
		4°C	∞

Úspěšnost amplifikace pomocí PCR ověříme pomocí gelové elektroforézy. Používáme 1,5% agarózový gel (90 V, 45 minut). Protože u IGH-VJ a TRB-VJ PCR dochází často k tvorbě nespecifických produktů, u těchto mixů následuje přečištění pomocí kuliček SPRIselect podle doporučeného postupu. Produkt z prvního kola PCR smícháme s kuličkami v poměru 1:1, promýváme 85% ethanolem a eluujeme do 20 μl vody bez nukleáz (Life Technologies). Ostatní produkty z prvního kola PCR padesátkrát naředíme. Pokud je specifický pruh na gelu slabý, produkt neředíme. Poté připravíme reakční mixy pro druhou PCR (Tabulka 3), přidáváme 3 μl produktu z prvního kola PCR a celkový objem doplníme vodou bez nukleáz do 50 μl. Na thermocycleru nastavíme následující program (Tabulka 4).

Tabulka 3: Složení reakčního mixu druhého kroku PCR. *Výrobce Merc Life Science.

	Zásobní koncentrace	všechny systémy	
		Finální koncentrace	μl/vzorek
PCR pufr II s MgCl ₂ *	10x	1x	5
dNTP-Mix*	10 mM	0.2 mM	1
„Forward“ primer MIX			1
Reverzní primer MIX			1
Fast Start High Fidelity*	5 U/μl	2,5U/rxn	0,5

Tabulka 4: Termální program druhého kroku PCR.

1 cyklus	počáteční denaturace	95°C	2 min
	denaturace	94°C	30 sec
20 cyklů	hybridizace	63°C	30 sec
	elongace	72°C	30 sec
1 cyklus	finální extenze	72°C	5 min
		4°C	∞

Úspěšnost druhé amplifikace pomocí PCR ověříme pomocí gelové elektroforézy. Následuje přečištění pomocí kuliček SPRIselect podle doporučeného postupu. Produkt z druhého kola PCR smícháme s kuličkami v různém poměru dle jednotlivých systémů. Pro IGK-VJ-Kde, intron-Kde, TRG a TRD v poměru 1:1; pro IGH-VJ a TRB-VJ v poměru 1:0,7; pro IGH-DJ a TRB-DJ v poměru 1:0,9. Promýváme 85% etanolem a eluujeme do 20 µl vody bez nukleáz. Koncentraci vzorků změříme pomocí Qubit® dsDNA HS Assay Kit. Dle změřených koncentrací a délek produktu dle gelové elektroforézy (Tabulka 5) spočítáme molaritu vzorků a smícháme jednotlivé vzorky do finální knihovny tak, aby její finální koncentrace byla 4 nM.

Tabulka 5: Očekávaný rozsah velikosti konkrétní knihovny pro každý systém.

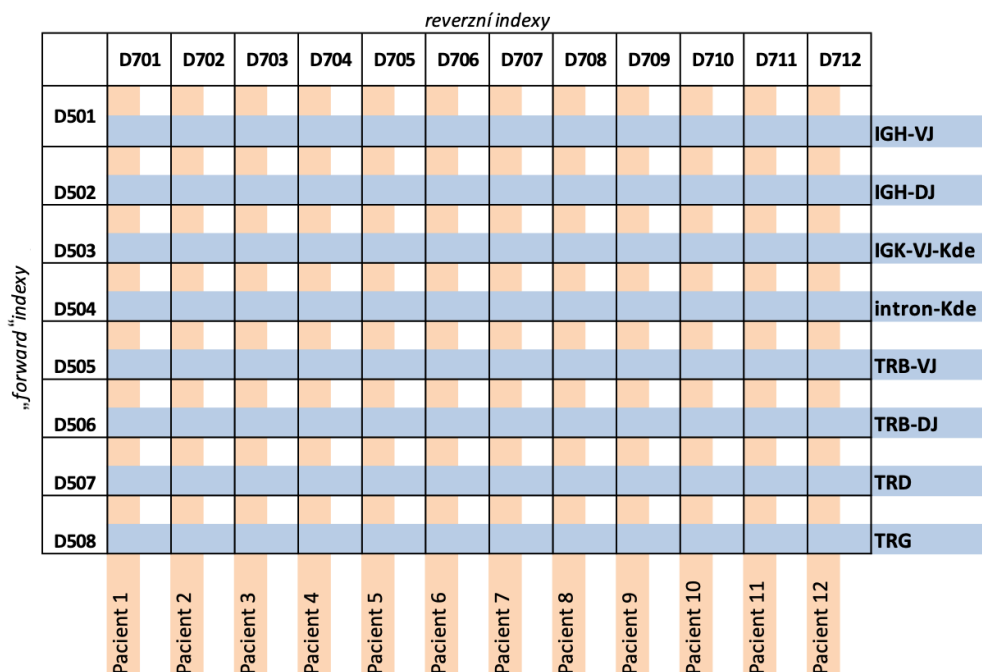
Systém	velikost (bp)
IGH-VJ	484-681
IGH-DJ	266-358
IGK-VJ-Kde	296-384
intron-Kde	309-382
TRB-VJ	309-407
TRB-DJ	300-408
TRG	256-360
TRD	309-450

3.1.3 Příprava sekvenačních knihoven pomocí jednokolové PCR

Postup jednokolové přípravy sekvenačních knihoven pro analýzu klonality leukemického vzorku a následného výběru vhodného cíle pro sledování MRN je podobný přípravě dvoukolových sekvenačních knihoven (Kapitola 3.1.2). Na rozdíl od dvoukolového postupu však primery pro amplifikaci přestavěných genů již na svém 5' konci obsahují specifické sekvenační adaptory a indexy, což zkracuje dobu přípravy knihovny a omezuje nebezpečí kontaminace vzorků. Finanční náklady pro pořízení sad všech primerů pro současné vyšetřování několika vzorků jsou ale vyšší než u dvoukolového přístupu. Pro odlišení jednotlivých systémů se využívají odlišné indexy ve „forward“ primeru (D/A 50X)

a k odlišení jednotlivých pacientů rozdílné indexy v reverzních primerech (D/A 70X) (Obrázek 5).

SOP byly opět vytvořeny ve spolupráci s pracovní skupinou EuroClonality-NGS a jsou dostupné na oficiálních stránkách EuroClonality (www.euroclonality.org) pro členské laboratoře konsorcia. Tato metoda byla v naší laboratoři úspěšně akreditována a využívá se ke screeningu přestaveb genů pro Ig/TR na úrovni DNA u pacientů s ALL a pro sledování MRN v konkrétních léčebných situacích.



Obrázek 5: Schématické znázornění jednotlivých indexů pro přípravu sekvenčních knihoven.

Převzato (Bruggemann et al., 2019) a upraveno.

3.1.4 Sekvenování nové generace – Illumina sekvenování

Mezi technologie sekvenování nové generace patří sekvenování na přístrojích Illumina. To umožňuje masivní paralelní čtení krátkých DNA fragmentů. Celý proces lze rozdělit na čtyři základní kroky: příprava vzorku, tvorba klastrů, sekvenace a analýza dat. Příprava vzorku se může lišit, ovšem společným bodem je vždy přidání sekvenčních adaptorů na konce DNA. Díky tomu se každý fragment DNA naváže na destičku („flow cell“) pokrytou oligonukleotidy. Poté izotermální amplifikací dochází k tvorbě klastrů. K amplifikaci dochází tzv. metodou „mostů“. Molekuly se „ohnou“ a vytváří tisíce kopií každého fragmentu na jednom místě – klastry. Sekvenování začíná navázáním krátkého primeru, po němž se postupně přidávají fluorescenčně značené nukleotidy, které syntetizují nové vlákno podle sekvence původního templátu. Při připojení každého nukleotidu je

emitován charakteristický fluorescenční signál, který umožňuje identifikaci příslušné báze. Tento postup je známý jako sekvenování syntézou. Počet cyklů určuje délku čtení. Posledním krokem je analýza dat, kdy se sekvence jednotlivých fragmentů sestaví a zpracují pomocí bioinformatických procesů.

V naší laboratoři se screening a měření MRN provádí nejčastěji pomocí přístroje Miseq. Společnost Illumina však nabízí i další pokročilé platformy, jako jsou NextSeq a NovaSeq, které umožňují vyšší kapacitu sekvenace. Pro dosažení optimálního nanesení na destičku („flow cell“) musíme zvážit, jaké vzorky sekvenujeme. V našich podmínkách při sekvenaci diagnostických vzorků za účelem analýzy klonality Ig/TR používáme chemii o délce čtení 2x250 bp a cílíme na finální koncentraci knihovny 10 pM s 15% PhiX. PhiX je kontrolní knihovna, která se využívá ke kontrole kvality sekvenace a vyvážení složení bází ve vzorcích. Přidáním PhiX lze monitorovat přesnost sekvenačního procesu a validovat správné nastavení přístroje. Sekvenujeme s nízkým pokrytím, s cílem dosáhnout 100 tisíc „reads“ na systém.

Bioinformatická analýza – výběr cílů pro sledování MRN

Analýza sekvenačních dat probíhá za pomoci použití platformy ARResT („Antigen Receptors Research Tool“) Interrogate (<http://arrest.tools/interrogate-latest>) (Bystry et al., 2017). Sekvence vzorků jsou anotovány k segmentům V(D)J, jako reference slouží zárodečné sekvence z databáze IMGT (<https://www.imgt.org>).

Jako cíle pro sledování vybíráme všechny klonální přestavby se zastoupením alespoň 10 % po normalizaci pomocí „spike-ins“.

3.2 Analýza klonality a výběr cílů Ig/TR pro sledování MRN pomocí dalších metod

Před vzestupem NGS technologií se analýza klonality přestaveb Ig/TR prováděla pomocí analýzy heteroduplexů nebo GeneScan. Při analýze heteroduplexů se musí nejprve produkty PCR denaturovat 5 minut při 95°C a následně rychle renaturovat 1 hodinu při 4°C (Van Dongen et al., 2003). Vzorky analyzujeme v 6–8% polyakrylamidovém gelu nebo na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Z monoklonálních produktů se tvoří homoduplexy, které migrují stejnou rychlostí a tvoří jeden proužek. Z polyklonálních produktů se tvoří neohraničený, rozptýlený pruh. Homoduplexy vyříznuté z gelu znovu amplifikujeme se stejným primer-mixem, tyto získané produkty poté purifikujeme

a sekvenujeme na ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Jedná se o sekvenátor založený na principu Sangerova sekvenování, který využívá kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých fluorescenčně značených DNA fragmentů, což umožňuje sekvenování s vysokou přesností.

V některých laboratořích se pro analýzu klonality využívá ještě metoda GeneScan. Ta umožňuje rozlišit mezi klonálními a polyklonálními populacemi za použití kapilární elektroforézy. Nejprve amplifikujeme specifické genové segmenty, které následně separujeme podle jejich délky. Jedná se o laboratorně poměrně jednoduchou metodu, jejíž nevýhodou zůstává neschopnost odlišit stejně dlouhé fragmenty, které však mohou být sekvenčně odlišné (např. biklonální) (Van Dongen et al., 2003).

3.3 Detekce MRN pomocí qPCR

Pokud u diagnostického vzorku detekujeme specifickou přestavbu Ig/TR, navrhne pacient-specifický primer na tento přestavěný úsek a pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce monitorujeme MRN v následných vzorcích. Tento systém qPCR využívá pacient-specifický primer, pro každý segment společný reverzní primer a fluorescenčně značené hydrolyzační sondy (Biotech; Eurofins Genomics). Ty byly navrženy pracovní skupinou EuroMRD (Van der Velden et al., 2002, 2004). Tento typ sondy, obvykle označovaný jako TaqMan, obsahuje fluorescenční barvivo (např. FAM) a zhášec (např. TAMRA), které jsou navázány na opačných koncích sondy. V neporušeném stavu sonda nevydává fluorescenční signál, protože zhášec potlačuje fluorescenci barviva. Během PCR, když polymeráza syntetizuje nové DNA vlákno, její enzymatická aktivita štěpí sondu. To způsobí oddálení zhášec od fluorescenčního barviva a vede k uvolnění fluorescenčního signálu, který je detekován. Emitovaná fluorescence je měřena v průběhu hybridizace. Pokud nelze použít tento typ sondy, využívá se SYBR green (Quantitect® SYBR Green PCR Mix 2x, Qiagen). Ten se váže do dvouřetězové DNA, přičemž s dalšími cykly PCR exponenciálně roste množství produktu a s tím i signál. Intenzita signálu je v obou případech přímo úměrná množství amplifikovaného templátu, což umožňuje kvantitativní měření specifické sekvence Ig/TR.

Návrh pacient-specifických primerů

Získané sekvence (Kapitola 3.1) vyhodnocujeme v programu Vector™ NTI Advance 11.5.1., kde navrhne klonálně-specifické primery. Tyto primery se snažíme navrhnout

tak, aby jejich teplota tání (T_m), spočítaná tímto programem, byla kolem 54°C , což odpovídá T_m reverzních primerů a zároveň je o cca 10°C nižší než T_m sond. Navrhujeme primery o délce 17–29 nukleotidů. Kromě T_m dále kontrolujeme tvorbu dimerů nebo vlásenek. Začátek primeru by měl ideálně zasahovat do zárodečného segmentu a končit v N-úseku ideálně tak, aby alespoň 4–5 nukleotidů zasahovalo do specifického N-segmentu přestavby v oblasti 3'. Při návrhu primeru zasahujícího do J segmentu nebo pokud N-úsek chybí, neměl by primer přesahovat více než 5–6 bází do daného J segmentu. Vždy však hodnotíme každého pacienta individuálně, a pokud nelze navrhnout „optimální“ primer podle pravidel, lze vyzkoušet i primery, která tato popsaná kritéria nesplňují. Ideální situací je pak sledování MRN pomocí dvou nezávislých cílů.

Optimalizace systému qPCR

Po navrhnutí pacient-specifických primerů je klíčové dosažení co největší senzitivity a specifity systému. Toho lze dosáhnout optimalizací teploty hybridizace, změnou koncentrace primeru nebo samotného složení reakčního mixu. Podle pravidel léčebného protokolu AEIOP-BFM je nezbytné mít alespoň jeden systém s minimální citlivostí a rozmezím kvantifikace 10^{-4} . Proto se vždy zkouší optimalizovat alespoň dva primery pro každý systém. Dalším problémem je nespecifické nasedání primerů na fyziologické lymfocyty. K tomu dochází často v případě, kdy přestavěný segment obsahuje krátké, málo specifické N-úseky, nebo máme nevhodně navrhnoutý primer. Jako negativní kontrola se využívá polyklonální směs DNA, získaná od nejméně pěti zdravých dárců („buffy coat“ – BC).

Postup a interpretace výsledků

Postup přípravy vzorku probíhá stejně jak již bylo popsáno výše (Kapitola 3.1.1). Následně připravíme ředící řadu (10^{-1} - 10^{-5}) z DNA diagnostického vzorku (případně relapsového vzorku) pacienta, přičemž ředíme právě do BC ($10^{-1} = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Pokud je v diagnostickém vzorku méně blastů než polovina, upravujeme ředící řadu na blasty ($10^{-1} = 10\%$ blastů). Používáme TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) a přístroj TaqMan 7500 Fast Real-Time PCR System®. Výsledky vyhodnocujeme v aplikaci QuantStudio™.

Pravidla pro interpretaci výsledků a samotná metodická doporučení stanovuje pracovní skupina EuroMRD. K jejich pochopení je klíčové definovat Ct („treshlod“ cyklus): cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročí hodnotu pozadí. Kritéria pro stanovení senzitivity systému qPCR jsou následující: nejnižší ředění, které se amplifikuje specificky,

nejméně jeden replikát je pozitivní, nejnižší dosažená hodnota Ct je alespoň o jeden cyklus nižší než nejnižší hodnota pozadí, což potvrzuje specifitu reakce, a nejnižší Ct má < 20 cyklů od Ct neřaděného vzorku nebo od interceptu standardní křivky, což potvrzuje, že i zředěný vzorek je stále detekovatelný a specifický. Kritéria pro kvantifikovatelnost qPCR („quantitative range“, QR) jsou následující: amplifikace musí být specifická, rozdíl hodnot Ct mezi replikáty je $\leq 1,5$ cyklu, všechny hodnoty Ct musí být $\geq 3,0$ než nejnižší hodnota pozadí a průměrná hodnota Ct musí spadat do stanoveného rozmezí od průměrné hodnoty Ct předchozího ředění. Podle pravidel EuroMRD je dále důležitá hodnota sklonu křivky, která by měla být mezi 3,1-3,9.

