

A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában

Fésüs Viktória¹ ■ Marosvári Dóra dr.¹ ■ Kajtár Béla dr.²
 Király Péter Attila dr.¹ ■ Demeter Judit dr.³ ■ Gurbity Pálfi Tímea dr.⁴
 Egyed Miklós dr.⁵ ■ Plander Márk dr.⁶ ■ Farkas Péter dr.⁷
 Mátrai Zoltán dr.⁸ ■ Matolcsy András dr.¹ ■ Bödör Csaba dr.¹

¹Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

²Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Pécs

³Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Belgyógyászati Klinika, Budapest

⁴Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Szeged

⁵Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórház, Kaposvár

⁶Markusovszky Egyetemi Oktató Kórház, Szombathely

⁷Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, III. Belgyógyászati Klinika, Budapest

⁸Egysített Szent István és Szent László Kórház, Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály, Budapest

Bevezetés: Az elmúlt években jelentős előrelépések történtek a krónikus lymphocytás leukaemia kezelésében, ugyanis az új innovatív gyógyszerek a TP53-defektus hordozó csoportban is hatékonyak bizonyultak. Ezen betegek maradéktalan azonosításához elengedhetetlen a TP53-defektus mindkét formájának (17p-deletio és TP53-mutációk) vizsgálata. A TP53-mutációk vizsgálata ma a nemzetközi ajánlások részét képezi, segítséget nyújtva az optimális terápiás stratégia megalkotásában. **Célkitűzés:** Jelen tanulmány célja a TP53-mutációk előfordulásának és a 17p-deletiohoz való viszonyának meghatározása, valamint a mutációk rutindiagnosztikus kimutatására alkalmas szekvenálási eljárás beállítása volt. **Módszer:** A mutációanalízist Sanger-szekvenálással végeztük el 196, krónikus lymphocytás leukaemiában szenvedő beteg esetében. **Eredmények:** A betegek 15,8%-ában azonosítottunk TP53-mutációt, ami az esetek felében 17p-deletio nélkül fordult elő. A TP53-defektus mindkét formájának vizsgálatával összesen a betegek 25,4%-ánál azonosítottunk TP53-defektust. **Következtetések:** A mutációanalízis elvégzésével további 10% magas rizikójú beteg azonosítható, akik számára a legjobb választást az ebben a betegcsoportban is hatékony új célzott terápiák jelentik. *Orv. Hetil., 2017, 158(6), 220–228.*

Kulcsszavak: krónikus lymphocytás leukaemia, TP53, célzott terápia

TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia

Introduction: In recent years much progress has been made in the therapy of chronic lymphocytic leukaemia, as the new innovative medicine proved to be effective in managing patients carrying TP53 abnormalities. To identify all these patients, it is essential to screen for both forms of TP53 defects, including both 17p deletions and TP53 mutations. **Aim:** The aim of this study was to determine the frequency of TP53 mutations and their association with 17p deletions in a large Hungarian cohort of 196 patients suffering from chronic lymphocytic leukaemia. **Method:** We performed mutation analysis of TP53 (exons 3–10) using Sanger sequencing. **Results:** TP53 mutations were present in 15.8% of patients, half of which were associated with 17p deletion. By analysing both forms, TP53 defect was identified in 25.4% of the patients. **Conclusions:** Our study demonstrates that by performing a TP53 mutation analysis, an additional 10% of high-risk patients can be detected.

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia, TP53, targeted therapy

Fésüs, V., Marosvári, D., Kajtár, B., Király, P. A., Demeter, J., Gurbity Pálfi, T., Egyed, M., Plander, M., Farkas, P., Mátrai, Z., Matolcsy, A., Bödör, Cs. [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia]. *Orv. Hetil., 2017, 158(6), 220–228.*

(Beérkezett: 2016. november 3.; elfogadva: 2016. november 30.)

A tumorprotein p53 (TP53) a legfontosabb humán tumorsuppresszor fehérje, amelyben az első mutációkat 1989-ben írták le tüdő- [1] és colorectalis daganatokban [2]. A TP53 fehérje számos jelátviteli út szabályozásával központi szerepet tölt be a DNS-károsodásra adott válasz koordinálásában és a daganatképződés megakadályozásában (1. ábra). Funkciója, jellemzően rossz prognózzal társulva, a szolid tumorok több mint 50%-ában károsodik, így a humán daganatokban leggyakrabban érintett génként tartjuk számon [3, 4]. Bár a hematológiai daganatok esetén ritkábban, mintegy 20%-ban fordul elő TP53-diszfunkció, megjelenése szoros összefüggést mutat a rövid túléléssel, transzformációval és kemorezisztenciával, különösen krónikus lymphocytás leukaemia (CLL) esetében [5].

A CLL a leggyakoribb felnőttkori leukaemia a nyugati országokban, Magyarországon az incidenciája 3–5/100 000 lakos/év, ami az összes leukaemia mintegy 25–30%-át teszi ki. A kórképet heterogén klinikai megjelenés jellemzi, míg a betegek egy része éveken nem igényel kezelést, az esetek közel egyharmadában agresszív lefolyás, gyakori relapsus, kemorezisztencia és rövid túlélés jellemző [6]. Dacára a technológia soha nem látott fejlődési ütemének, a CLL továbbra is gyógyíthatatlan betegség. Az elmúlt években a kedvezőtlen prognózis hátterében az új generációs szekvenálás (NGS) segítségével több gén mutációja is azonosításra került, amelyek közül kiemelt jelentőséggel bírnak a TP53 gént érintő genetikai eltérések [7–10]. Bár CLL-ben az első TP53-mutációkat és azok összefüggését a kedvezőtlen kimenetellel már 1991-ben leírták, prognosztikai jelentőségükre és a betegek rövidebb túlélésével való szoros összefüggésre az új NGS-tanulmányok világítottak rá ismét [8, 11, 12]. A TP53-defektust hordozó betegeket kemo-, illetve kemo-immuno terápiával kezelve a terápiás válasz alacsony, esetükben komplett remisszió (CR) alig érhető el, a progressziómentes túlélés (PFS) egy-két év, míg a teljes túlélés (OS) mindössze két-három év [13, 14]. A TP53-defektus patogén voltát a betegség lefolyása során bizonyítja, hogy gyakorisága a diagnóziskori 5–10%-ról a kemorezisztens esetekben 40%-ra [13], míg Richter-szindróma esetén 60%-ra nő [15].