Po optimalizaci podmínek pro pacient-specifickou esej qPCR můžeme začít sledovat hladinu MRN v následných vzorcích. Negativní kontrolu (BC) použijeme v hexaplikátu, jednotlivé reziduální vzorky v triplikátech. Vynesem hodnoty Ct neznámého vzorku na kalibrační křivku, vypočítáme množství sledované sekvence ve vzorku. Reziduální vzorek je pozitivní, splňuje-li tato pravidla: hodnota Ct alespoň jednoho z replikátů je v rozmezí čtyř cyklů od senzitivity optimalizovaného systému. Další pravidla se liší na základě konkrétního časového bodu pacienta a podle jeho léčebné terapie. V situacích, kde by falešně negativní výsledek mohl vést ke snížení léčby, je vzorek považován za pozitivní, pokud hodnota Ct alespoň jednoho z replikátů je o jeden cyklus nižší než nejnižší hodnota Ct pozadí. V situacích, kdy by falešně pozitivní výsledek mohl vést k intenzifikaci léčby, např. po transplantaci kostní dřeně, je vzorek považován za pozitivní, pokud hodnota Ct alespoň jednoho z replikátů je nižší o tři cykly než nejnižší hodnota Ct pozadí (Van der Velden et al., 2003, 2004, 2007).

3.4 Detekce MRN pomocí NGS

Pokud detekujeme specifickou přestavbu Ig/TR u diagnostického vzorku, můžeme sledovat MRN pomocí této přestavby za použití sekvenování nové generace.

Postup přípravy vzorku a přípravy sekvenačních knihoven probíhá obdobně jak již bylo popsáno výše (Kapitola 3.1). Využívá se jednokolová příprava sekvenačních knihoven. K dosažení co největší senzitivity jsou pro každou PCR použity 2 μg DNA, přičemž maximální objem může být 20 μl . Reakční mixy jsou připravovány podle Tabulky 6 a reakce je doplněna vodou bez nukleáz do finálního objemu 100 μl . Program thermocycleru je nastaven podle Tabulky 2. Úspěšnost amplifikace PCR je ověřena pomocí gelové elektroforézy. Produkty jsou přečištěny pomocí kuliček SPRIselect podle doporučeného

postupu. Produkt PCR je smíchán s kuličkami v různém poměru dle jednotlivých systémů. Pro IGK-VJ-Kde, intron-Kde, TRG a TRD v poměru 1:1; pro IGH-VJ a TRB-VJ v poměru 1:0,7; pro IGH-DJ a TRB-DJ v poměru 1:0,9. Ke kvantifikaci přečištěných produktů používáme Qubit® dsDNA HS Assay Kit. Dle změřených koncentrací a délek produktu dle gelové elektroforézy (Tabulka 5) spočítáme molaritu vzorků a smícháme jednotlivé vzorky do finální knihovny tak, aby její finální koncentrace byla 4 nM. Sekvenujeme s vysokým pokrytím (kolem 2 milionů „reads“ na systém) na přístroji od firmy Illumina, jak již bylo popsáno výše (Kapitola 3.1.4).

Tabulka 6: Příprava reakčního mixu. *Výrobce Merc Life Science.

	Zásobní koncentrace	IGH-VJ		IGH-DJ		IGK-VJ-Kde		intron-Kde	
		Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek
PCR pufr II*	10x	1x	10	1x	10	1x	10	1x	10
MgCl ₂ *	25 mM	1.5 mM	6	3 mM	12	1.5 mM	6	1.5 mM	6
dNTP-Mix*	10 mM	0.2 mM	2	0.2 mM	2	0.2 mM	2	0.2 mM	2
"Forward" Primer MIX			4		4		4		4
Reverzní Primer MIX			4		4		4		4
Spike-ins			2		2		2		2
Fast Start High Fidelity*	5 U/μl	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5
	Zásobní koncentrace	TRB-VJ		TRB-DJ		TRG		TRD	
		Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek	Finální koncentrace	μl/vzorek
PCR pufr II*	10x	1x	10	1x	10	1x	10	1x	10
MgCl ₂ *	25 mM	4 mM	16	4 mM	16	4 mM	16	2 mM	8
dNTP-Mix*	10 mM	0.2 mM	2	0.2 mM	2	0.2 mM	2	0.2mM	2
"Forward" Primer MIX			4		4		4		4
Reverzní Primer MIX			4		4		4		4
Spike-ins			2		2		2		2
Fast Start High Fidelity*	5 U/μl	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5	2.5U/rxn	0,5

Bioinformatická analýza – hodnocení MRN

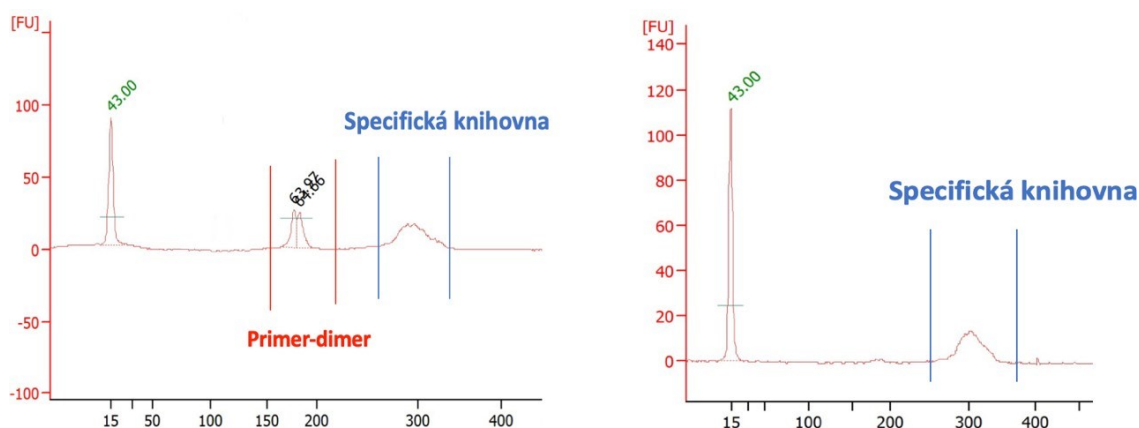
Na základě výsledků analýzy klonality diagnostického vzorku jsou vybrány vhodné „stopovací“ sekvence (tzv. „tracers“), které jsou následně vyhledávány ve vyšetřovaném, následném vzorku. V aplikaci ARResT/Interrogate je možno přímo provést rekalkulaci výsledku pomocí výše zmíněných kalibrátorů („spike-ins“).

4 Výsledky

4.1 Optimalizace a příprava SOP pro detekci cílů Ig/TR pro sledování MRN

Nejprve byl vyvíjen a optimalizován SOP (Příloha 1) pro detekci přestaveb Ig/TR jako cílů k monitorování minimální reziduální nemoci prostřednictvím NGS. K dosažení finálního protokolu, který je detailně popsán v Kapitole 3.4, bylo nutné optimalizovat všechny systémy pro detekci jednotlivých typů přestaveb Ig/TR s cílem dosáhnout maximální specifity a senzitivity výsledků.

Tento proces zahrnoval optimalizaci složení reakčního mixu, úpravu koncentrací jednotlivých složek, optimalizaci termálního programu, následné ředění a/nebo purifikaci produktů PCR. Jako příklad jednoho konkrétního optimalizačního kroku je zde uvedena purifikace produktu PCR pomocí kuliček SPRIselect (Obrázek 6). Obrázek ukazuje efektivní odstranění nespecifických produktů, včetně tzv. primer-dimerů, a dosažení čisté, specifické knihovny.



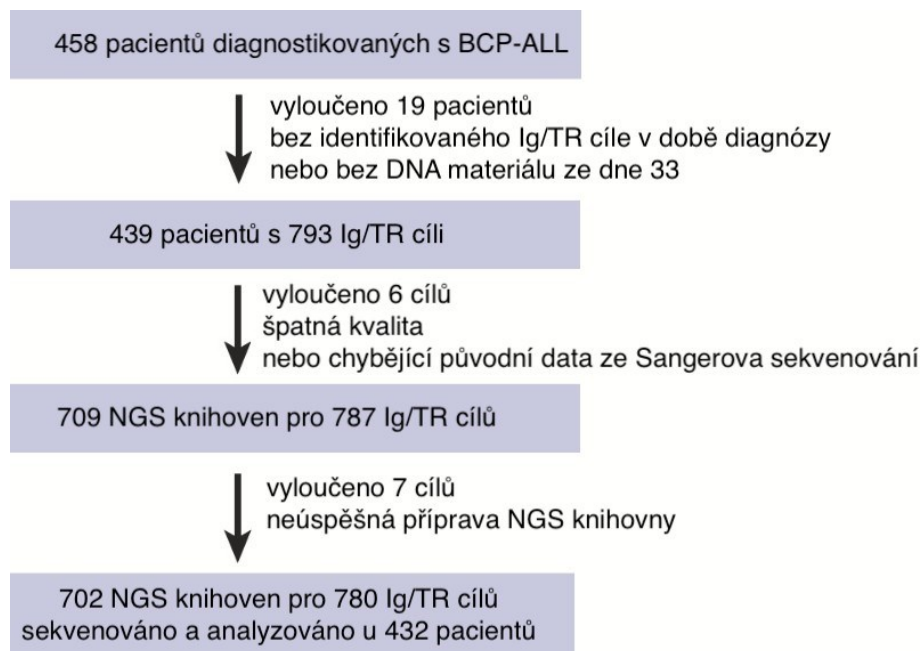
Obrázek 6: Ukázka purifikace produktu PCR pomocí kuliček SPRIselect. První graf znázorňuje produkt PCR před purifikací, zatímco na druhém obrázku je znázorněn produkt PCR po úspěšné purifikaci, kde došlo k odstranění nespecifických produktů a zvýšení čistoty výsledné knihovny.

SOP byly vytvořeny ve spolupráci s pracovní skupinou EuroClonality-NGS a jsou dostupné zatím pouze pro členy konsorcií EuroClonality-NGS a EuroMRD. Postup detekce MRN pomocí jednobolové PCR a NGS dosud nebyl publikován, protože v současnosti probíhá jeho validace pomocí několika kol mezilaboratorního srovnání se zapojením 15 laboratoří pod vedením naší skupiny. V naší laboratoři se tato metoda již využívá ke stanovení MRN například u pacientů po transplantaci kostní dřeně.

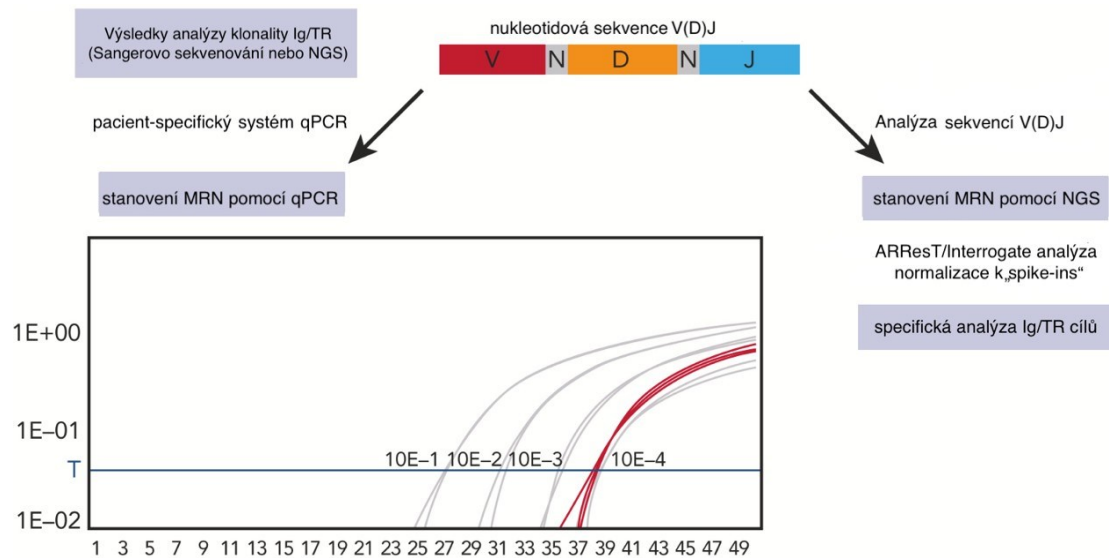
4.2 Kvantifikace MRN pomocí NGS u pacientů s ALL

V rámci první studie (Příloha 2), která tvoří podklad této dizertační práce, byla nově vyvinutá metoda validována na souboru dětských pacientů s BCP-ALL. Přestože se v dnešní době již NGS běžně využívá pro screeningovou analýzu klonality, standardem v současných léčebných protokolech pro stanovení MRN u BCP-ALL zůstávají průtoková cytometrie a detekce přestaveb Ig/TR pomocí qPCR. Cílem tedy bylo porovnat hladinu MRN stanovenou pomocí rutinní, pacient-specifické qPCR s výsledky dosaženými nově vyvinutou metodou.

Do studie bylo zařazeno 458 dětských pacientů s BCP-ALL léčených podle protokolu AIEOP-BFM ALL 2009 v letech 2010–2018 na Klinice dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. Ze studie bylo vyloučeno 19 pacientů, jelikož u nich nebyl identifikován vhodný cíl Ig/TR v době diagnózy nebo nebyla dostupná reziduální DNA ze dne 33. Dále bylo vyloučeno dalších 7 pacientů, kteří neměli k dispozici původní data ze Sangerova sekvenování, nebo u nichž selhala příprava knihovny NGS. Celkem bylo úspěšně připraveno 702 sekvenačních knihoven z 709 (99% úspěšnost) pro 432 pacientů (Obrázek 7).



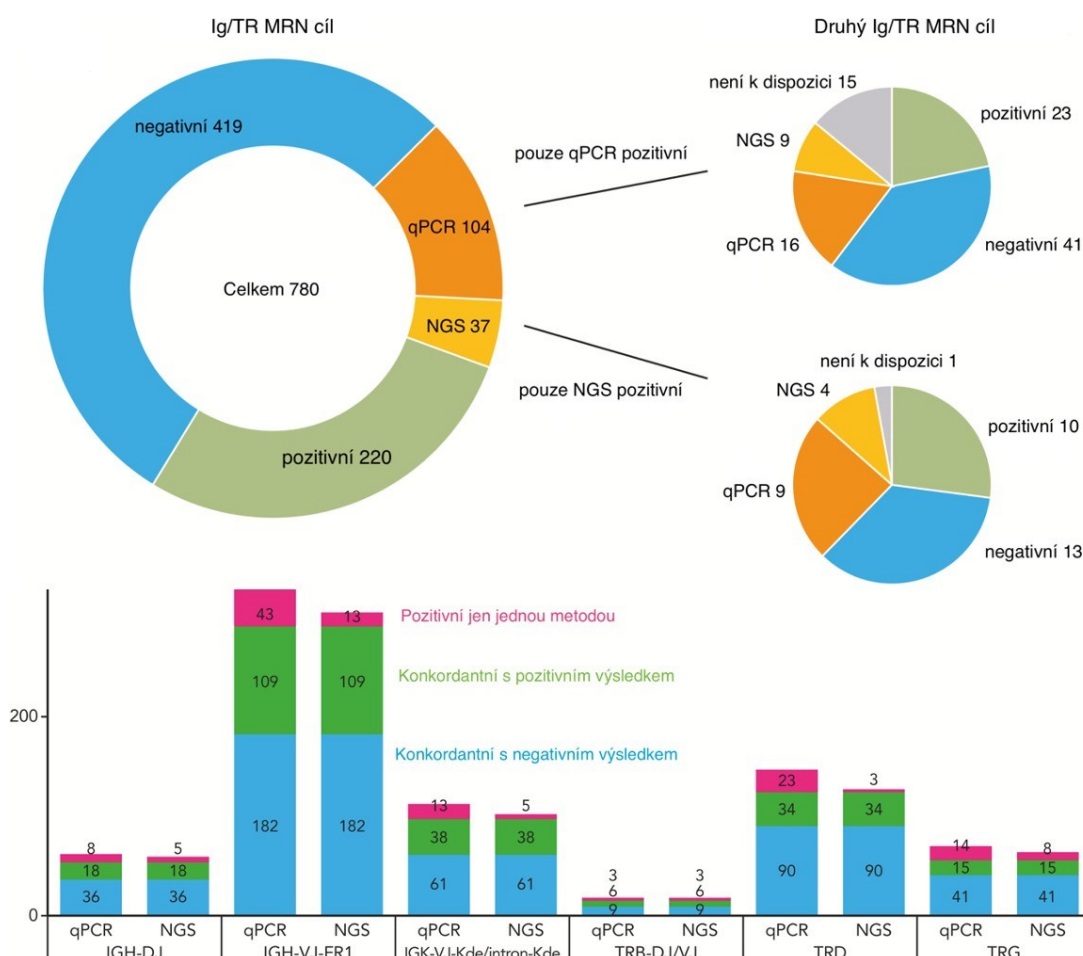
Obrázek 7: Schématický přehled počtu zařazených pacientů a analyzovaných vzorků v rámci studie. Imunoglobulin (Ig), T-buněčný receptor (TR), B-prekurzorová akutní lymfoblastická leukémie (BCP-ALL), sekvenování nové generace (NGS) (Svaton, Skotnicova et al., 2023).



Obrázek 8: Schématické znázornění procesu výběru cíle pro stanovení minimální reziduální nemoci (MRN) a detekce MRN pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a sekvenování nové generace (NGS). Imunoglobulin (Ig), T-buněčný receptor (TR) (Svaton, Skotnicova et al., 2023).

Detekce cílů Ig/TR pro stanovení MRN pomocí qPCR probíhala podle předem definovaných pravidel pracovní skupiny EuroMRD (Kapitola 3.3). Pro detekci MRN byly ideálně použity dva nezávislé pacient-specifické systémy qPCR. Pokud byla MRN zhodnocena jako pozitivní pod QR, byla zařazena do kategorie pozitivní, nekvantifikovatelné (PnQ). Pro detekci MRN byla použita DNA izolovaná z kostní dřeně odebraná v den 33. Dvoukolové knihovny NGS byly připraveny podle protokolů pracovní skupiny EuroClonality-NGS (viz výše). K dosažení senzitivity 10^{-5} byl na jednu reakci použit ekvivalent 150 tisíc jaderných buněk. U vzorků, kde nebyla dostatečná koncentrace DNA, byl použit maximální objem 15 μ l. Hladiny MRN stanovené pomocí NGS byly normalizovány za použití „spike-ins“. Díky dvěma sadám indexů mohlo být sekvenováno až 384 vzorků v jednom sekvenačním běhu. Většina připravených knihoven byla sekvenována na přístroji NovaSeq 600 (sekvenační chemie 2x250bp SP), některé knihovny byly sekvenovány na přístroji MiSeq (sekvenační chemie 2x250 v2). Sekvenační data byla analyzována pomocí vlastních bioinformatických nástrojů a ARResT/Interrogate. Nukleotidové sekvence V(D)J z diagnostických vzorků byly získány z původních dat pomocí Sangerova sekvenování a použity k identifikaci pacient-specifických cílů Ig/TR pro stanovení MRN v knihovně NGS (Obrázek 8). Celkem bylo oběma metodami analyzováno 780 unikátních cílů Ig/TR a sekvenováno 702 knihoven NGS s mediánem pokrytí

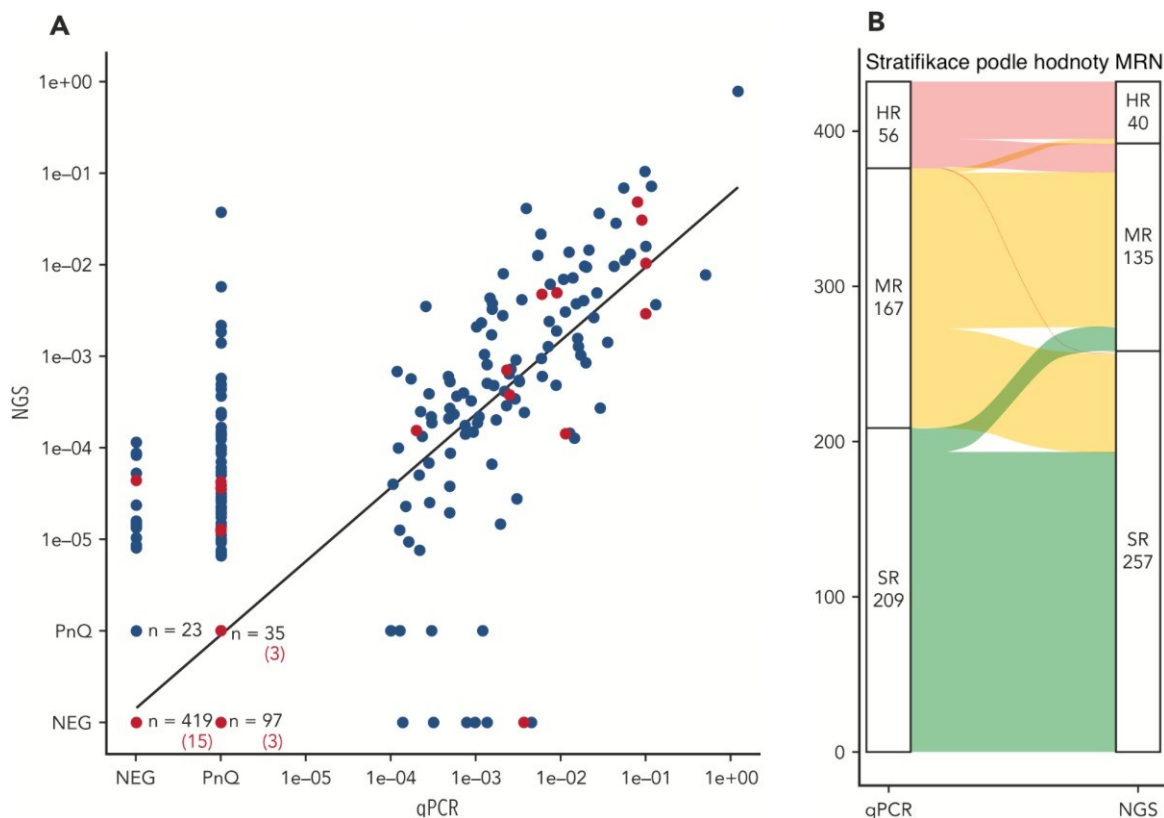
1 629 389 „reads“. Vzorky, ve kterých byly nalezeny alespoň 3 „reads“ se specifickou hledanou sekvencí, byly označeny jako NGS pozitivní.



Obrázek 9: Výsledky analýzy detekce minimální reziduální nemoci (MRN) založené na identifikaci přestavbě genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TR) stanovené metodami sekvenování nové generace (NGS) a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Oranžově jsou znázorněny cíle pozitivní pouze pomocí qPCR, žlutě cíle pozitivní pouze na základě dat NGS. Tato data jsou dále rozdělena a ukazují výsledek na základě analýzy druhého cíle Ig/TR. Spodní graf ukazuje rozdělení detekovaných cílů MRN na základě dat z NGS a qPCR podle jednotlivých systémů. Systémy IGK-VJ-Kde a intron-Kde byly vzhledem k nízkému počtu vzorků sloučeny, stejně tak TRB-VJ a TRB-DJ (Svaton, Skotnicova et al., 2023).

Výsledky byly shodně negativní oběma metodami u 419 cílů Ig/TR (53,7 %), zatímco 220 cílů (28,2 %) bylo konkordantně pozitivních. Dalších 104 cílů (13,3 %) bylo pozitivních pouze na základě metody qPCR, a z nich naprostá většina (97 cílů – 93,3 %) spadala do kategorie PnQ MRN. U 55 cílů (52,9 %) byla při vyhodnocení metody qPCR pozorována nespecifická amplifikace kontrolních polyklonálních DNA vzorků. Z těchto 104 cílů jich 23 (22,1 %) bylo detekováno také metodou NGS, kterou byly označeny jako nespecifické

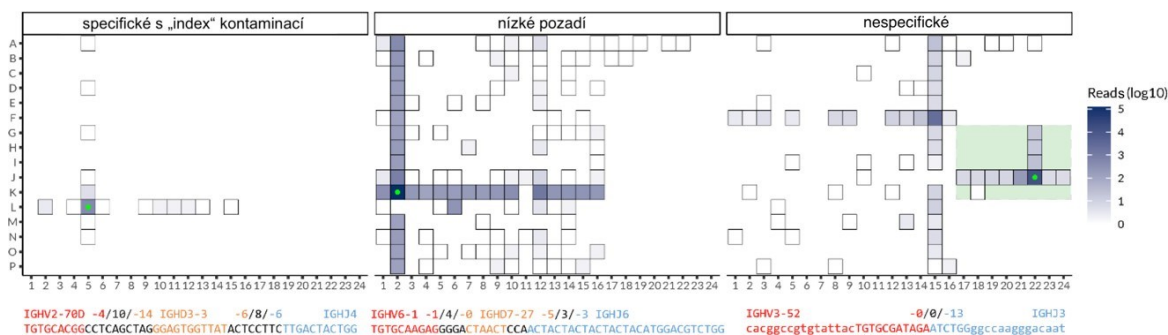
(viz dále). Dále bylo 37 cílů pozitivních pouze podle hodnot NGS, přičemž 23 (62 %) z nich bylo klasifikováno jako PnQ (Obrázek 9). Průměrná hodnota MRN stanovená pomocí NGS u zbývajících 14 cílů byla $3,6 \times 10^{-5}$. Získané hodnoty MRN pomocí qPCR a NGS signifikantně korelují ($R = 0,83$). Detekce MRN pomocí NGS dosahuje vyššího QR než tradičně používaná metoda qPCR (Obrázek 10A).



Obrázek 10: Kvantitativní porovnání detekovaných hladin minimální reziduální nemoci (MRN) a stratifikace pacientů. (A) Porovnání hladin MRN stanovených pomocí detekce přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TR) s užitím kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) (osa x) a sekvenování nové generace (NGS) (osa y). Červeně jsou označeni pacienti, u nichž došlo k relapsu. (B) Stratifikace pacientů na základě hodnoty MRN ze dne 33 pomocí qPCR a NGS. Pro zařazení do skupiny s vysokým rizikem (HR) byla jako prahová hodnota stanovena hladina MRN 10^{-3} . Na základě NGS výsledků se 16 pacientů přeřadilo ze skupiny se standardním rizikem (SR) do skupiny se středním rizikem (MR), 3 pacienti ze skupiny MR do skupiny HR a naopak 64 pacientů ze skupiny MR do skupiny SR a ze skupiny HR do skupiny MR 18 pacientů. Negativní (NEG), pozitivní, nekvantifikovatelná hodnota MRN (PnQ) (Svaton, Skotnicova et al., 2023).

Stratifikace pacientů byla provedena výhradně na základě hodnoty MRN ze dne 33. Pro účely této studie vedla hodnota MRN 10^{-3} k zařazení do skupiny HR, jakákoli pozitivita nižší než 10^{-3} do skupiny MR a negativní výsledek do skupiny SR. Stratifikace byla shodná oběma metodami u 76 % pacientů, přičemž 193 pacientů (44,7 %) bylo zařazeno do skupiny

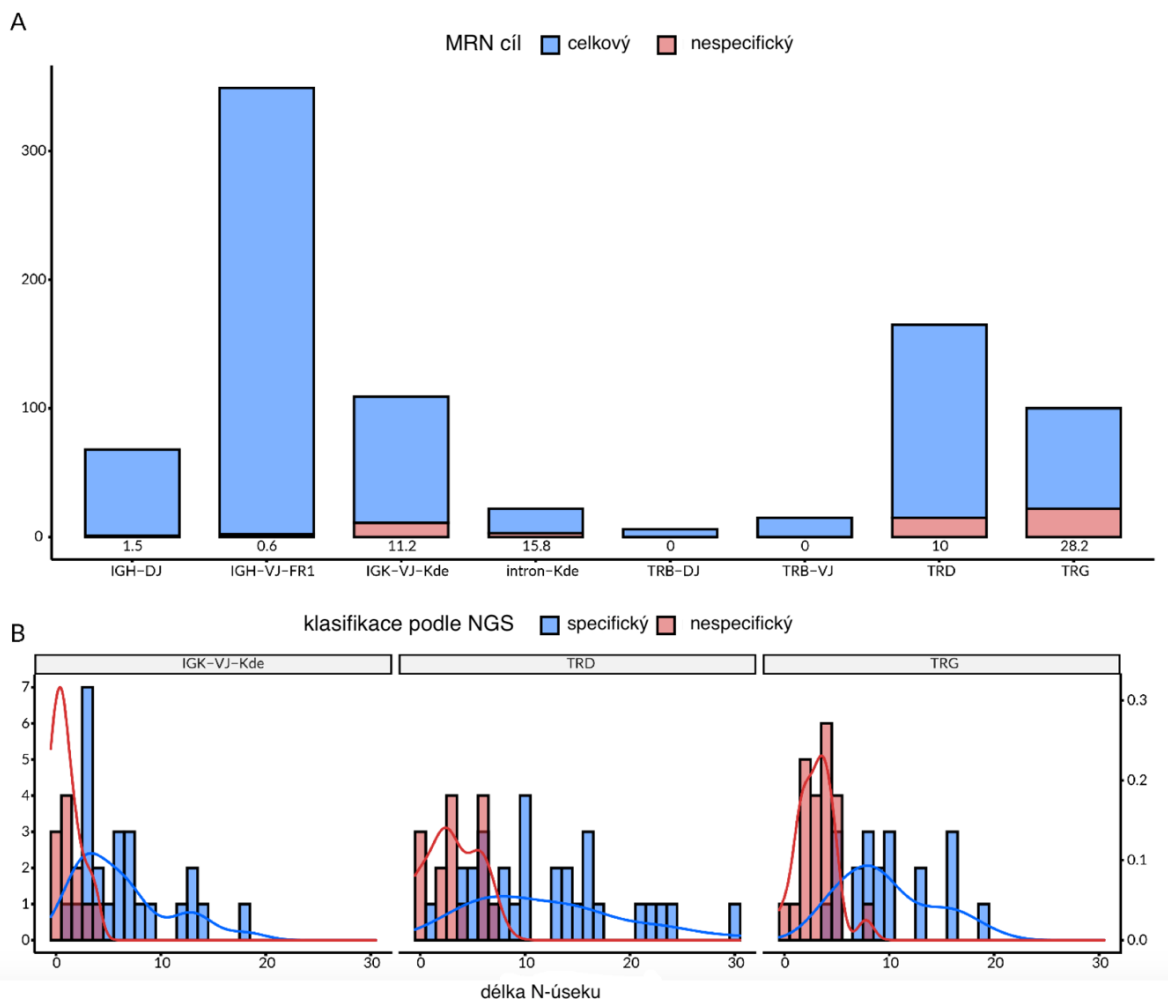
SR, 100 pacientů (23,1 %) do skupiny MR a 37 pacientů (8,6 %) do skupiny HR. Celkem 19 pacientů (4,4 %) bylo na základě NGS přístupu přeřazeno do skupiny s větším rizikem, do skupiny s nižším rizikem bylo přesunuto 82 pacientů (19 %), a to zejména díky eliminaci falešně pozitivních výsledků (Obrázek 10B).



Obrázek 11: Ukázka reprezentativního cíle pro detekci minimální reziduální nemoci (MRN) pro každou kategorii na základě analýzy specifity pomocí sekvenování nové generace (NGS). Specifita byla hodnocena podle počtu „reads“ se specifickou sekvencí V(D)J identifikovanou i v nespecifické knihovně NGS a je zobrazena jako teplotní mapa na logaritmické stupnici. Osy x a y odpovídají použitým „forward“ a reverzním indexům při přípravě sekvenačních knihoven. Analyzovaný cíl pro stanovení MRN a jeho sekvence, která byla analyzována napříč všemi knihovnami NGS, je zobrazena pod grafy. Pacient-specifický vzorek pro každý cíl je označen zelenou tečkou. Identické sekvence nalezené ve velmi nízkých hladinách v knihovnách NGS sdílejících index (nalevo) i náhodně v ostatních vzorcích (uprostřed) jsou označeny jako specifické. Nespecifický cíl (napravo) je detekován ve vysokých hladinách (v rámci rozdílu o jeden logaritmický řád) v nesouvisejících knihovnách NGS ze dvou nezávislých sekvenačních běhů. Vzorky, které byly připraveny spolu s pacient-specifickým vzorkem, jsou zobrazeny se zeleným pozadím (Svaton, Skotnicova et al., 2023).