Az elmúlt években jelentős előrelépés történt a CLL kezelésében: az újonnan megjelent innovatív gyógyszerek (tirozinkináz-inhibitorok, Bcl-2-inhibitorok) a legkedvezőtlenebb prognózzal bíró TP53-deficiens betegcsoport esetében is hatékonyak bizonyultak [16–18], ezért mára kiemelten fontossá vált a TP53-státusz vizsgálata. A TP53-mutációkat hordozó betegek túlélése megegyezik a 17p-deletiót hordozókéval, ezért az irodalomban a két laesio együtt TP53-defektus néven szerepel [14, 19, 20]. A defektus két formája gyakran fordul elő együtt, ebben az esetben az egyik allélon deletio, míg a másik allélon mutáció figyelhető meg (2. ábra). Míg a 17p-deletiót közel 80%-ban kísérheti TP53-mutáció [21], addig a mutációk gyakrabban (mintegy 50%-ban) fordulnak elő deletio nélkül [22]. Az optimális terápiás

stratégia megválasztása szempontjából jelenleg a TP53-státusz a legfontosabb prognosztikai marker, amelynek pontos meghatározásához a TP53-mutációt 17p-deletio nélkül hordozó betegek azonosítása is elengedhetetlen. A TP53-mutációk kimutatására az Európai LeukemiaNet CLL munkacsoportja (European Research Initiative on CLL – ERIC) által közölt nemzetközi ajánlás alapján a Sanger-szekvenálással történő mutációanalízis alkalmazandó [23], azonban szemben a 17p-deletio kimutatására alkalmas fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerével, ez az eljárás hazánkban mindaddig nem volt elérhető.

Munkánk célja Magyarországon elsőként a TP53-mutációk rutindiagnosztikus kimutatására alkalmas szekvenálási eljárás beállítása volt, amelynek segítségével meghatároztuk a TP53-mutációk előfordulását egy nagyszámú hazai CLL-es betegpopuláción.

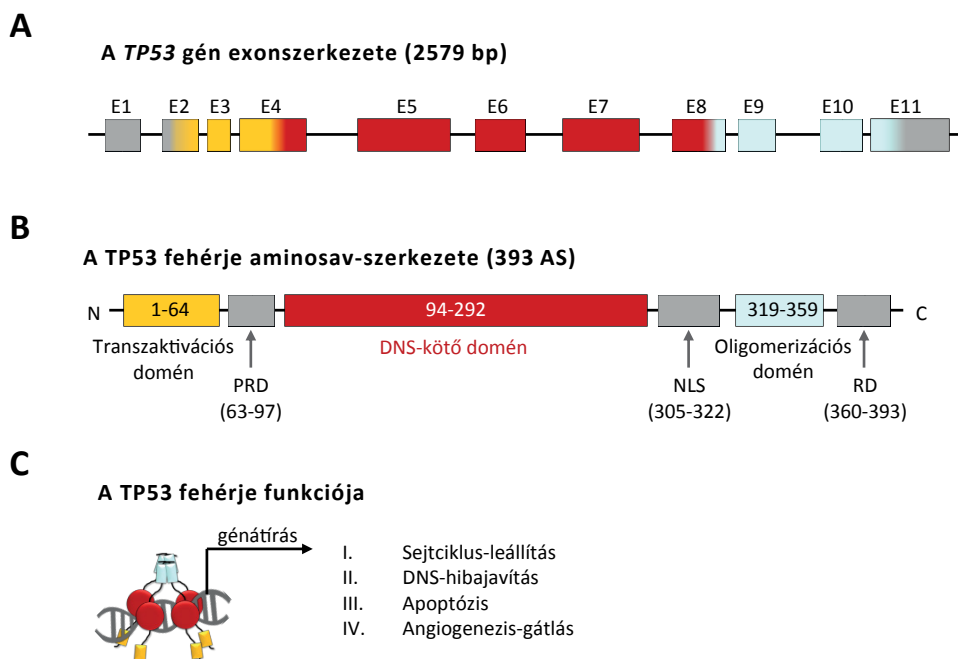
Módszer

A TP53-mutációk gyakoriságának meghatározásához hazai CLL-es betegek archivált DNS-mintáit vizsgáltuk. A betegség diagnózisa a Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében 1994–2016 kö-

1. táblázat | Klinikai és biológiai paraméterek

Paraméter	Betegszám (n = 196)	%
Nem		
Nő	75	38%
Férfi	121	62%
Életkor		
<60	50	26%
60–69	73	37%
70–79	53	27%
80+	20	10%
Átlagéletkor	66,4	
Kezelés		
Igényelt	128	65%
Nem igényelt	10	5%
NA	58	30%
CD38		
Pozitív	67	34%
Negatív	43	22%
NA	86	44%
del17p		
Van	21	11%
Nincs	121	62%
NA	54	27%