U jednoho pacienta byl detekován pouze jeden TRG cíl pro sledování MRN, který byl metodou qPCR vysoce pozitivní, zatímco v datech NGS nebyl detekován. Tento pacient byl proto přeřazen ze skupiny HR (qPCR data) do skupiny SR (NGS data). Následně byl u tohoto pacienta zopakován screening přestavby TRG v diagnostickém vzorku metodou NGS, což vedlo k detekci majoritní klonální přestavby TRG, která nebyla detekována původní metodou Sangerova sekvenování. Tento cíl byl následně pomocí NGS identifikován i ve vzorku ze dne 33, a na základě těchto výsledků by i tento následný vzorek byl zařazen do skupiny HR (Obrázek 10B). U dalších sedmi pacientů, kteří neměli detekován cíl Ig/TR pro detekci MRN metodou Sangerova sekvenování, byl taktéž zopakován screening diagnostického vzorku pomocí NGS. Na základě těchto dat byly identifikovány nejméně dva nezávislé cíle u šesti pacientů. Tato data zdůrazňují důležitost použití NGS metody, jak pro

analýzu klonalitu v diagnostickém vzorku, tak pro následnou identifikaci MRN v dalších následných vzorcích.



Obrázek 12: Analýza specifity sekvenování nové generace (NGS) pro detekci cíle ke stanovení minimální reziduální nemoci (MRN). (A) Procento cílů ke stanovení MRN klasifikovaných jako nespecifické je zobrazeno červenou barvou pod každým sloupcem jednotlivého systému. (B) Porovnání délek N-úseků mezi jednotlivými cíli klasifikovanými jako nespecifické (červeně) a specifické (modře) (Svaton, Skotnicova et al., 2023).

Díky NGS lze přímo sledovat a hodnotit kompletní nukleotidové sekvence V(D)J včetně zárodečných genových segmentů, a vyhnout se tak mnoha falešně pozitivním výsledkům, které se objevují v pacient-specifických esejích qPCR. Při analýze Ig/TR pomocí NGS bylo identifikováno 54 cílů, které nesplňovaly kritéria dostatečné specifity. Pro potvrzení specifity byly sledované cíle Ig/TR analyzovány ve všech připravených knihovnách NGS. Cíle Ig/TR, které nebyly nalezeny v žádné jiné knihovně NGS, byly klasifikovány jako specifické. Cíle Ig/TR, u nichž byla identifikována v malém pokrytí shodná sekvence v knihovně NGS sdílející jeden z indexů, byly také klasifikovány jako

specifické s „index“ kontaminací („missindexed“). Jedná se o technické chyby způsobené kontaminací při smíchání velkého počtu NGS knihoven a následném sekvenování v jednom běhu. Cíle Ig/TR s nízkým pozadím byly hodnoceny podle kritérií EuroMRD. Cíle Ig/TR detekované v různých knihovnách NGS napříč odlišnými indexy, v rámci rozdílu o jeden logaritmický řád oproti specifické knihovně pacienta, byly klasifikovány jako nespecifické (Obrázek 11). Jelikož skutečná pozitivita u takovýchto vzorků nelze určit, byly na základě stejného zdůvodnění, jaké se používá při interpretaci výsledků qPCR s nespecifickou amplifikací polyklonálního pozadí, považovány za negativní.

Po podrobnější analýze těchto sekvencí V(D)J, z nichž většina patřila do systémů IGK, TRD nebo TRG, bylo zjištěno, že N-úseky těchto sekvencí jsou podstatně kratší (Obrázek 12). Dva z těch 54 cílů byly v QR a 20 cílů bylo klasifikováno jako PnQ pomocí qPCR. Nespecifická amplifikace polyklonálního pozadí byla detekována u 16 z těchto cílů, což podle kritérií EuroMRD vedlo k negativnímu výsledku qPCR. Přestože vysoce pozitivní hodnoty MRN detekované na základě těchto nespecifických cílů bezpečně ukazují na pozitivitu, v laboratorní diagnostické praxi je vhodné se jim vyhýbat. Správný výběr cíle Ig/TR je pro přesnou detekci MRN klíčový. Tato studie ukazuje, že stanovení MRN pomocí NGS detekce cílů Ig/TR je specifitější než stanovení pomocí qPCR. Navzdory dostupným NGS technikám však zůstává komplexnost celého procesu složitá. Velké soubory s detekovanými cíli Ig/TR a jejich daty z NGS mohou být použity k predikci specifity jednotlivých cílů Ig/TR detekovaných v době diagnózy, což by mohlo zlepšit výběr cílů pro MRN s vysokým QR a senzitivitou eseje qPCR.

4.3 Ověření positivity u nízké pozitivních vzorků pomocí qPCR

Jak již bylo zmíněno, zlatým standardem pro sledování MRN u hematologických malignit stále zůstává detekce genových přestaveb Ig/TR pomocí qPCR. Tato metodika však má svá omezení a interpretace výsledků qPCR může být často složitá. Tato studie (Příloha 3) se proto zaměřila na podrobné zhodnocení výsledků hladin MRN klasifikovaných jako pozitivní, nekvantifikovatelné pomocí metodiky založené na qPCR. Podle stávajících pravidel EuroMRD jsou takto klasifikované vzorky označeny například v důsledku nespecifické amplifikace DNA z fyziologických lymfocytů, což může vést k falešné pozitivitě. Na druhé straně se skutečně pozitivní vzorky mohou zařadit do této kategorie z důvodu nekonzistentní amplifikace mezi jednotlivými replikáty. Oba tyto případy mohou

ovlivnit terapeutické postupy, a proto je nezbytné definovat nová kritéria pro přesnější klasifikaci.

Tabulka 7: Přehled vzorků zahrnutých do studie a jejich rozdělení na základě dalších výsledků. Pokud hodnota dalšího výsledku byla negativní, označujeme vzorky jako pravděpodobně negativní hodnota minimální reziduální nemoci (MRN) (pNEG), naopak pokud tato kritéria byla pozitivní, označujeme vzorky jako pravděpodobně pozitivní hodnota MRN (pPOS). Převzato (Kotrova et al., 2024) a upraveno.

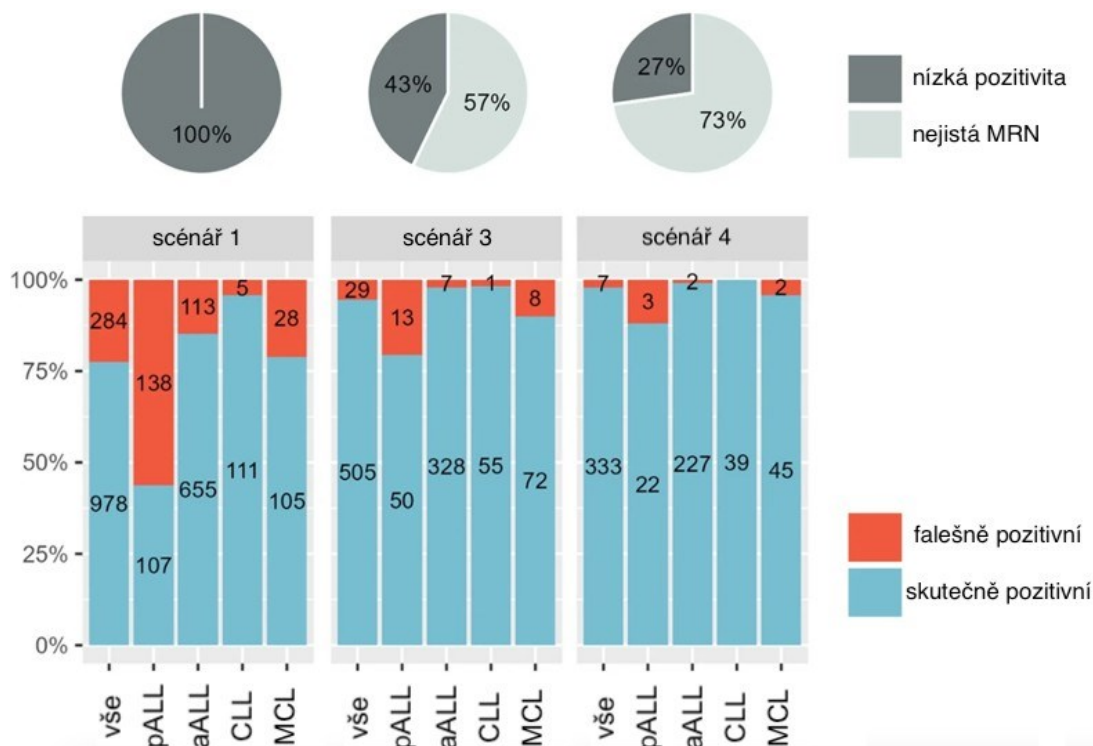
	pNEG			pPOS		celkem pNEG	celkem pPOS	celkem
	NGSneg	2. cílneg	negKIN	NGSpos	2. cíl pos			
ALL u dětí	97	41	0	94	13	138	107	245
ALL u dospělých	0	0	113	0	655	113	655	768
CLL	5	0	0	111	0	5	111	116
MCL	28	0	0	105	0	28	105	133
celkem	130	41	113	310	668	284	978	1262

Tabulka 8: Navržené scénáře a jejich jednotlivá kritéria. Polyklonální směs DNA od nejméně pěti zdravých dárců („buffy coat“ – BC), „threshold“ cyklus (Ct). Převzato (Kotrova et al., 2024) a upraveno.

kritéria scénářů					
	$\Delta BC \geq 3$	$\Delta BC \geq 3$ ve všech replikátech vzorku	negativní pozadí	3 pozitivní replikáty	$\Delta Ct < 1.5$
1					
2	✓				
3	✓			✓	
4	✓			(✓)	✓
5		✓		(✓)	
6		✓		(✓)	✓
7			✓		
8			✓	✓	
9			✓	(✓)	✓
10				✓	
11				(✓)	✓

Do studie bylo zařazeno celkem 1262 vybraných vzorků klasifikovaných jako PnQ, pocházejících od pacientů s ALL, CLL a lymfomem pláštěvé zóny z různých fází léčby, a to z pěti referenčních laboratoří skupiny EuroMRD (Kiel, Praha, Rotterdam, Turín a Bristol). Výběr vzorků byl podmíněn dostupností dodatečných dat ke stanovení MRN, jako jsou výsledky získané NGS metodou, kinetika MRN nebo analýza MRN na základě druhého cíle Ig/TR. Na základě těchto doplňkových dat bylo 284 vzorků (22,5 %) s negativními výsledky

přiřazeno do skupiny nazvané jako pravděpodobně negativní hodnota MRN (pNEG), zatímco 978 vzorků (77,5 %), kde byla další klíčová data pozitivní, bylo označeno jako pravděpodobně pozitivní hodnota MRN (pPOS) (Tabulka 7).

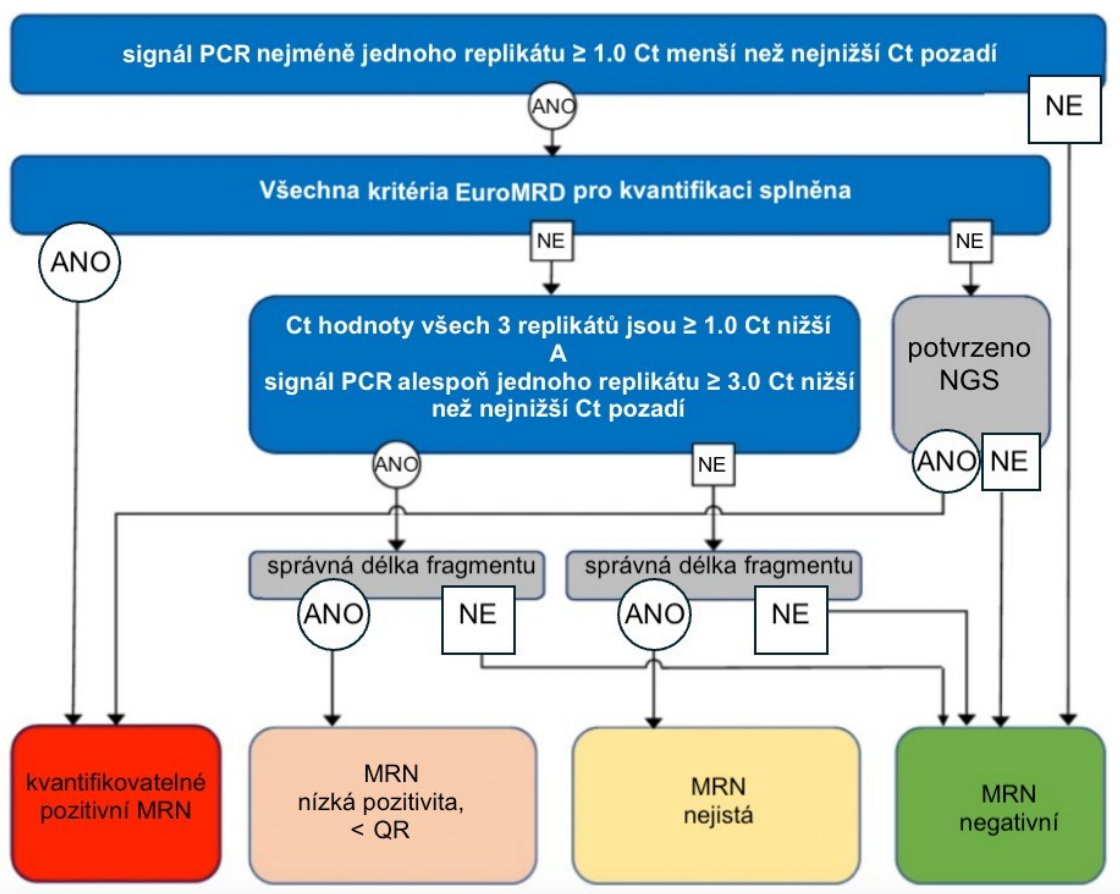


Obrázek 13: Rozdělení vzorků na základě kritérií jednotlivých scénářů. Horní část zobrazuje podíl vzorků splňující (nízká pozitivita) a nesplňující (nejistá minimální reziduální nemoc – MRN) kritéria scénáře. Spodní část zobrazuje vzorky s nízkou pozitivitou MRN. Červeně jsou zobrazeny falešně pozitivní výsledky, modře pak skutečně pozitivní výsledky. Kritéria jednotlivých scénářů jsou popsána v textu a v Tabulce 8. Akutní lymfoblastická leukémie u dětí (pALL), ALL u dospělých (aALL), chronická lymfocytární leukémie (CLL), lymfom plášťové zóny (MCL). Převzato (Kotrova et al., 2024) a upraveno.

Bylo navrženo 11 scénářů na základě různých pravidel (např. rozdíl mezi nejnižší hodnotou Ct vzorku a pozadím; počet pozitivních replikátů; rozdíl Ct mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou v replikátech vzorku), podle kterých by se daly rozlišit pNEG a pPOS vzorky (Tabulka 8). Výsledkem jsou tři kategorie vzorků: pravdivě pozitivní (pPOS vzorky splňují daná kritéria); pravdivě negativní (pNEG vzorky nesplňují daná kritéria); chybně označené pozitivní vzorky (pPOS vzorky nesplňující daná kritéria). Scénář 1 aplikoval současná používaná kritéria, scénář 4 dosáhl skutečné positivity 97,9 % (333/340), pokryl však jen asi čtvrtinu vzorků a jako nejvhodnější byl zvolen scénář 3 (Tabulka 8 a Obrázek 13), který vyžaduje tři pozitivní replikáty s hodnotou $\Delta BC \geq 3$. Tento scénář umožnil dosáhnout vyšší specifiity, čímž se podíl skutečně pozitivních výsledků zvýšil ze

77,5 % (978/1262) na 94,6 % (505/534) s pokrytím 42,8 % všech analyzovaných PnQ vzorků (Obrázek 13).

Na základě těchto výsledků je navržena aktualizace kritérií EuroMRD pro interpretaci PnQ vzorků (Obrázek 14). Vzorky, které splňují kritéria scénáře 3 a jsou vysoce pravděpodobně pozitivní, budou nově označovány jako nízká pozitivita MRN. Druhou skupinu budou tvořit vzorky s nejistou MRN, které nespĺňují kritéria scénáře 3 a nelze je spolehlivě klasifikovat jako skutečně pozitivní nebo negativní. Použití dalších technik, jako je NGS, může potvrdit nebo vyloučit nejistou pozitivitu těchto vzorků.



Obrázek 14: Graf zobrazující interpretaci následných vzorků podle nových kritérií EuroMRD. Minimální reziduální nemoc (MRN), „threshold“ cyklus (Ct), sekvenování nové generace (NGS). Převzato (Van der Velden et al., 2024) a upraveno.