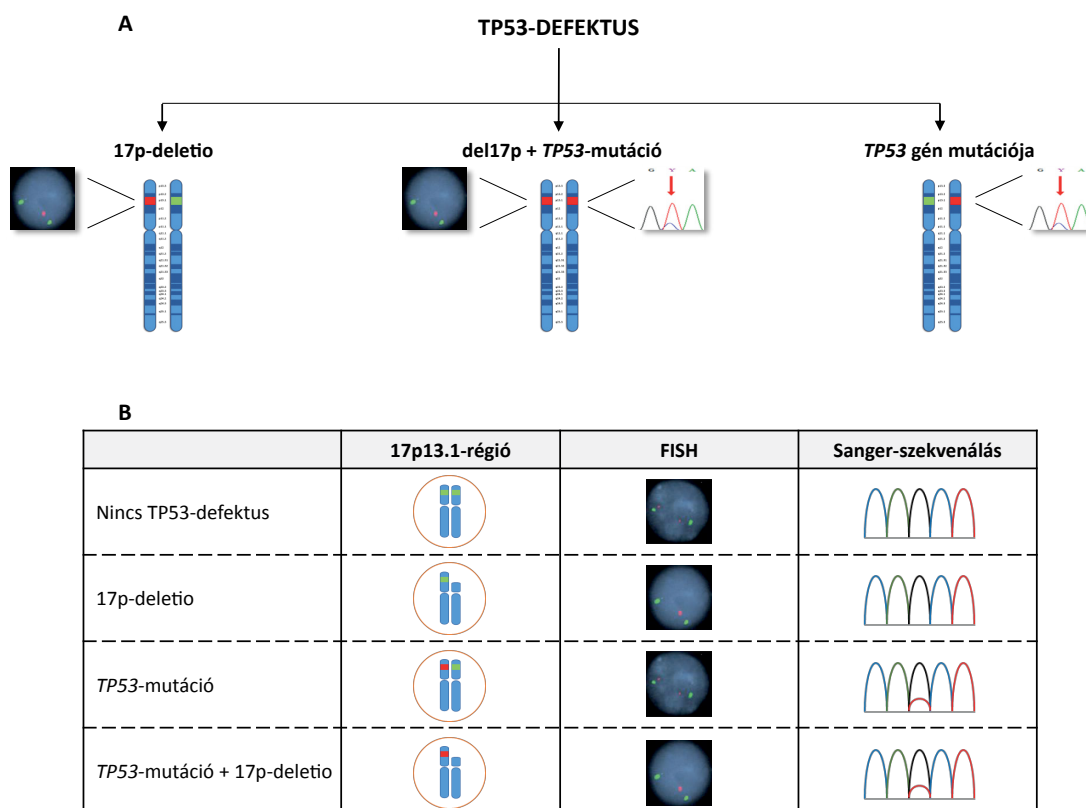
NA = nincs adat.



1. ábra

A TP53 gén szerkezete és a TP53 fehérje működése. (A) A TP53 gén (ENST00000269305) 11 exonból (2579 bázispár) áll, amelyek közül a 2–11-es exonok felelősek a fehérje kódolásáért. (B) A TP53 fehérje legfontosabb funkcionális egységei a DNS-kötő domén (piros), a tetramerizálódásért felelős oligomerizációs domén (kék) és a transzkripció faktorok megkötésében szerepet játszó transzaktivációs domén (sárga). (C) A TP53 DNS-kötéshez kapcsoltan kifejtett négy fő jelátviteli útvonalat érintő úgynevezett transzaktivációs hatásai közé tartozik a sejtciklus leállítása, a DNS-hibajavítás beindítása, az apoptózis szabályozása és az angiogenesis gátlása

AS = aminosav; bp = bázispár; NLS = nukleáris lokalizációs szignál; PRD = prolinban gazdag domén; RD = regulációs domén



2. ábra

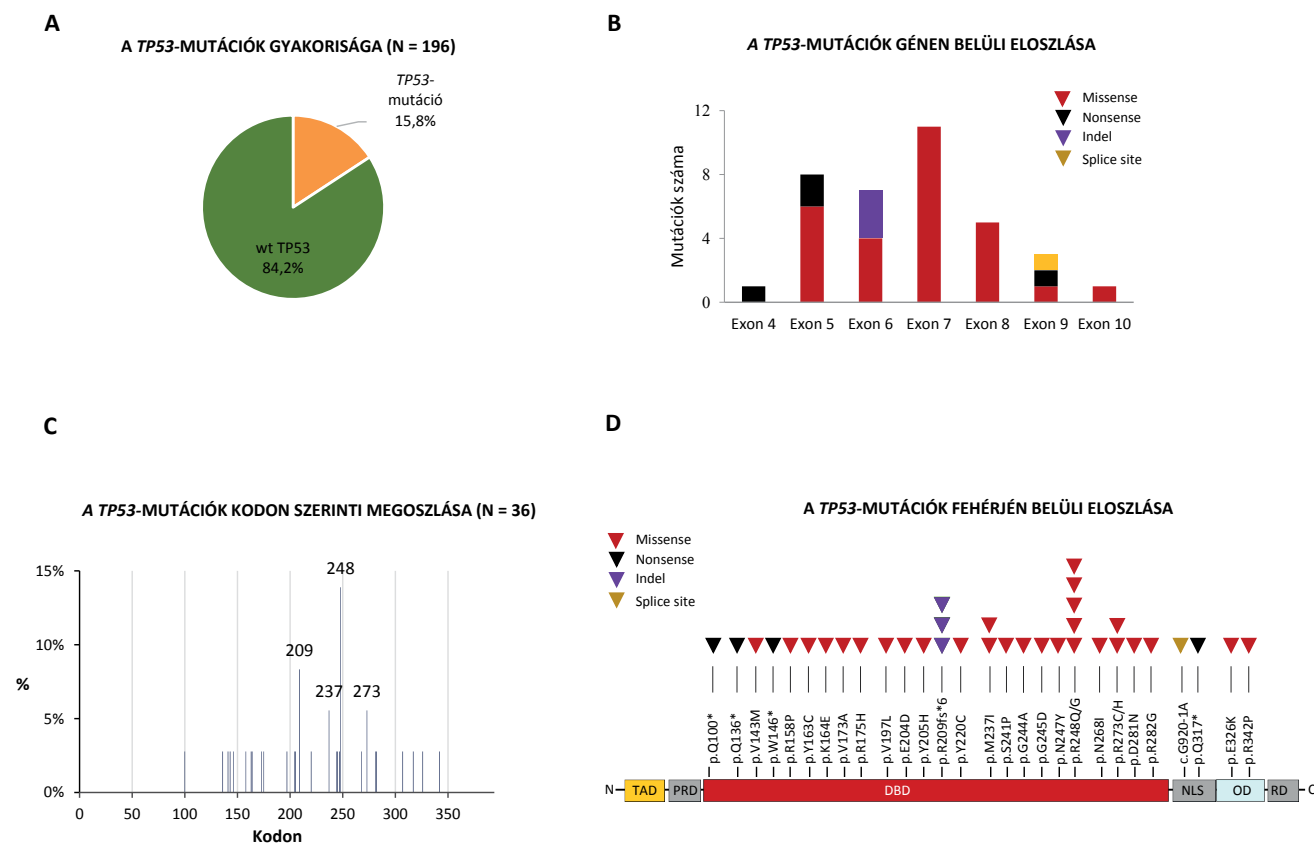
A TP53-defektus megjelenési formái és a kimutatásukra alkalmazott vizsgálómódszerek. (A) A TP53-defektus létrejöhet 17p-deletiával, TP53-mutációval, valamint a két eltérés előfordulhat együtt is; ekkor az egyik allél deletált, míg a másik allélon mutáció található. A TP53-mutáció szekvenálással, míg a 17p-deletio fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) detektálható. A B ábrán a TP53-defektus egyes formáinak kimutatása során alkalmazott vizsgálati módszerek szemléletes megjelenítése látható

zött, az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization – WHO) kritériumai szerint történt [24]. Százkilencvenhat beteg genomális DNS-mintáját vizsgáltuk meg, amelyek közül 18 nyirokcsomóból, 19 csontvelőből, 159 perifériás vérből származott. A klinikai és biológiai paraméterek megoszlása az 1. táblázatban látható. Ötvenkilenc beteg esetében a mintavétel a diagnózis idején, 133 betegnél előrehaladottabb stádiumban (aktivitás/relapsus/terápiarezisztencia), négy esetben Richter-transzformáció során történt. A DNS kivonása a mononukleáris sejtfrakció ficoll-lal történő szeparációját követően High Pure PCR template purification kit (Roche) segítségével történt, a gyártó utasításainak megfelelően. Az ERIC által közölt ajánlás alapján a TP53-mutációk kimutatását a gén DNS-kötő doménját kódoló régiójának (4–9-es exonok) polimeráz lánreakcióval (PCR) való amplifikációját követő direkt Sanger-szekvenálással végeztük el [23]. Ezenfelül elvégeztük a 3-as és 10-es exonok szekvenálását is, kibővítvé a nemzetközi ajánlást. Az eredmények kiértékelésekor kizárólag az aminosavsorrend megváltozását eredményező úgynevezett missense, nonsense és frameshift mutációkat vettük figyelembe, a daganatokban előforduló szomatikus mutációkat tartalmazó COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), valamint a TP53-mutációkat tartalmazó IARC (International Agency for Research on Cancer, <http://p53.iarc.fr/>) adatbázisok alapján.

Eredmények

A TP53-mutációk gyakorisága, típusa, génen belüli eloszlása

A TP53-mutációk gyakoriságának meghatározásához 196 CLL-es beteg esetén végeztük el a mutációanalízist. A betegek 15,8%-ában (31/196) azonosítottunk mutációt a TP53 gén valamely szakaszában, öt beteg esetében két különböző mutációt is kimutattunk (3. A ábra és 2. táblázat). A mutációk típusa és génen belüli eloszlása a 3. ábrán látható. A mutációk döntő többsége aminosavcserét eredményező missense mutáció volt (77,8%), ezt gyakoriságban a stop kodont eredményező nonsense mutációk (11,1%) és a leolvasási keret eltolódásával járó frameshift mutációk (8,3%) követték, legritkábban a splice mutáció (2,8%) fordult elő (3. B ábra). A mutációk génen belüli eloszlását vizsgálva 88,9%-ban a DNS-kötő régióban (exon 4–8) helyezkedtek el, gyakran (15/36) érintve a jól ismert szubsztitúciók (R175, Y220, G245, R248, R273 és R282) és inszerciók/deletiók



3. ábra

A TP53-mutációk gyakorisága és eloszlása az általunk vizsgált betegpopulációban. (A) A betegek 15,8%-ában azonosítottunk mutációt a TP53 génben. (B) A TP53-mutációk exon szerinti megoszlása. A mutációk 88,9%-a a DNS-kötő domént kódoló régióban helyezkedtek el (exon 4–8), többnyire missense mutáció formájában. (C) A TP53-mutációk kodon szerinti megoszlása. A leggyakrabban érintett aminosavak a 209-es, 237-es, 248-as és 273-as pozícióban találhatóak. Klasszikus mutációs forrópontokra, mint 175, 209, 220, 245, 248, 273, 282 és 342, a mutációk 42%-a (15/36) esett. (D) A TP53-mutációk a fehérjén belül döntően a DNS-kötő doménban helyezkedtek el