4.4 Charakterizace repertoáru TR pomocí NGS u pacientů s ALK⁺ ALCL

Poslední studie (Příloha 4), která je podkladem této dizertační práce, analyzuje přínos využití stanovení repertoáru TR pomocí NGS v diagnostice a případném následném monitorování MRN u pacientů s ALK⁺ ALCL. Hlavním cílem celé studie bylo

identifikovat specifické fúzní geny a klonální přestavby Ig/TR a zhodnotit jejich potenciál jak pro diagnostické a prognostické účely, tak pro sledování MRN.

Tabulka 9: Charakteristika klonálních přestaveb TRG a TRB. Zahrnuje přestavěný segment, počet inzercí a delecí nukleotidů a aminokyselinovou sekvenci. Frekvence byla vypočítána jako podíl počtu „reads“ pro daný klonotyp k celkovému počtu „reads“ s identifikovaným segmentem V(D)J. Podtržené sekvence byly s přesnou shodou nalezeny v databázi TRBdb. Množství nádorových buněk ve vzorku bylo stanoveno pomocí značení hematoxylinem a eosinem, spolu s imunohistochemií pro ALK a CD30. Symbol „w“ označuje „klonálně slabé“ sekvence. NA: není k dispozici. Převzato (Kalinova et al., 2024) a upraveno.

Pacient	% ALCL buněk	TRG klonotyp	Frekvence (%)	TRB klonotyp	Frekvence (%)
22	20	V3 -0/2/-0 J1=J2 CATWDS*IIIRN	32	V19 -6/7/-4 J1-3 <u>CASSGGGNTIYF</u>	25
		V4 -0/15/-3 J1=J2 CATWDGPMGGPLL*ET	13	V24-1 -4/16/-2 J1-5 CATSDPQGA#NQPQHF	21
24	NA	nebylo detekováno		V28 -3/16/-1 J1-5 CASSFPRTGSSNQPHF	8 ^w
32	90	V10 -2/12/-4 JP1 CAAWDTPOGHVWLVQ	43	V7-9 -3/9/-9 J1-5 <u>CASSFTAWPQHF</u>	10 ^w
		V11 -0/8/-3 J1=J2 CACWIRHPPIRYKK	36	V19 -0/27/-5 J1-5 CASSIDGR*GETGW##QPQHF	80
38	25	V2 -0/2/-3 JP2 CATWDGL**LDQ	18 ^w	V24-1 -3/19/-4 J2-3 CATSDPTGLVDADTQYF	5
		V3 -4/6/-2 JP2 CATWVLE**LDQ	15 ^w	V9 -4/16/-5 J1-5 <u>CASSPGGGYQPQHF</u>	8 ^w
45	35	V10 -0/0/-3 JP1 CAAWDYHVLVQ	40	V5-6 -4/5/-5 J1-4 CASSG#NEKLF	62
		V5 -5/1/-0 JP1 CATWVYHVLVQ	34	V6-5 -0/14/-2 J2-7 CASSYSGGRAYEQYF	20
46	80	V9 -2/2/-9 J2 CALWED#KKLF	42	V6-1 -11/19/-5 J2-2 CADPDRHR#TGELFF	76
		V4 -4/3/-3 J1=J2 CATWDVYYKK	37		
49	30	V8 -0/7/-5 J1=J2 CATWDRGVYKK	31	V28 -7/18/-5 J2-1 <u>CASTMLGRHHNEQFF</u>	82
		V10 -4/4/-0 JP1 CAAWGVYHVLVQ	55		
50	60	V10 -0/4/-2 J1=J2 CAAWD*WIIIRN	17	nebylo detekováno	
		V8 -4/5/-8 J2 CATWESDKLFF	15		
53	25	V10 -17/1/-9 JP1 SWFK	31	V6-5 -6/16/-1 J2-7 CASRRGSSLSYEQYF	8 ^w
		V10 -0/5/-5 JP1 CAAWDYKDWLVQ	11		
54	80	V10 -4/6/-11 J2 CAAWGREKLF	41	V20-1 -1/14/-2 J2-5 CSARVAPPLQETQYF	38
		V2 -0/7/-5 J1=J2 CATWDGPGDYKK	16		
58	15	V10 -1/3/-2 JP1 CAAWDLHVLVQ	37	V20-1 -5/20/-2 J2-3 CSAFPLVVDFTDTQYF	66
		V5 -3/3/-1 J1=J2 CATWDQNYKK	20		
59	NA	V4 -5/6/-6 J1=J2 CATWGGVIRN	46	V7-9 -0/13/-4 J2-1 CASSLAQGFPYNEQFF	66
		V10 -7/9/-3 J1=J2 CAAYKLFIRN	37		
60	60	V10 -3/11/-8 JP1 CAAWDKSARLVQ	69	V28 -4/9/-3 J1-4 <u>CASSSGSANEKLF</u>	90
62	40	V2 -0/11/-3 J1=J2 CATWDGLLPTYKK	25	V7-9 -1/20/-4 J2-7 CASSLGPDRRYSYEQYF	61
		V8 -0/1/-2 J1=J2 CATWDRDYKK	25		
63	70	V9 -0/7/-8 J2 CALWEVHVNKLF	49	V11-2 -4/18/-2 J2-1 <u>CASSSGLAGVPYNEQFF</u>	89
		V8 -6/6/-4 J1=J2 CATWPRYYKK	43		
64	85	V10 -3/15/-8 J2 CAAWE*VSI##KKLF	73	V6-1 -6/7/-8 J1-4 <u>CASRDGEKLF</u>	90
		V4 -0/0/-1 J1=J2 CATWDGNYYKK	19		
69	80	V2 -0/2/-0 J1=J2 CATWDGPNYYKK	55	V5-1 -6/16/-0 J2-1 <u>CASTSGTGFSYNEQFF</u>	74
		V2 -0/10/-7 J2 CATWDGPR*#YKLF	11 ^w		
76	30	V8 -8/11/-0 J1=J2 CATLVGEELL*ET	5	V12-3=V12-4 -2/10/-2 J1-5 <u>CASSLWGWGNQPQHF</u>	43
		V8 -2/12/-2 J1=J2 CATWDIVRWDYYKK	5		
20	NA	nebylo detekováno		nebylo detekováno	
31	85	nebylo detekováno		nebylo detekováno	
47	60	nebylo detekováno		nebylo detekováno	
52	30	nebylo detekováno		nebylo detekováno	
75	80	nebylo detekováno		nebylo detekováno	

Tato studie sledovala kohortu 96 pacientů s ALK⁺ ALCL, kteří byli diagnostikováni v letech 1992-2021 na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole. Medián věku pacientů byl 16 let (55 pediatrických a 41 dospělých pacientů), věkové rozmezí bylo od 2 do 80 let, s poměrem mužů k ženám 1,23:1. Ze studie bylo vyloučeno pět pacientů kvůli nedostupnému materiálu.

Chromozomální zlomy zasahující do lokusu ALK byly detekovány u všech 91 vyšetřených pacientů. Fúzní gen *NPM1::ALK* byl identifikován u 71 pacientů (96 %), *AT1C::ALK* u 9 pacientů (9,4 %), *TPM3::ALK* u 3 pacientů a vždy u 2 pacientů byl

identifikován jeden z těchto fúzních genů *CLTC::ALK*, *MYH9::ALK* nebo *RNF213::ALK*. Fúze *TPM4::ALK*, *SQSTM1::ALK*, *SATB1::ALK*, *CAPRINI::ALK* byly detekovány vždy u jednoho pacienta. Pro účely diagnostiky a monitorování MRN byla následně navržena qPCR spojená s reverzní transkripcí k detekci exprese translokované části genu *ALK*. Všichni pacienti s hodnotitelnou RNA vykazovali vysokou hladinu exprese genu *ALK*, zatímco u kontrolních vzorků byla exprese velmi nízká. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl v hladině exprese genu *ALK* mezi jednotlivými morfologickými podtypy ani mezi různými typy fúzních genů.

Pomocí námi vyvinuté metody byl dále analyzován repertoár TR pro 23 pacientů, pro které byl zamrazený materiál stále k dispozici. Sekvence s četností vyšší než 5 %, u kterých byly současně detekovány další větší klony s méně než desetinásobnou frekvencí, byly označeny jako „klonálně slabé“. U 18 pacientů (78 %) byla identifikována alespoň jedna (rozsah 1-4) klonální přestavba TRG, přičemž vždy alespoň jedna z přestaveb byla produktivní. U 16 pacientů byly detekovány přestavby jak pro TRG, tak pro TRB, a všichni tito pacienti kromě jednoho měli dvě hlavní klonální přestavby TRG. Naopak u 13 případů s přestavbou TRB jsme detekovali pouze jednu dominantní přestavbu TRB, a u dvou pacientů byly detekovány dvě hlavní klonální přestavby TRB (Obrázek 15).

K určení antigenní specifity sekvencí TR byly dále tyto identifikované sekvence TR porovnány s databází složenou z dříve publikovaných dat. Klonální sekvence TRB deseti pacientů byly v těchto datových setech nalezeny, přičemž se jednalo o vzorky krve zdravých dárců, krve pacientů s tumory nebo u virově-specifických T-lymfocytů. Nebyly nalezeny žádné sdílené klonotypy mezi jednotlivými pacienty.

5 Diskuze

Dizertační práce se zaměřila na vývoj a optimalizaci diagnostických metod pro několik typů onemocnění krvetvorby pomocí sekvenování nové generace. Spojovacím prvkem celé práce je detekce přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory, především za účelem analýzy klonality a kvantifikace minimální reziduální nemoci.

Nejprve byla ve spolupráci s pracovní skupinou EuroClonality-NGS vyvíjena metoda detekce přestaveb Ig/TR pro stanovení MRN pomocí NGS. Pro tyto účely byl optimalizován téměř každý krok přípravy sekvenační knihovny s cílem dosáhnout co nejvyšší specifity a senzitivity.

První studie, která je podkladem dizertační práce, se zaměřila na validaci této metodiky. Přestože se NGS již rutinně využívá k analýze klonality, pro dětské pacienty s ALL stále zůstává zlatým standardem pro kvantifikaci MRN v léčebných protokolech detekce přestaveb Ig/TR pomocí qPCR, případně průtoková cytometrie. Několik již dříve publikovaných studií ukazuje důležitost NGS a jeho relevanci v klinickém užití, přesto doposud nebyla provedena studie porovnávající hladiny MRN stanovené pomocí qPCR a NGS u takto velké kohorty pacientů (Kotrova et al., 2015, 2017, 2022; Li et al., 2020; Pulsipher et al., 2022; Wood et al., 2018). Žádná ze studií navíc nehodnotila přestavby Ig/TR v celém spektru. Pro tuto studii bylo připraveno 702/709 (99 %) sekvenačních knihoven pro 780 cílů Ig/TR u 432 pacientů. Selhání přípravy knihoven v několika případech bylo způsobeno nedostatkem DNA pro opakování procesu. Tato vysoká úspěšnost přípravy knihoven dokazuje spolehlivost této metodiky, která je plně srovnatelná s qPCR. Pro srovnání, patient-specifickou esej pro detekci MRN pomocí qPCR lze připravit u více než 95 % pacientů (Van der Velden & van Dongen, 2009).

Porovnáním hladin MRN detekovaných pomocí NGS a qPCR jsme zjistili, že obě metody vykazují dobrou korelaci ($R = 0,83$), zejména v rozmezí běžné kvantifikace. Největší rozdíly jsme zaznamenali u vzorků s nízkou pozitivními hladinami MRN, kde je detekce obecně obtížnější. Při podrobnější analýze byly výsledky shodné i u jednotlivých systémů. 81,9 % analyzovaných cílů bylo shodně hodnoceno oběma metodami, přičemž 53,7 % z nich bylo konkordantně negativních. U 13,3 % cílů pozitivních pouze metodou qPCR byla většina klasifikována jako pozitivní pod kvantifikačním rozmezím, a téměř u poloviny z nich byla identifikována nespecifická amplifikace pozadí. Z cílů pozitivních výhradně pomocí NGS, jich 62 % bylo klasifikováno jako PnQ. NGS díky své schopnosti přesně sledovat sekvence jednotlivých přestaveb poskytuje specifické informace, které

minimalizují riziko falešně pozitivních výsledků způsobených nespecifickou amplifikací pozadí. Tato výhoda je zásadní zejména u nízké pozitivních hladin MRN, kde nespecifická amplifikace pozadí často omezuje přesnost qPCR. Tato data ukazují, že NGS je specifičtější metodou, ačkoli všechny cíle sledované pomocí qPCR splnily kritéria EuroMRD. V klinické praxi je kladen důraz na dosažení co nejvyšší senzitivity detekce MRN. Skutečná senzitivita detekce MRN však závisí na počtu buněk vložených do reakce. V této studii byly knihovny NGS připravovány z 1 μ g DNA, což odpovídá přibližně 150 000 jaderným buňkám, čímž bychom měli být schopni dosáhnout senzitivity 10^{-5} . Obrázek 10A dokládá úspěšné dosažení této citlivosti, což je v souladu s požadavky na přesnost a spolehlivost analýzy MRN. Dosažení senzitivity 10^{-6} je teoreticky možné přidáním většího množství DNA a rozdělením reakce do více replikátů, ale studie cílící na tuto senzitivitu získala potřebné množství 8 μ g DNA ve dni 29 indukční léčby pouze u 60 % pacientů (Wood et al., 2018).

Dále byla pro každý cíl Ig/TR provedena analýza specifity pomocí NGS. Specifická sekvence junkce V(D)J byla hledána ve všech ostatních knihovnách NGS a na základě této analýzy bylo odhaleno 54 cílů Ig/TR. Ty byly zařazeny do tří různých skupin – specifické s „index kontaminací“ („missindexed“), vzorky s nízkým pozadím a vzorky nespecifické. Indexová kontaminace „missindexed“ vznikla technickou chybou, která je v praxi snadno eliminovatelná. Při běžných sekvenačních procesech nebývá analyzováno několik stovek vzorků současně. Zvolením vhodných kombinací jednotlivých indexů při přípravě sekvenačních knihoven lze tento typ chyby minimalizovat. Vzorky s nízkým pozadím byly ty, u kterých byly specifické sekvence ve velmi nízkém pokrytí nalezeny i v jiných knihovnách NGS v nezávislosti na použitém indexu. Jedná se stále o specifické cíle, které si uchovávají klinickou relevanci. Naopak nespecifické cíle byly identifikovány ve vysokém pokrytí v dalších nezávislých knihovnách NGS napříč různými sekvenačními běhy. Tyto knihovny byly připravovány odděleně a nemohlo tedy dojít ke kontaminaci v této fázi přípravy. Tato nespecifita je pravděpodobně způsobena samotnou biologii přestaveb, což dokazuje, že některé cíle byly původně nevhodně vybrány pro sledování MRN pomocí qPCR. Tato analýza dokládá, že citlivost a specifita pacient-specifických esejí pro stanovení MRN pomocí qPCR je dána především pečlivým výběrem samotného cíle. To opět dokazuje výhodu NGS, které umožňuje detailnější analýzu jednotlivých cílů Ig/TR.

Tyto nespecifické cíle jsme dále rozdělili do jednotlivých systémů. Největší podíl nespecifických cílů byl identifikován u systémů IGK, TRD a TRG, kde tvořily 10 až 28,2 % všech cílů používaných pro detekci MRN. Společným znakem těchto nespecifických přestaveb je délka jejich N-úseku. Bylo zjištěno, že cíle s nejkratšími N-úseky byly zároveň

nejvíce nespecifické. To pravděpodobně souvisí s nízkou sekvenční variabilitou v krátkých N-úsecích, čímž se zvyšuje pravděpodobnost shody s jinými sekvencemi a problematické navrhnutí pacient-specifického primeru. Tímto přinášíme jedinečný soubor sekvencí, který pomáhá určit, kterým cílům se v budoucnu při stanovení MRN vyhýbat. Tyto sekvence jsou součástí nově tvořené databáze s názvem CloneBook, která je k dispozici členům konsorcia EuroMRD a pomáhá při výběru cílů pro stanovení MRN.