2. táblázat | A tanulmányunkban azonosított TP53-mutációk paraméterei

Sorszám	Exon	cDNS-pozíció	Aminosav-pozíció	COSMIC-azonosító	Mutáció típusa	Domén	Hatás (IARC)
1.	Exon 4	c.298C>T	p.Q100*	COSM44032	nonsense	DBD	Ismeretlen
2.	Exon 5	c.406C>T	p.Q136*	COSM11166	nonsense	DBD	Ismeretlen
3.	Exon 5	c.427G>A	p.V143M	COSM220754	missense	DBD	Káros
4.	Exon 5	c.437G>A	p.W146*	COSM43609	nonsense	DBD	Ismeretlen
5.	Exon 5	c.473G>C	p.R158P	COSM43615	missense	DBD	Káros
6.	Exon 5	c.488A>G	p.Y163C	COSM10808	missense	DBD	Káros
7.	Exon 5	c.490A>G	p.K164E	COSM10762	missense	DBD	Káros
8.	Exon 5	c.518T>C	p.V173A	COSM44327	missense	DBD	Káros
9.	Exon 5	c.524G>A	p.R175H	COSM10648	missense	DBD	Káros
10.	Exon 6	c.589G>C	p.V197L	COSM45265	missense	DBD	Káros
11.	Exon 6	c.612G>C	p.E204D	COSM984938	missense	DBD	Neutrális
12.	Exon 6	c.613T>C	p.Y205H	COSM43642	missense	DBD	Káros
13.	Exon 6	c.626_627delGA	p.R209fs*6	COSM13120	frameshift	DBD	Ismeretlen
14.	Exon 6	c.626_627delGA	p.R209fs*6	COSM13120	frameshift	DBD	Ismeretlen
15.	Exon 6	c.626_627delGA	p.R209fs*6	COSM13120	frameshift	DBD	Ismeretlen
16.	Exon 6	c.659A>G	p.Y220C	COSM10758	missense	DBD	Káros
17.	Exon 7	c.711G>A	p.M237I	COSM99648	missense	DBD	Káros
18.	Exon 7	c.711G>T	p.M237I	COSM11063	missense	DBD	Káros
19.	Exon 7	c.721T>C	p.S241P	COSM44578	missense	DBD	Káros
20.	Exon 7	c.731G>C	p.G244A	COSM12013	missense	DBD	Káros
21.	Exon 7	c.734G>A	p.G245D	COSM43606	missense	DBD	Káros
22.	Exon 7	c.739A>T	p.N247Y	COSM43864	missense	DBD	Káros
23.	Exon 7	c.742C>G	p.R248G	COSM11564	missense	DBD	Káros
24.	Exon 7	c.743G>A	p.R248Q	COSM10662	missense	DBD	Káros
25.	Exon 7	c.743G>A	p.R248Q	COSM10662	missense	DBD	Káros
26.	Exon 7	c.743G>A	p.R248Q	COSM10662	missense	DBD	Káros
27.	Exon 7	c.743G>A	p.R248Q	COSM10662	missense	DBD	Káros
28.	Exon 8	c.803A>T	p.N268I	COSM11817	missense	DBD	Káros
29.	Exon 8	c.817C>T	p.R273C	COSM10659	missense	DBD	Káros
30.	Exon 8	c.818G>A	p.R273H	COSM10660	missense	DBD	Káros
31.	Exon 8	c.841G>A	p.D281N	COSM43596	missense	DBD	Káros
32.	Exon 8	c.844C>G	p.R282G	COSM10992	missense	DBD	Káros
33.	Intron 8–9	c.920-1G>A	p.307	COSM6917	splice	NLS	Ismeretlen
34.	Exon 9	c.949C>T	p.Q317*	COSM10786	nonsense	NLS	Ismeretlen
35.	Exon 9	c.976G>A	p.E326K	COSM4271711	missense	OD	Káros
36.	Exon 10	c.1025G>C	p.R342P	COSM45276	missense	OD	Káros

IARC = International Agency for Research of Cancer; DBD = DNS-kötő domén; NLS = nukleáris lokalizációs szignál; OD = oligomerizációs domén. **Félkövér szedés:** ismert mutációs források.

(R209) forrásokot (3. C–D ábra). A betegség progressziójával nőtt a TP53-mutációk gyakorisága, míg diagnózisukor 6,8%-ban (4/59), addig előrehaladottabb stádiumban 18,7%-ban (25/133), Richter-transzformáció esetén 50%-ban (2/4) fordult elő TP53-mutáció. A különböző mintatípusok tekintetében a vizsgált perifériás vérminták 15,7%-ában (25/159), a nyirokcsomó-

minták 11,1%-ában (2/18), míg a csontvelőminták 21,1%-ában (4/19) mutattunk ki TP53-mutációt.

Mivel jelen retrospektív tanulmányunk fő célja a TP53-mutációk kimutatására alkalmas módszer beállítása volt, és a vizsgálati minták egy szelektálatlan, heterogén módon kezelt, úgynevezett historikus betegpopulációból származtak, részleteiben nem vizsgáltuk a TP53-mutá-

ciók összefüggéseit a klinikai adatokkal. Mindazonáltal a TP53-mutáns esetek döntő többségében (30/31) a betegség lefolyása klinikailag is agresszív volt. A 31 TP53-mutáns beteg közül mindössze egyetlen olyan beteget azonosítottunk, aki a 14 éves követési ideje alatt egyszer sem igényelt kezelést, aminek magyarázata lehet, hogy a beteg esetében azonosított TP53-mutáció (p.E204D) az IARC-adatbázis alapján nem okoz p53-diszfunkciót, annak ellenére, hogy a DNS-kötő régióban helyezkedik el [4].

A TP53-mutációk összefüggései a 17p-deletióval

A 196, általunk vizsgált betegből 142 esetben rendelkezünk FISH-adattal a 17p-régió deletióját illetően. A betegek 14,8%-ában (21/142) azonosítottunk 17p-deletiót, míg TP53-mutációt 20,4%-ában (29/142) (4. A ábra). A TP53-mutációk gyakran társultak 17p-deletióhoz, a deletiót hordozó betegek 66,7%-a (14/21) hordozott TP53-mutációt is. Klinikai szempontból jelentős, hogy az intakt 17p-vel rendelkező betegek 12,4%-ában (15/121) mutattunk ki TP53-mutációt, a mutációk tehát az esetek felében (15/29) 17p-deletio nélkül, egyedüli eltérésként fordulnak elő. A két vizsgálat eredményeit összegezve, a TP53-mutációk 42%-ban (15/36) önállóan állnak a TP53-defektus hátterében, további 39%-ban (14/36) 17p-deletióhoz társulva, míg a betegek 19%-ában (7/36) a 17p-deletio egyedüli eltérésként jelenik meg (4. B ábra). Összefoglalásul, a TP53-defektus mindkét formájának vizsgálatával összesen a betegek 25,4%-ánál (36/142) azonosítottunk TP53-defektust (4. A ábra), ami az esetek közel felében 17p-deletio nélkül megjelenő TP53-mutációkat jelent (4. B ábra).

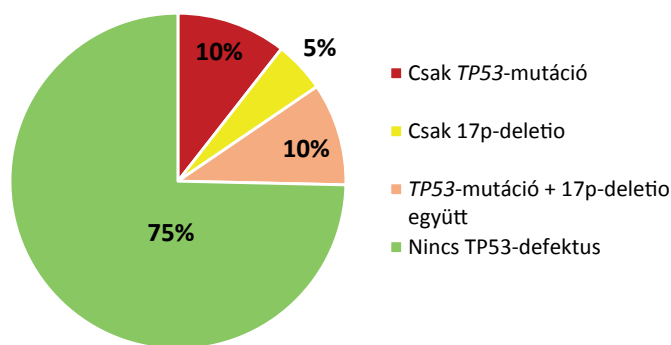
Megbeszélés

Jelen tanulmányunk célja a TP53-mutációk kimutatására alkalmas diagnosztikus eljárás beállítása és a mutációk gyakoriságának vizsgálata volt hazai betegcsoporton. A betegek 15,8%-ában azonosítottunk TP53-mutációt, ami az esetek felében 17p-deletio nélkül fordult elő. Utóbbi betegek megfelelő prognosztikai besorolásához szükséges a szekvenálással történő mutációanalízis integrálása a rutindiagnosztikába. Munkánk során az ehhez szükséges szekvenálási vizsgálatot laboratóriumunkban sikeresen beállítottuk és a hazai hematológiai centrumok számára elérhetővé tettük. A TP53-defektus valamely formáját hordozó betegek a Rossi és mtsai által megalkotott legújabb integrált prognosztikai modell alapján is a magas rizikójú csoportba sorolandók [12]. Jelen tanulmányban, a mutációanalízis elvégzésének köszönhetően, a FISH segítségével kimutatható 17p-deletiót mutató eseteken kívül további tizenöt, TP53-defektust hordozó beteget azonosítottunk, ami által a magas rizikójú betegek száma 71%-os növekedést mutatott (4. ábra).

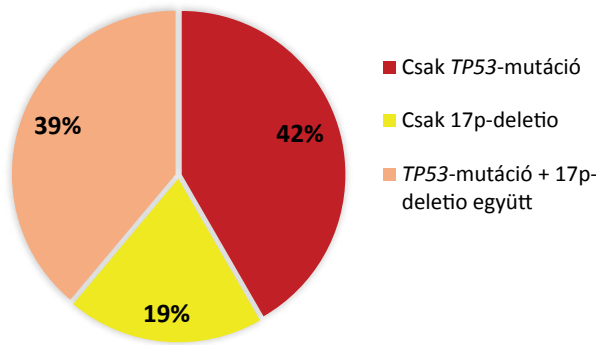
Bár a TP53-defektus egy erős, független, negatív prognosztikus marker, kezelési indikáció hiányában rutinszerű vizsgálata a betegség diagnózisakor mégsem ajánlott. Ahogy azt Rossi és Gaidano összefoglaló közleményükben megfogalmazták, diagnóziskori pozitív eredmény esetén a továbbra is legoptimálisabbnak bizonyuló, kezdeti „watch and wait” stratégiát felváltaná a „watch and worry”, így lerövidülne az első kezelésig eltelt idő [25]. A TP53-diszfunkció a DNS-károsító kemoterapeutikumokkal szemben szelektív előnyt jelent, ezért ilyen hatásmechanizmusú kezelést választva a CLL-ben jól ismert terápia indukálta klonális evolúció jön létre. Ennek során a TP53-mutációt hordozó szubklónok szelektációjára, majd expanziójára kerül sor, ami agresszív

B

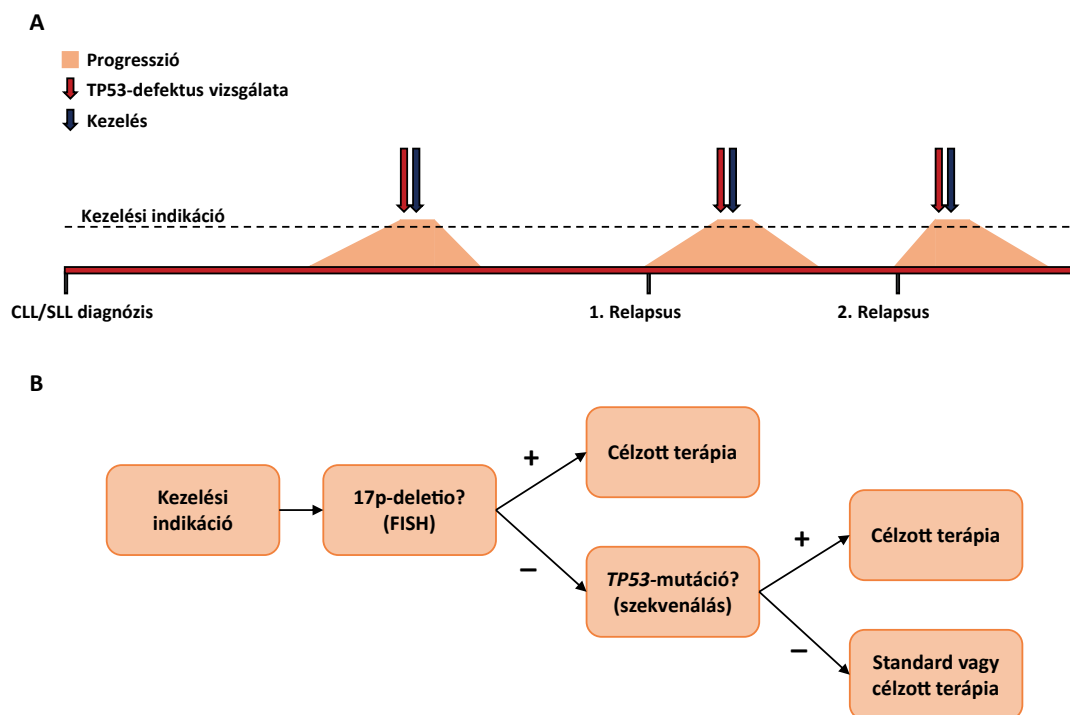
TP53-DEFEKTUSOK MEGOSZLÁSA
(N = 142)