Následně byla provedena stratifikace pacientů výhradně na základě hodnot MRN ze dne 33. Tato stratifikace má zásadní význam, protože zařazení pacienta do nižší rizikové stratifikační skupiny může významně snížit toxicitu léčby a její dlouhodobé následky. Analýza ukázala, že metoda NGS zařadila 82 pacientů do nižší rizikové skupiny, zatímco naopak 19 pacientů bylo zařazeno do vyšší rizikové skupiny. V dnešní době dosahuje celkové přežití dětských pacientů s ALL dobré úrovně, a pozornost se přesouvá směrem ke zlepšení kvality života těchto pacientů. Jedním z klíčových cílů je snížení terapeutických dávek léčiv, a tím snížení dlouhodobých vedlejších účinků, jako jsou neuropsychologické a endokrinní dopady (Devilli et al., 2021). Přesnější stratifikace pacientů, kterou umožňuje metoda NGS, by mohla být významným krokem k dosažení tohoto cíle. Například přeřazení pacientů ze střední rizikové skupiny do skupiny standardního rizika na základě analýzy pomocí NGS by mohlo umožnit bezpečné snížení léčby.

Data ukazují vysoce shodné výsledky mezi qPCR a NGS, přičemž metoda NGS nabízí vyšší specifitu a poskytuje hlubší vhled o imunitním repertoáru Ig/TR. Tato studie poukazuje na mnohá úskalí metodiky qPCR, jako je větší náchylnost k falešně pozitivním výsledkům způsobeným nespecifickou amplifikací, a zároveň podtrhuje výhody NGS. Přestože NGS přináší řadu technických a klinických výhod, její použití je stále spojeno s určitými výzvami. NGS je považováno za mnohem nákladnější metodu než qPCR, kdy pořizovací náklady na samotné přístroje a následně potřebné reagenty pro každý běh jsou spojeny s vysokými cenami. V tomto případě je velmi důležitá celková logistika laboratoře a vhodné plánování sekvenace jednotlivých vzorků. Pokud je sekvenační běh plně obsazen, náklady na analýzu jednoho vzorku rapidně klesají. Avšak pro laboratoře s menším obratem vzorků a obtížně předvídatelným počtem analýz může být využití NGS náročné. Tyto laboratoře nemusí mít možnost efektivně plánovat obsazení sekvenačních běhů, což zvyšuje náklady na jednotlivé analýzy. Do budoucna by technologický pokrok a pokles cen mohl umožnit širší implementaci NGS. Pokud nebereme v úvahu finanční náklady, časová náročnost metod NGS a qPCR je srovnatelná. U NGS zahrnuje celkový proces od přijetí vzorku po získání výsledků několik kroků: přípravu vzorku, přípravu sekvenačních knihoven, samotný

sekvenační běh, jehož délka se liší v závislosti na konkrétním modelu sekvenátoru a zvolených parametrech sekvenování (např. pro Illumina Miseq může trvat až 39 hodin), a analýzu výsledků. Naproti tomu qPCR, pokud již máme optimalizovanou pacient-specifickou esej, teoreticky může poskytnout výsledek do jednoho dne od přijetí vzorku v laboratoři. Časová náročnost však dramaticky roste, pokud zahrneme i celý proces s návrhem specifických primerů a následnou optimalizací pacient-specifické eseje pomocí qPCR. Tento proces je laboratorně náročný a vyžaduje zkušený personál. Metoda je ale dlouhodobě standardizovaná díky opakovaným kontrolám kvality a dobrá spolupráce v rámci konsorcia EuroMRD umožňuje laboratořím efektivně zvládat úskalí této techniky. Ve většině evropských laboratořích tak zůstává qPCR preferovanou metodou pro detekci MRN. NGS se tak prozatím stává doplňkovou metodou v nejasných případech, kdy výsledky získané qPCR nejsou jednoznačné. NGS se využívá k ověření nízce pozitivních výsledků, k vyloučení falešně pozitivních výsledků, především u pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo u pacientů, u kterých nelze vhodnou specifickou esej zavést. Z těchto důvodů je stále důležité zlepšovat kritéria pro stanovení MRN pomocí qPCR (Kotrova et al., 2017).

Druhá studie podkládající tuto dizertační práci, je zaměřená na ověřování nízce pozitivních – tzv. pozitivních, nekvantifikovatelných výsledků qPCR. Jejímž cílem bylo navrhnout nová pravidla pro interpretaci takovýchto výsledků, a tím zlepšit specifitu qPCR. Tato kategorie výsledků qPCR představuje dlouhodobou výzvu pro interpretaci MRN a následné klinické rozhodnutí, které v případě falešné positivity může vést k nesprávným léčebným postupům. Již publikované studie ukazují, že se nejčastěji jedná o vzorky z období s velkou regenerací kostní dřeně, které mohou být falešně pozitivní kvůli nespecifické amplifikaci podobných sekvencí ve fyziologických lymfocytech (Fronkova et al., 2008; Kotrova et al., 2017; Van der Velden et al., 2008).

Do studie bylo zahrnuto 1262 nízce pozitivních vzorků, které byly rozděleny na pravděpodobně negativní a pravděpodobně pozitivní na základě doplňkových údajů, jako jsou výsledky NGS, hodnoty MRN pro druhý cíl nebo kinetika MRN. Použitý soubor vzorků je tak silně ovlivněn a nepředstavuje reálné aktuální počty nízce pozitivních vzorků pro každou skupinu. Následně byly vytvořeny kombinace různých kritérií, kdy jako nejlepší kombinací byl zvolen scénář 3, který vyžaduje tři pozitivní replikáty s hodnotou $\Delta BC \geq 3$ (Ct) u minimálně jednoho z nich. Získaná data ukazují, že zpřísnění kritérií pro interpretaci dat MRN může zvýšit jistotu detekce skutečné positivity MRN.

Původní mezinárodní kritéria pro interpretaci dat minimální reziduální nemoci byla vyvinuta skupinou EuroMRD a publikována již v roce 2007 (Van der Velden et al., 2007). Vzorky, které splňují kritéria scénáře 3, budou nově označovány jako nízcce pozitivní MRN a vzorky, které kritéria nesplňují, budou vzorky s nejistou MRN. Pro potvrzení správnosti výsledků se také doporučuje kontrola velikosti produktu PCR. Pokud délka fragmentu neodpovídá očekávané velikosti, měl by být vzorek klasifikován jako negativní. Tato upravená kritéria jsou publikovaná samostatně (Van der Velden et al., 2024) a mají vejít v platnost v příštím roce. Implementace těchto pravidel by mohla v klinické praxi vést k přesnějším rozhodnutím v otázce léčebného přístupu.

Technika detekce přestaveb TR pomocí NGS byla testována také u pacientů s ALK⁺ anaplastickým velkobuněčným lymfomem. Hlavním cílem této studie bylo porovnat možnosti využití jak pro diagnostické účely, tak pro případné následné sledování minimální reziduální nemoci. U 91 vyšetřených pacientů byl identifikován fúzní gen, přičemž nejčastěji detekovaným byl *NPM1::ALK*, který byl přítomen u 74 % pacientů. Tyto výsledky jsou v souladu s již publikovanými daty (Falini et al., 1999; Irshaid & Xu, 2020; Turner et al., 2007). Fúzní geny *SQSTM1::ALK* a *CAPRINI::ALK* nebyly dříve popsány, zatímco fúze *SATB1::ALK* byla již reportována v jedné předchozí studii (Drieux et al., 2021). Malý počet pacientů v jednotlivých podskupinách neumožnil stanovit prognostický význam jednotlivých aberací. Detekce nových fúzních partnerů genu *ALK* má především význam ve výzkumu, pro rutinní diagnostiku v současnosti postačuje průkaz zlomu 2p23 pomocí metody FISH a detekce exprese ALK pomocí imunohistochemie.

Následné měření exprese ALK ukázalo u všech analyzovaných pacientů detekované vysoké hladiny v porovnání s kontrolními vzorky. U devíti pacientů byly hladiny kontrolního genu pod kvantitativním rozsahem eseje, a proto byly klasifikovány jako pozitivní, nekvantifikovatelné. Analýza neprokázala žádné rozdíly v hladinách exprese ALK mezi pacienty s různými podtypy ALCL, s různými typy fúzních genů ani mezi pacienty, kteří prodělali relaps. Tyto výsledky se liší od studie (Pomari et al., 2017), která ale na rozdíl od naší studie analyzuje pouze pediatrické pacienty. Detekce exprese ALK je vhodná pro diagnostické účely i pro následné sledování MRN u všech pacientů s ALK⁺ ALCL, což v publikaci ukazujeme na příkladu sledování dvou pacientů. Hladiny MRN stanovené pomocí exprese ALK velmi dobře korelovaly s klinickým průběhem.

Pomocí metodiky založené na NGS byl analyzován repertoár TR u 23 pacientů. U 18 z nich byla identifikována alespoň jedna klonální přestavba TRG, zatímco

u 17 pacientů byla detekována alespoň jedna klonální přestavba TRB. U pěti pacientů jsme nenalezli žádnou klonální přestavbu TR. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozí studií, která využila metodu GeneScan a identifikovala podobné zastoupení klonálních přestaveb TRG a mírně nižší podíl TRB (T. I. M. Malcolm et al., 2016). Frekvence detekovaných klonů TRG byla nižší než 50 %, a to bez ohledu na procentuální zastoupení nádorových buněk, zatímco stanovené frekvence klonů TRB korelovaly lépe s nádorovou infiltrací. Tento rozdíl lze vysvětlit biologií přestaveb TRG, kdy je tento typ lokusu přestavěn na obou alelách u většiny T-lymfocytů. Tyto poznatky korelují s našimi výsledky, kde u 16 pacientů byly detekovány dvě klonální přestavby TRG. Naproti tomu dvě klonální přestavby TRB byly nalezeny pouze u 4 pacientů. Celkově nižší frekvence detekovaných přestaveb TRG pravděpodobně odráží biologické vlastnosti samotných vzorků a může být ovlivněna odlišným pozadím.

Postup pro vyhodnocení dat z NGS pro analýzu klonality byl v této studii podobný jako nedávno publikovaná doporučení pro interpretaci klonality B-lymfocytů pomocí NGS (Van den Brand et al., 2023). Na rozdíl od klonality B-lymfocytů však pro T-buněčnou klonalitu stanovenou pomocí NGS dosud nebyla provedena validační studie, která by jednoznačně definovala optimální prahové hodnoty. Pravidla použitá v této studii by však měla být dostatečně specifická a poskytovat spolehlivé výsledky. U jednoho z pacientů (#76) byly detekovány dvě klonální přestavby TRG s frekvencí 5 %. Vzhledem k tomu, že jedna z přestaveb není produktivní, jde pravděpodobně o bialelickou přestavbu, kde neproduktivní sekvence odpovídá druhé alele u stejného klonu. Další klon ve stejném vzorku byl detekován s frekvencí 0,3 %, což by při použití pravidel pro hodnocení klonality u B-lymfocytů označilo zmíněné přestavby jako klonální. Na druhou stranu se může jednat o reaktivní klon lymfocytů, protože jedna z přestaveb je produktivní. Naše nepublikovaná data navíc ukazují, že u zdravých dětí pozorujeme klony TRB s frekvencí kolem 5 %, které byly popsány jako reaktivní například proti virům chřipky nebo CMV. Předpokládali jsme, že produktivita přestaveb by mohla sloužit jako parametr pro lepší rozlišení jednotlivých klonů. To se nepotvrdilo, jelikož většina detekovaných přestaveb TR byla produktivních. Naopak v některých případech, například u pacienta (#38), byly identifikovány dvě „klonálně slabé“ sekvence TRG, obě neproduktivní a tedy nereaktivní.

Dále jsme se pokusili určit antigenní specifitu TR sekvencí pomocí databází publikovaných dat. Shodu jsme našli u 10 pacientů, přičemž klonální sekvence TRB již byly detekovány například v krvi zdravých dárců, krvi pacientů s tumory nebo u virově-specifických T-lymfocytů. Nenalezli jsme však žádné sdílené klonotypy u různých pacientů,

kteře by potenciálně mohly sloužit jako markery onemocnění. Tyto výsledky naznačují, že detekované sekvence TR jsou nejspíše pacient-specifické, což výrazně omezuje možnost jejich identifikace pomocí dostupných databází se známými sekvencemi TR. Analýza repertoáru TR nejen v nádorových buňkách, ale i v infiltrujících T-lymfocytech, je silnou stránkou naší metody. Naše studie ukázala, že u ALCL je rozlišení nádorových a infiltrujících buněk obtížné. Rozlišení by mohly usnadnit novější technologie tzv. „Single Cell“ RNA sekvenování.

Na základě získaných dat a nemožnosti stanovit klonalitu repertoáru TR ve větší kohortě pacientů se ukazuje že jak pro diagnostické účely, tak pro monitorování MRN u ALK⁺ ALCL pacientů je vhodnější detekce hladin exprese ALK. Přestože analýza repertoáru TR pomocí NGS přináší zajímavá výzkumná data, její klinická využitelnost je v tomto směru zatím omezená.

Naše metodika byla dále využita pro sledování odpovědi na léčbu a zároveň přítomnost fyziologických lymfocytů u syndromů imunitní dysregulace a autoimunitních onemocnění. Především pak pro sledování vývoje diabetu 1. typu, celiakie, astmatu a alergií v rámci evropského projektu HEDIMED (manuskript v přípravě). Doufali jsme, že tuto metodiku lze využít nejen u malignit, ale také u širokého spektra imunitních poruch, kde velkou roli hraje repertoár Ig/TR. To je případ i virových onemocnění, zejména těch s autoimunitními následky. Naše skupina byla během pandemie Covidu-19 součástí několika studií zaměřujících se na pacienty s různými imunodeficity. Specifickým typem onemocnění, kde jsme potvrdili roli autoreaktivních T-lymfocytárních klonů, je multisystémový zánětový syndrom u dětí, který se vzácně objevuje u dětí po proděláním infekce Sars-CoV-2. Nalezli jsme superantigenem indukovanou polyklonální expanzi T-lymfocytů s přestavěným segmentem TRBV11-2, která je pravděpodobně zodpovědná za orgánové poškození. V porovnání se zdravými kontrolami, jsme našli zvýšené zastoupení tohoto typu segmentu u všech pacientů. Tato data nebyla publikována, jelikož ke stejným závěrům došly dvě jiné studie před námi. Část dat z této studie zaměřených především na humorální odpověď B-lymfocytů byla publikována (Klocperk et al., 2023).

Dále jsme se soustředili na několik projektů zaměřujících se na T-buněčnou imunitní odpověď po vakcinaci proti Sars-CoV-2 u imunosuprimovaných pacientů. Předpokládali jsme, že naší vyvinutá metoda nám umožní sledování kompozice a klonality T-lymfocytárních klonů odpovídajících na různé typy vakcín a jejich vývoj v čase. Tato hypotéza nebyla naplněna, jelikož na základě kultivačních experimentů nebylo možné

s jistotou potvrdit, že nalezené sekvence jsou naprosto specifické sekvence proti tomuto antigenu. Nicméně jsme současně hodnotili klinické výsledky, bezpečnost a dynamiku humorální a T-buněčné imunitní odpovědi na mRNA vakcínu u pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí. Humorální odpověď byla detekována u přibližně poloviny pacientů jeden měsíc po vakcinaci, zatímco T-buněčná odpověď u přibližně 33 %. Výsledky této studie byly publikovány (Milota et al., 2023). Dále jsme pozorovali specifickou odpověď po třetí dávce vakcinace proti Sars-CoV-2 u imunosuprimovaných pacientů, kteří podstoupili transplantaci plic. Přestože tito pacienti díky imunosupresi neprodukuje protilátkovou odpověď, třetí dávka vakcinace indukovala T-buněčnou specifickou odpověď, a tyto výsledky ukazují na důležitost vakcinace i u tohoto typu pacientů (Havlin et al., 2022). Tyto publikace souvisí s tématem práce pouze částečně, a proto nebyly podkladem této dizertační práce.