A TP53-DEFEKTUS FORMÁI
(N = 36)



4. ábra | A TP53-defektus egyes formáinak előfordulása a hazai CLL-es betegpopulációban. (A) A TP53-defektus mindkét formájának vizsgálatával a betegek 25%-ában (36/142) azonosítottunk defektust. (B) Az összes TP53-defektus közel felében (42%; 15/36) a TP53-mutáció 17p-deletio nélkül fordult elő. Hasonlóan gyakori volt a két eltérés együttes előfordulása, míg a 17p-deletio önmagában ritkán fordult elő



5. ábra | A TP53-státusz vizsgálatának helye a klinikai gyakorlatban. (A) A TP53-státusz vizsgálatának ajánlott ideje a CLL lefolyása során. A vizsgálatot az első kezelés megkezdése előtt érdemes elvégezni, majd minden egyes kezelést igénylő relapsus alkalmával ismételni. (B) Az ábrán egy lehetséges diagnosztikus algoritmus látható a TP53-státusz vizsgálatához első vonalbeli kezelés előtt, valamint az ajánlott terápiás modalitások. Negatív FISH-vizsgálat után érdemes elvégezni a mutációanalízist, hogy a TP53-státusz korrekt ismerete hozzájáruljon a megfelelő terápiás döntéshez

3. táblázat | Nemzetközi ajánlások a TP53-státusz vizsgálatára

Ajánlás	Forrás	Év	Folyóirat	Mikor?	Mit?
IWCLL	Hallek, et al.	2008	Blood	Kezelés előtt	del17p
ERIC	Pospisilova, et al.	2012	Leukemia	Kezelés előtt	del17p és TP53-mutációk
BCSH	Oscier, et al.	2012	Br. J. Haematol.	Kezelés előtt	del17p és TP53-mutációk
NCCN	Zelenetz, et al.	2015	J. Natl. Compr. Canc. Netw.	Kezelés előtt	del17p és TP53-mutációk
ESMO	Eichhorst, et al.	2015	Ann. Oncol.	Kezelés előtt	del17p és TP53-mutációk

BCSH = British Committee for Standards in Haematology; ERIC = European Research Initiative on CLL; ESMO = European Society of Medical Oncology; IWCLL = International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, NCCN = National Comprehensive Cancer Network.

klínikai lefolyást eredményez [26]. Mindezek fényében a TP53-státusz vizsgálata nemcsak kezelési indikáció fennállásakor, a kezelés megkezdése előtt ajánlott, hanem ismétlődő minden egyes kezelést igénylő relapsus alkalmával (5. A ábra) [23, 27–30]. Az új ajánlások a TP53-defektust nemcsak a kemoimmunoterápia-rezisztenciát előre jelző biomarkerként, hanem a célzott terápia egyik indikációjaként is tartalmazzák [27, 31, 32]. TP53-defektus (17p-deletio/TP53-mutáció) esetén mind az úgynevezett 'go-go', mind a 'slow-go' betegeknél kerülendő a standard kemo-immunoterápia, ehelyett különböző célzott terápiás szerek (BTK-inhibitorok, PI3K-inhibitorok) választandók rituximabbal vagy a nélkül, lehetőleg már első vonalbeli kezelésként [33].

Az egyetlen, általunk azonosított indolens lefolyású TP53-mutációval rendelkező beteg jó példát szolgáltat

arra a megfigyelésre, hogy klinikailag nem minden TP53-mutáció egyenértékű, ezért érdemes körültekintően eljárni a pozitív eredmény megítélésekor. Tanulmányunkban kizárólag nemzetközi adatbázisok (IARC és COSMIC) alapján igazoltan klinikai relevanciával bíró mutációkat vettünk figyelembe, amelyek elsősorban DNS-kötő régiót kódoló génszakaszon (exon 4–9) elhelyezkedve a p53 fehérje DNS-kötő képességét vagy konformációját változtatják meg, amelynek következtében funkcióvesztéshez vezetnek.

A 3. táblázatban a TP53-defektus vizsgálatának ajánlott módját és idejét tartalmazó nemzetközi ajánlások (ERIC, ESMO, IWCLL, BCSH, NCCN) szerepelnek [23, 27–30]. Az irodalomban leírtak alapján a TP53-mutációk gyakrabban fordulnak elő, mint a 17p-deletio (3. táblázat), hasonló jelenség látható a hazai betegcsop-

portban is (29/142 versus 21/142). Mindezek alapján az agresszív lefolyás hátterét tisztázandó, illetve annak kialakulását megelőzendő ajánlott a mutációk irányába történő vizsgálat is [23, 32]. A TP53-mutációk gyakoriságát figyelembe véve a mutációanalízis nagyobb találati valószínűséggel azonosítja a TP53-defektust, mint a FISH-vizsgálat. Mégis, az utóbbi módszer régóta történő rutinszerű alkalmazására tekintettel, a mutációanalízis annak kiegészítéseként szerepel a TP53-státusz vizsgálatában (5. B ábra). A két eltérés prognosztikai egyenértékűségének köszönhetően az egyik vizsgálat pozitív eredményét követően gyakorlatilag nem szükséges a másik vizsgálatot is elvégezni, az ugyanis további érdemi információt nem szolgáltat. Mindazonáltal fontos szem előtt tartani az egyes vizsgálatok érzékenységét, ami a FISH esetében megközelítőleg 1%-ra tehető, míg a Sanger-szekvenálással elvégzett mutációanalízis esetében 20%-ra. Ebből kifolyólag, a vizsgálat sikeressége szempontjából kritikus a megfelelő tumorsejtarány megléte a vizsgálati mintában.