6 Závěr

Provedené experimenty a analýzy poskytly tyto výsledky:

- V rámci spolupráce s pracovní skupinou EuroClonality-NGS byla vyvinuta metoda pro sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s ALL založená na detekci nejčastějších typů přestaveb Ig/TR pomocí NGS.
- Metodika byla validována na kohortě dětských pacientů s ALL a detekce MRN pomocí NGS byla porovnána se standardizovanou kvantifikací MRN pomocí qPCR. Dosud nebyla provedena studie, která by na tak velké kohortě pacientů porovnávala stanovení MRN pomocí qPCR a NGS. Data ukazují, že detekce přestaveb Ig/TR jako cílů pro sledování MRN pomocí NGS u ALL dosahuje více specifických výsledků, které umožní spolehlivou redukci léčby u pacientů nízkého rizika. Tato metoda může být spolehlivou alternativou k tradiční detekci MRN. V současnosti je již implementována do klinického sledování pacientů jako pomocná technika především v nejasných případech nízkých hladin MRN.
- Podařilo se upřesnit kritéria EuroMRD pro interpretaci výsledků MRN u níže pozitivních vzorků měřených pomocí qPCR. Tato kategorie bude nově rozdělena do dvou skupin: MRN s nízkou pozitivitou a MRN s nejistou signifikancí. Pravidla začnou být používána členy konsorcia od roku 2025. To ovlivní hodnocení MRN v 71 referenčních laboratořích z 27 zemí Evropy, Asie, Austrálie, Jižní i Severní Ameriky.
- Klonální přestavba TR byla pomocí NGS detekována u 78 % pacientů s ALK⁺ ALCL. Přestavby TR mohou potenciálně sloužit jako cíle pro monitorování MRN. Odlišení reaktivních a klonálních repertoárů TR však není jednoznačné. Detekce exprese genu *ALK* je pro sledování MRN vhodnější vzhledem k její přítomnosti u všech pacientů, snadnější proveditelnosti a jasnější interpretaci výsledků.

7 Souhrn

Tato dizertační práce vychází ze tří publikovaných studií, které se věnují problematice stanovení klonality a MRN pomocí detekce přestaveb Ig/TR. Hlavním cílem práce bylo rozvíjet a validovat metody pro stanovení MRN u hematologických malignit pomocí NGS. Námi získaná data ukazují, že NGS poskytuje specifitější detekci MRN u dětských pacientů s ALL ve srovnání se standardizovanou metodou qPCR. Tento postup je připraven k zařazení do klinické praxe jako cenný doplněk k již zavedené technice qPCR, zejména v případech, kde výsledky qPCR nejsou jednoznačné. Součástí práce bylo také upřesnění kritérií pro interpretaci nízké pozitivních vzorků detekovaných pomocí qPCR. Navržené rozdělení této kategorie by mělo vést ke zlepšení diagnostické přesnosti. Kromě toho NGS nabízí užitečný pohled na klonalitu repertoáru TR u pacientů s ALK⁺ ALCL. Tato práce podtrhuje význam NGS nejen jako nástroje pro zlepšení detekce MRN, ale také jako důležité součásti přesnější a citlivější diagnostiky.

8 Summary

This dissertation is based on three published studies focusing on the determination of clonality and MRD using the detection of Ig/TR gene rearrangements. The main aim of this study was to develop and validate methods for MRD detection in hematologic malignancies using NGS. Our data demonstrate that NGS provides more specific MRD detection in pediatric ALL patients compared to the standardized qPCR method. This approach is prepared for clinical implementation as a valuable complement to the established qPCR technique, especially in cases with inconclusive qPCR results. The work also included redefining criteria for interpreting low-positive samples detected by qPCR. The proposed classification of this category is expected to enhance diagnostic accuracy. Furthermore, NGS provides valuable insights into the clonality of the TR repertoire in patients with ALK⁺ ALCL. This study highlights the significance of NGS not only as a tool for improving MRD detection but also as an essential part for more accurate and sensitive diagnostics.

9 Seznam publikací

9.1 Původní vědecké práce, které jsou podkladem této dizertační práce

NGS-based MRD quantitation: an alternative to qPCR validated on a large consecutive cohort of children with ALL: Svaton M*, **Skotnicova A***, Reznickova L, Rennerova A, Valova T, Kotrova M, van der Velden V.H.J, Bruggemann M, Darzentas N, Langerak A.W, Zuna J, Stary J, Trka J, Fronkova E., Blood 2023 (IF₂₀₂₃=20,3)

* Sdílené prvoautorství

Příloha 2

Autorský podíl: příprava sekvenačních knihoven, analýza dat z NGS, příprava publikace a revizí publikace v rámci recenzního řízení. Tato publikace nebyla podkladem jiné dizertační práce.

The Gray Area of RQ-PCR-based Measurable Residual Disease: Subdividing the 'Positive, Below Quantitative Range' Category: Kotrova M, Fronkova E, Svaton M, Drandi D, Schön F, Hoogeveen P, Hancock J, **Skotnicova A**, Schilhabel A, Eckert C, Clappier E, Cazzaniga G, Schäfer B, van Dongen JJM, Ritgen M, Pott Ch, van der Velden VHJ, Trka J, Brüggemann M: Leukemia, 2024 (IF₂₀₂₃=11,4)

Příloha 3

Autorský podíl: příprava analýzy dat za ČR, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

Molecular Screening in Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma: Anaplastic Lymphoma Kinase Analysis, Next-Generation Sequencing Fusion Gene Detection, and T-Cell Receptor Immunoprofiling: Kalinova M, Mrhalova M, Kabickova E, Svaton M, **Skotnicova A**, Prouzova Z, Krenova Z, Kolenova A, Divoka M, Fronkova E, Kodet R: Modern Pathology, 2023 (IF₂₀₂₁=10,0)

Příloha 4

Autorský podíl: příprava sekvenačních knihoven, analýza repertoáru TR, příprava odpovídajících částí manuskriptu.

9.2 Další publikace autora, které nesouvisí s tématem práce

Hydrops fetalis and failure of hematopoietic stem cell transplantation – A long route to the diagnosis of SPTA1-associated hereditary spherocytosis: Svaton M, Sukova M, Sedlacek P, **Skotnicova A**, Vodickova E, Kalina T, Trka J, Fronkova E, Stary J. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2022. (IF₂₀₂₂=3,04)

Impaired humoral response to third dose of BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine despite detectable spike protein specific T-cells in lung transplant recipients: Havlin J, **Skotnicova A**, Dvorackova E, Hubacek P, Svorcova M, Lastovicka J, Sediva A, Kalina T, Lischke R. Transplantation, 2022. (IF₂₀₂₂=5,0)

Clinical outcomes, immunogenicity, and safety of BNT162b2 Vaccine in Primary Antibody Deficiency: Milota T*, Smetanova J*, **Skotnicova A***, Rataj M, Lastovicka J, Zelena H, Parackova Z, Fejtkova M, Kanderova V, Fronkova E, Rejllova K, Sediva A, Kalina T. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2023. (IF₂₀₂₃=11)

* Sdílené prvoautorství

B cell phenotype and serum levels of interferons, BAFF, and APRIL in multisystem inflammatory syndrome in children associated with COVID-19 (MIS-C): Klocperk A, Bloomfield M, Parackova Z, Aillot L, Fremuth J, Sasek L, David J, Fencel F, **Skotnicova A**, Rejllova K, Magner M, Hrusak O, Sediva A. Molecular and Cellular Pediatrics, 2023. (IF₂₀₂₃=2,4)

10 Seznam použité literatury

Alaggio, R., et al., (2022). The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01962-5>

Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*, 6(5), 479–491. <https://doi.org/10.3390/cancers13184500>

Alt, F. W., et al., (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO Journal*, 3(6), 1209–1219. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01955.x>

Armitage, J. O. (1993). Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 328(14), 1023–1030. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304083281409>

Armitage, J. O. (2005). Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *A Cancer Journal for Clinicians*, 55(6), 368–376. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.6.368>

Baltimore, D. (1974). Is terminal deoxynucleotidyl transferase a somatic mutagen in lymphocytes? *Nature*, 248(5447), 409–411. <https://doi.org/10.1038/248409a0>

Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell*, 109(2, Supplement 1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00675-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00675-X)

Beishuizen, A., et al., (1993). Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia*, 7, 2045.

Beishuizen, A., et al., (1994). Detection of immunoglobulin kappa light-chain gene rearrangement patterns by Southern blot analysis. *Leukemia*, 79.

Beishuizen, A., et al., (1994). Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood*, 8(83), 2238–2247. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.8.2238.2238>

Borowitz, M. J., et al., (2015). Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood*, 126(8), 964–971. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-633685>

- Bottaro, M., et al., (1994). Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*, *11*(83), 3271–3278. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.11.3271.3271>
- Breit, T. M., et al., (1993). Southern blot patterns, frequencies, and junctional diversity of T-cell receptor-delta gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *10*(82), 3063–3074. <https://doi.org/10.1182/blood.V82.10.3063.3063>
- Brenner, D. J., & Hall, E. J. (2007). Computed tomography—an increasing source of radiation exposure. *New England Journal of Medicine*, *357*(22), 2277–2284. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072149>
- Brenner, S., & Milstein, C. (1966). Origin of Antibody Variation. *Nature*, *211*(5046), 242–243. <https://doi.org/10.1038/211242a0>
- Bruggemann, M., et al., (2019). Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*, *33*(9), 2241–2253. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0496-7>
- Bruggemann, M., et al., (2010). Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia*, *24*(3), 521–535. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.268>
- Bruggemann, M., et al., (2004). Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *18*(4), 709–719. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403263>
- Bruggemann, M., et al., (2007). Powerful strategy for PCR-based clonality assessment in T-cell malignancies: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *2*(21), 215–221. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404481>
- Brumpt, C., et al., (2000). The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *96*(6), 2254–2261. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2254>
- Bystry, V., et al., (2017). ARResT/Interrogate: an interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data. *Bioinformatics*, *33*(3), 435–437. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw634>

- Campana, D., & Coustan-Smith, E. (1999). Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 38(4), 139–152. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19990815\)38:4<139::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19990815)38:4<139::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H)
- Campana, D., & Pui, C.-H. (1995). Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*, 85(6), 1416–1434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V85.6.1416.bloodjournal8561416>
- Campana, D., & Pui, C.-H. (2017). Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129(14), 1913–1918. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-725804>
- Carroll, W. L., et al., (2003). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology*, 2003(1), 102–131. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.102>
- Colleoni, G. W. B., et al., (2000). ATIC-ALK: a novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv (2)(p23q35). *The American Journal of Pathology*, 156(3), 781–789. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64945-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64945-0)
- Corbett, S. J., et al., (1997). Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, “minor” D segments or DD recombination. *Journal of Molecular Biology*, 270(4), 587–597. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1141>
- Coustan-Smith, E., et al., (2000). Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 96(8), 2691–2696. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.8.2691>
- Cunningham-Rundles, C., & Ponda, P. P. (2005). Molecular defects in T-and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nature Reviews Immunology*, 5(11), 880–892. <https://doi.org/10.1038/nri1713>
- Cuomo, C. A., Mundy, C. L., & Oettinger, M. A. (1996). DNA sequence and structure requirements for cleavage of V (D) J recombination signal sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 10(16), 5683–5690. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5683>
- Damle, R., et al., (1999). IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1840–1847. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.6.1840>

- Damm-Welk, C., et al., (2020). Quantification of minimal disseminated disease by quantitative polymerase chain reaction and digital polymerase chain reaction for NPM-ALK as a prognostic factor in children with anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*, 105(8), 2141. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232314>
- Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334(6181), 395–402. <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- De Vree, P. J. P., et al., (2014). Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nature Biotechnology*, 32(10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1038/nbt.2959>
- Desiderio, S. V., et al., (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*, 311(5988), 752–755. <https://doi.org/10.1038/311752a0>
- Devilli, L., et al., (2021). Long-term and quality of survival in patients treated for acute lymphoblastic leukemia during the pediatric age. *Hematology Reports*, 13(1), 8847. <https://doi.org/10.4081/hr.2021.8847>
- Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.201>
- Dongen, J. J. M., & Wolvers-Tettero, I. L. M. (1991). Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 198(1), 1–92. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90246-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90246-9)
- Dreyer, W. J., & Bennett, J. C. (1965). The molecular basis of antibody formation: A paradox*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54, 864–869. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.864>
- Drieux, F., et al., (2021). Detection of gene fusion transcripts in peripheral T-cell lymphoma using a multiplexed targeted sequencing assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(8), 929–940. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.013>
- Edelman, G. M., & Gally, J. A. (1967). Somatic recombination of duplicated genes: an hypothesis on the origin of antibody diversity *. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57(2), 353–358. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.2.353>

- Erikson, J., Martinis, J., & Croce, C. M. (1981). Assignment of the genes for human λ immunoglobulin chains to chromosome 22. *Nature*, 294(5837), 173–175. <https://doi.org/10.1038/294173a0>
- Evans, P. A. S., et al., (2007). Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*, 21(2), 207–214. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404479>
- Ezekiel, U. R., et al., (1995). Asymmetric processing of coding ends and the effect of coding end nucleotide composition on V (D) J recombination. *Immunity*, 2(4), 381–389. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90146-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90146-9)
- Falini, B., et al., (1999). ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*, 93(8), 2697–2706. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.8.2697>
- Fischer, A. (2004). Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nature Immunology*, 5(1), 23–30. <https://doi.org/10.1038/ni1023>
- Foon, K. A., & Todd, R. F. 3d. (1986). Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 1(68), 1–31. <https://doi.org/10.1182/blood.V68.1.1.1>
- Froni, L., et al., (1999). Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *British Journal of Haematology*, 105(1), 7–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01365.x>
- Fowlkes, B. J., & Pardoll, D. M. (1989). Molecular and cellular events of T cell development. *Advances in Immunology*, 44, 207–264. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60643-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60643-4)
- Freedman, A. S., & Nadler, L. M. (1991). Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 5(5), 871–889. [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(18\)30390-3](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(18)30390-3)
- Fronkova, E., et al., (2005). TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia*, 19(7), 1296–1297. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403759>
- Fronkova, E., et al., (2008). B-cell reconstitution after allogeneic SCT impairs minimal residual disease monitoring in children with ALL. *Bone Marrow Transplantation*, 42(3), 187–196. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.122>

- Gadala-Maria, D., et al., (2015). Automated analysis of high-throughput B-cell sequencing data reveals a high frequency of novel immunoglobulin V gene segment alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E862–E870.
- Gambacorti-Passerini, C., et al., (2011). Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(7), 553–561. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr060>
- Gangi-Peterson, L. M. (1997). *A study of terminal deoxynucleotidyl transferase and its role in V (D) J recombination*. The University of North Carolina at Chapel Hill.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2(5), 309–322. <https://doi.org/10.1038/nri798>
- Germano, G., et al., (2003). Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia*, 17(8), 1573–1582. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403008>
- Goodnow, C. C. (2007). Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*, 130(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.033>
- Grawunder, U., et al., (1998). DNA ligase IV is essential for V (D) J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Molecular Cell*, 2(4), 477–484. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80147-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80147-1)
- Groenen, P. J. T. A., et al., (2008). Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *Journal of Hematopathology*, 1, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s12308-008-0013-9>
- Hamblin, T. J., et al., (1999). Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1848–1854. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.6.1848>
- Harris, N. L., et al., (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84(5), 1361–1392. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1361.1361>
- Havlin, J., et al., (2022). Impaired Humoral Response to Third Dose of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine Despite Detectable Spike Protein-specific T cells in Lung Transplant Recipients. In *Transplantation* 106(3), 183-184 <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004021>

- Hernandez, L., et al., (1999). TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood*, 94(9), 3265–3268. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.9.3265>
- Herrera, A. F., & Armand, P. (2017). Minimal Residual Disease Assessment in Lymphoma: Methods and Applications. *Journal of Clinical Oncology*, 35(34), 3877–3887. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.5281>
- Hesslein, D. G. T., & Schatz, D. G. (2001). Factors and Forces Controlling V(D)J Recombination. In F. J. Dixon (Ed.), *Advances in Immunology* 78, 169–232. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(01\)78004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(01)78004-2)
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Soc Tr.*, 17, 68–114. <https://doi.org/10.1177/095952873201700106>
- Hope, K. J., Jin, L., & Dick, J. E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nature Immunology*, 5(7), 738–743. <https://doi.org/10.1038/ni1080>
- Hoster, E., & Pott, C. (2016). Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: insights into biology and impact on treatment. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2016(1), 437–445. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.437>
- Hottentot, Q. P., et al., (2017). Targeted locus amplification and next-generation sequencing. *Genotyping: Methods and Protocols*, 185–196. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_13
- Hou, X. L., et al., (2016). Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire. *Genes & Immunity*, 17(3), 153–164. <https://doi.org/10.1038/gene.2016.9>
- Hrusak, O., et al., (2002). Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. *Leukemia*, 16(4), 720–725. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402422>
- Hunger, S. P., et al., (2011). Improving outcomes for high-risk ALL: Translating new discoveries into clinical care. *Pediatric Blood & Cancer*, 56(6), 984–993. <https://doi.org/10.1002/pbc.22996>

- Huntington, S. F., Svoboda, J., & Doshi, J. A. (2015). Cost-effectiveness analysis of routine surveillance imaging of patients with diffuse large B-cell lymphoma in first remission. *Journal of Clinical Oncology*, 33(13), 1467–1474. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.5729>
- Inaba, H., & Mullighan, C. G. (2020). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(11), 2524. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247031>
- Inghirami, G., et al., (1994). The Reed-Sternberg cells of Hodgkin disease are clonal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), 9842–9846. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9842>
- Irshaid, L., & Xu, M. L. (2020). ALCL by any other name: the many facets of anaplastic large cell lymphoma. *Pathology*, 52(1), 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.007>
- Ito, C., et al., (1999). Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*, 93(1), 315–320. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.1.315>
- Jabbour, E., et al., (2015). New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 121(15), 2517–2528. <https://doi.org/10.1002/ncr.29383>
- Jaffe, E. S. (2001). *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (Vol. 3). Iarc.
- Jeha, S., et al., (2019). Improved CNS control of childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. *Journal of Clinical Oncology*, 37(35), 3377–3391. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.0169>
- Kalinova, M., et al., (2024). Molecular Screening in Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma: Anaplastic Lymphoma Kinase Analysis, Next-Generation Sequencing Fusion Gene Detection, and T-Cell Receptor Immunoprofiling. *Modern Pathology*, 37(3). <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2024.100428>
- Kelm, M., et al., (2023). Dominant T-cell Receptor Delta Rearrangements in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: Leukemic Markers or Physiological $\gamma\delta$ T Repertoire? *HemaSphere*, 7(9), 948. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000948>

- Kidd, M. J., et al., (2012). The inference of phased haplotypes for the immunoglobulin H chain V region gene loci by analysis of VDJ gene rearrangements. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1333–1340. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102097>
- Kitchingman, G. R., et al., (1986). *Biologic and prognostic significance of the presence of more than two mu heavy-chain genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of B precursor cell origin*. <https://doi.org/10.1182/blood.V67.3.698.698>
- Klocperk, A., et al., (2023). B cell phenotype and serum levels of interferons, BAFF, and APRIL in multisystem inflammatory syndrome in children associated with COVID-19 (MIS-C). *Molecular and Cellular Pediatrics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40348-023-00169-z>
- Kneba, M., et al., (1995). Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood*, 86(10), 3930–3937. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.10.3930.bloodjournal86103930>
- Knecht, H., et al., (2019). Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS. *Leukemia*, 33(9), 2254–2265. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0499-4>
- Knight, K. L., & Crane, M. A. (1994). Generating the antibody repertoire in rabbit. *Advances in Immunology*, 56, 179–218. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60452-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60452-6)
- Koshy, M., et al., (2016). Improved survival time trends in Hodgkin’s lymphoma. *Cancer Medicine*, 5(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1002/cam4.655>
- Kotrova, M., et al., (2024). The gray area of RQ-PCR-based measurable residual disease: subdividing the “positive, below quantitative range” category. *Leukemia*, 38(7), 1670–1620. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02265-z>
- Kotrova, M., et al., (2018). The IG/TR next generation marker screening developed within euroclonality-NGS consortium is successful in 94% of acute lymphoblastic leukemia samples. *Blood*, 132, 2830. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112828>
- Kotrová, M., et al., (2022). Prognostic value of low-level MRD in adult acute lymphoblastic leukemia detected by low-and high-throughput methods. *Blood Advances*, 6(10), 3006–3010. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006727>

- Kotrova, M., et al., (2015). The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*, 126(8), 1045–1047. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655159>
- Kotrova, M., et al., (2014). Next Generation Amplicon Sequencing of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements for Minimal Residual Disease (MRD) Stratification in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): A Comparison with Classical qPCR-Based Technique. *Blood*, 124(21), 2395. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.2395.2395>
- Kotrova, M., et al., (2017). Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. *Bone Marrow Transplantation*, 52(7), 962–968. <https://doi.org/10.1038/bmt.2017.16>
- Kowarsch, F., et al., (2024). FCM marker importance for MRD assessment in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An AIEOP-BFM-ALL-FLOW study group report. *Cytometry Part A*, 105(1), 24–35. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24805>
- Kraj, P., et al., (1997). The human heavy chain Ig V region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *Journal of Immunology*, 158(12), 5824–5832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.158.12.5824>
- Kuiper, R. P., et al., (2021). Minimal residual disease (MRD) detection in acute lymphoblastic leukaemia based on fusion genes and genomic deletions: towards MRD for all. *British Journal of Haematology*, 194(5), 888–892. <https://doi.org/10.1111/bjh.17744>
- Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrc2542>
- Küppers, R., Engert, A., & Hansmann, M.-L. (2012). Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3439–3447. <https://doi.org/10.1172/JCI61245>
- Küppers, R., et al., (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 341(20), 1520–1529. <https://doi.org/10.1056/NEJM199911113412007>
- Kuziel, W. A., et al., (1987). Regulation of T-cell receptor γ -chain RNA expression in murine Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Nature*, 328(6127), 263–266. <https://doi.org/10.1038/328263a0>

- Lam, K.-P., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, *90*(6), 1073–1083. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80373-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80373-6)
- Langerak, A. W., et al., (2017). High-throughput immunogenetics for clinical and research applications in immunohematology: potential and challenges. *The Journal of Immunology*, *198*(10), 3765–3774. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602050>
- Langerak, A. W., et al., (2007). Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *21*(2), 222–229. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404482>
- Langerak, A. W., et al., (1997). Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*, *11*(12), 2192–2199. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400887>
- Langlands, K., et al., (1993). Clonal selection in acute lymphoblastic leukaemia demonstrated by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain and T-cell receptor delta chain rearrangements. *Leukemia*, *7*(7), 1066–1070.
- Lawrence, B., et al., (2000). TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *The American Journal of Pathology*, *157*(2), 377–384. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64550-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64550-6)
- Levine, P. H., et al., (1971). Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer*, *27*(2), 416–421. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w)
- Li, Z., et al., (2020). Identifying IGH disease clones for MRD monitoring in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia using RNA-Seq. *Leukemia*, *34*(9), 2418–2429. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0774-4>
- Malcolm, S., et al., (1982). Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(16), 4957–4961. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4957>
- Malcolm, T. I. M., et al., (2016). Anaplastic large cell lymphoma arises in thymocytes and requires transient TCR expression for thymic egress. *Nature Communications*, *7*(1), 10087. <https://doi.org/10.1038/ncomms10087>

- Matasar, M. J., & Zelenetz, A. D. (2008). Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiologic Clinics of North America*, 46(2), 175–198. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.03.005>
- Matsuda, F., et al., (1998). The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *Journal of Experimental Medicine*, 188(11), 2151–2162. <https://doi.org/10.1084/jem.188.11.2151>
- McBride, O. W., et al., (1982). Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *The Journal of Experimental Medicine*, 155(5), 1480–1490. <https://doi.org/10.1084/jem.155.5.1480>
- Meleshko, A. N., et al., (2006). The incidence of T-cell receptor gene rearrangements in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia is related to immunophenotype and fusion oncogene expression. *Leukemia Research*, 30(7), 795–800. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.11.007>
- Metzler, M., et al., (2008). Inv (11)(q21q23) fuses MLL to the Notch co-activator mastermind-like 2 in secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 22(9), 1807–1811. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.50>
- Milota, T., et al., (2023). Clinical Outcomes, Immunogenicity, and Safety of BNT162b2 Vaccine in Primary Antibody Deficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 11(1), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.10.046>
- Mora, J., et al., (2000). Large cell non-Hodgkin lymphoma of childhood: analysis of 78 consecutive patients enrolled in 2 consecutive protocols at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *Cancer*, 88(1), 186–197. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(20000101\)88:1<186::aid-cnrc26>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(20000101)88:1<186::aid-cnrc26>3.0.co;2-5)
- Mullighan, C. G., et al., (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446(7137), 758–764. <https://doi.org/10.1038/nature05690>
- Munir, A. H., & Khan, M. I. (2019). Pattern of basic hematological parameters in acute and chronic leukemias. *Journal of Medical Sciences*, 27(2), 125–129.
- Nakagawa, A., et al., (1997). CD30-positive anaplastic large cell lymphoma in childhood: expression of p80npm/alk and absence of Epstein-Barr virus. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 10(3), 210–215.

- Nussenzweig, A., et al., (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V (D) J recombination. *Nature*, 382(6591), 551–555. <https://doi.org/10.1038/382551a0>
- Öfverholm, I., et al., (2013). Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia*, 27(9), 1936–1939. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.92>
- Ouyang, H., et al., (1997). Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(6), 921–929. <https://doi.org/10.1084/jem.186.6.921>
- Peham, M., et al., (2004). Clonal variation of the immunogenotype in relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia indicates subclone formation during early stages of leukemia development. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 39(2), 156–160. <https://doi.org/10.1002/gcc.10305>
- Pieters, R., et al., (2016). Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: study ALL10 from the Dutch Childhood Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 34(22), 2591–2601. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.6364>
- Pomari, E., et al., (2017). NPM-ALK expression levels identify two distinct subtypes of paediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, 31(2), 498–501. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.292>
- Pongers-Willemse, M. J., et al., (1999). Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13(1), 110–118. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401245>
- Pui, C.-H. (2000). Acute lymphoblastic leukemia in children. *Current Opinion in Oncology*, 12(1), 3–12. <https://doi.org/10.1097/00001622-200001000-00002>
- Pui, C.-H., & Campana, D. (2007). Age-related differences in leukemia biology and prognosis: the paradigm of MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 21(4), 593–594. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404598>
- Pui, C.-H., et al., (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology*, 29(5), 551–565. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.7405>

- Pui, C.-H., & Evans, W. E. (1998). Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *339*(9), 605–615. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390907>
- Pulsipher, M. A., et al., (2022). Next-generation sequencing of minimal residual disease for predicting relapse after tisagenlecleucel in children and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Discovery*, *3*(1), 66–81. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0095>
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, *381*(6585), 751–758. <https://doi.org/10.1038/381751a0>
- Rao, S. P., et al., (1999). Biased VH gene usage in early lineage human B cells: evidence for preferential Ig gene rearrangement in the absence of selection. *The Journal of Immunology*, *163*(5), 2732–2740. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.5.2732>
- Rasche, M., et al., (2018). Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia*, *32*(10), 2167–2177. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0071-7>
- Reynaud, C.-A., et al., (1994). Formation of the Chicken B-Cell Repertoire: Ontogenesis, Regulation of Ig Gene Rearrangement, and Diversification by Gene Conversion. In F. J. Dixon (Ed.), *Advances in Immunology* *57*, 353–378. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60676-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60676-8)
- Reynaud, C.-A., et al., (1991). Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell*, *64*(5), 995–1005. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90323-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90323-Q)
- Roll, J. D., & Reuther, G. W. (2010). CRLF2 and JAK2 in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a novel association in oncogenesis. *Cancer Research*, *70*(19), 7347–7352. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1528>
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2016). Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *127*(25), 3127–3132. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-635219>
- Rubnitz, J. E., et al., (1999). Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t (11; 19)(q23; p13. 3) translocation. *Journal of Clinical Oncology*, *17*(1), 191. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.1.191>

- Rubnitz, J. E., Pui, C. H., & Downing, J. R. (1999). The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia*, *13*(1), 6–13. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401258>
- Scheijen, B., et al., (2019). Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical feasibility study by EuroClonality-NGS. *Leukemia*, *33*(9), 2227–2240. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0508-7>
- Shanbhag, S., & Ambinder, R. F. (2018). Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(2), 116–132. <https://doi.org/10.3322/caac.21438>
- Slamova, L., et al., (2014). CD2-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to the monocytic lineage. *Leukemia*, *28*(3), 609–620. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.354>
- Smithies, O. (1967). The genetic basis of antibody variability. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *32*, 161–168. <https://doi.org/10.1101/SQB.1967.032.01.023>
- Spits, H., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1995). Development of human T and natural killer cells. *Blood*, *85*(10), 2654–2670. <https://doi.org/10.1182/blood.V85.10.2654.bloodjournal85102654>
- Stabellini, N., et al., (2023). Sex differences in adults with acute myeloid leukemia and the impact of sex on overall survival. *Cancer Medicine*, *12*(6), 6711–6721. <https://doi.org/10.1002/cam4.5461>
- Stein, H., et al., (2000). CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*, *96*(12), 3681–3695. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.12.3681>
- Stein, H., et al., (1985). The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*, *4*(66), 848–858. <https://doi.org/10.1182/blood.V66.4.848.848>
- Steinemann, D., et al., (2024). Genetic alterations in lymphoblastic leukaemia/lymphoma—a practical guide to WHO HAEM5. *Medizinische Genetik*, *36*(1), 39–45. <https://doi.org/10.1515/medgen-2024-2007>

- Stevenson, F. K., Forconi, F., & Kipps, T. J. (2021). Exploring the pathways to chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *138*(10), 827–835. <https://doi.org/10.1182/blood.2020010029>
- Stingl, G., et al., (1987). Thy-1+ dendritic epidermal cells express T3 antigen and the T-cell receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(13), 4586–4590. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4586>
- Svaton, M., et al.,(2023). NGS better discriminates true MRD positivity for the risk stratification of childhood ALL treated on an MRD-based protocol. *Blood*, *141*(5), 529–533. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017003>
- Swerdlow, S. H., et al., (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Szczepański, T., et al., (1999). Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, *13*(2), 196–205. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401277>
- Teng, G., & Papavasiliou, F. N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual Review of Genetics*, *41*(1), 107–120. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130340>
- Theunissen, P., et al., Consortium, on behalf of the E. (2017). Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *129*(3), 347–357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, *302*(5909), 575–581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>
- Tsakou, E., et al., (2012). Partial versus productive immunoglobulin heavy locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia: implications for B-cell receptor stereotypy. *Molecular Medicine*, *18*, 138–145. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00216>
- Turner, S. D., et al., (2007). The NPM-ALK tyrosine kinase mimics TCR signalling pathways, inducing NFAT and AP-1 by RAS-dependent mechanisms. *Cellular Signalling*, *19*(4), 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.09.007>

- Vadillo, E., et al., (2018). T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): new insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. *Blood Reviews*, 32(1), 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.006>
- Van den Brand, M., et al., (2023). EuroClonality-NGS recommendations for evaluation of B-cell clonality analysis by next-generation sequencing: a structured approach with the DEPART algorithm. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 25(10), 729–739. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.06.011>
- Van der Velden, V. H. J., et al., (2004). TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia*, 18(12), 1971–1980. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403505>
- Van der Velden, V. H. J., et al., (2007). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21(4), 604–611. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404586>
- Van der Velden, V. H. J., et al., (2024). Analysis of measurable residual disease by IG/TR gene rearrangements: quality assurance and updated EuroMRD guidelines. *Leukemia*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02272-0>
- Van der Velden, V. H. J., et al., (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6), 1013–1034. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402922>
- Van der Velden, V. H. J., et al., (2007). Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*, 21(4), 706–713. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404535>
- Van der Velden, V. H. J., & van Dongen, J. J. M. (2009). MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Leukemia: Methods and Protocols*, 115–150. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-418-6_7
- Van der Velden, V. H. J., Wijkhuijs, J. M., & Van Dongen, J. J. M. (2008). Non-specific amplification of patient-specific Ig/TCR gene rearrangements depends on the time point during therapy: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*, 22(3), 641–644. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404925>

- Van der Velden, V. H. J., et al., (2002). Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*, *16*(5), 928–936. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402475>
- Van Dongen, J. J. M., et al., (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, *17*(12), 2257–2317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
- Venn, N. C., et al., (2012). Highly sensitive MRD tests for ALL based on the IKZF1 Δ 3–6 microdeletion. *Leukemia*, *26*(6), 1414–1416. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.348>
- Weill, J.-C., & Reynaud, C.-A. (1996). Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunology Today*, *17*(2), 92–97. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)80586-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)80586-X)
- Wood, B., et al., (2018). Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood*, *131*(12), 1350–1359. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806521>
- Wu, T. Te, & Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine*, *132*(2), 211–250. <https://doi.org/10.1084/jem.132.2.211>
- Yamada, M., et al., (1991). Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *173*(2), 395–407. <https://doi.org/10.1084/jem.173.2.395>
- Zuna, J., et al., (2007). Childhood secondary ALL after ALL treatment. *Leukemia*, *21*(7), 1431–1435. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404718>
- Zuna, J., et al., (2022). Minimal residual disease in BCR::ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia: different significance in typical ALL and in CML-like disease. *Leukemia*, *36*(12), 2793–2801. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01668-0>

11 Přílohy