A p53-státusznak léteznek egyéb, ritkábban alkalmazott vizsgálómódszerei is. A p53-specifikus immunfestés és a TP53-defektus összefüggése a mindennapi rutin szempontjából felmerülő kérdés lehet. Míg a vad típusú p53 fehérje rövid fél életidejének köszönhetően immunhisztokémiai vizsgálattal nem detektálható, addig a TP53-mutáció rendszerint pozitív immunjelölődéshez vezet [34]. Ennek hátterében a hibás funkciójú fehérje megnövekedett fél életideje és akkumulációja áll. Meglepő módon néhány tanulmány beszámolt a 17p-deletio és a pozitív p53-immunfestés összefüggéséről is [35]. Ez a korreláció minden bizonnyal a másik allélon gyakran megjelenő TP53-mutációknak tulajdonítható, így a p53 immunhisztokémiai vizsgálat nem alkalmas a 17p-deletio megbízható kimutatására. Egy friss, több ezer eset vizsgálatán alapuló tanulmány a TP53-mutációk és p53 fehérje-expresszió összefüggésével kapcsolatban enyhe diszkrepanciára világít rá. *Murnyák és Hortobágyi* arról számolnak be, hogy az esetek mintegy 25%-ában a TP53-mutációk nem társulnak immunhisztokémiaileg kimutatható p53 fehérjeexpresszióval, ami álnegatív eredményhez vezethet [36]. Napjainkban az immunhisztokémiai analízis háttérbe szorult a vérből elvégezhető, ezáltal minimális beavatkozással járó vizsgálatokkal szemben, ám a viszonylag magas konkordancia miatt különösen a TP53-szekvenálási vizsgálattal nem rendelkező laboratóriumokban valós alternatívát jelenthet. Fontos ugyanakkor szem előtt tartani a p53 immunhisztokémiai vizsgálat limitációit, miszerint a mutációk nélkül előforduló 17p-deletiók kimutatására nem alkalmas, a TP53-mutációknak pedig mindössze 75%-át képes azonosítani. Szerencsére mára hazánkban a TP53-defektust közvetlen módon kimutató FISH és szekvenálás is elérhető vizsgálat.

A TP53-defektus egyéb hematológiai daganatokban szintén előfordul, átlagosan az esetek 10%-ában, a CLL-ben leírtakhoz hasonló prognosztikai szereppel. Leggyakrabban akut lymphoid leukaemiában (ALL-ben)

fordul elő, ennél a betegcsoportnál is csupán 20%-ban, ami jóval kevesebb a szolid tumoroknál tapasztalt közel 50%-nál [37]. Érdekes módon a TP53-defektus két formájának prognosztikai szerepe eltérő az egyes kórképek között: az önálló TP53-mutációk akut myeloid leukaemiában (AML), myelodysplasiás szindrómában (MDS) és CLL-ben, az önálló 17p-deletiók pedig CLL-ben és MDS-ben bírnak szignifikáns negatív hatással a túlélésre. A 17p-deletióval együtt megjelenő TP53-mutációk ALL-ben, AML-ben, CLL-ben és MDS-ben is azonos szignifikáns negatív hatást fejtenek ki a túlélésre [37].

Következtetések

Az utóbbi években a technológia fejlődésével CLL-ben nemcsak a legrosszabb prognózisú csoport egyre precízebb definiálására nyílt lehetőség, hanem annak kezelésében is nagy áttörések születtek. A kedvezőtlen prognózis hátterében az NGS alkalmazásával egyre több gén (*ATM*, *BIRC3*, *SF3B1*, *POT1*, *KRAS*) kerül azonosításra, amelyek klinikai relevanciája ma még kérdéses, ezért rutinszerű vizsgálatuk várat magára [7, 38, 39]. A személyre szabott terápia korszakában ma a legnagyobb kihívás a számos új gyógyszer (például ibrutinib, idelalisib, venetoclax) optimális alkalmazása, lehetőleg előre szelektált betegcsoporton, megfelelő kombinációban és ideig. Ehhez elengedhetetlen a molekuláris diagnosztika integrálása a mindennapi klinikai gyakorlatba, amelyhez az első lépcsőfok a TP53-státusz vizsgálatának kiterjesztése a TP53-mutációk detektálására, amivel további 10% magas kockázatú beteg azonosítható a teljes betegpopulációban. Az újonnan azonosított gének és a szubklónálisan jelen lévő genetikai laesiók szélesebb körű vizsgálata a következő évtized fő kihívása lesz. Mindez elvezethet majd egy NGS-alapú diagnosztika bevezetéséhez, amelynek segítségével a jövőben a már igazoltan releváns gének vizsgálata gyorsabban és költséghatékonyabban járulhat hozzá az optimális terápiastratégia megválasztásához és ezáltal a betegek hosszabb túléléséhez.

Anyagi támogatás: A közlemény az MTA Lendület program támogatásával készült.

Szerzői munkamegosztás: Valamennyi szerző részt vett a közlemény megírásában, valamint az irodalmi adatok feldolgozásában.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., et al.: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 1989, 246(4929), 491–494.
- [2] Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 1989, 244(4901), 217–221.

- [3] *Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., et al.*: p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, 253(5015), 49–53.
- [4] *Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., et al.*: TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.*, 2016, 37(9), 865–876.
- [5] *Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., et al.*: p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 1994, 84(9), 3148–3157.
- [6] *Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., et al.*: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2000, 343(26), 1910–1916.
- [7] *Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., et al.*: Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2016, 127(17), 2122–2230.
- [8] *Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., et al.*: Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2014, 123(14), 2139–2147.
- [9] *Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., et al.*: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 2011, 475(7354), 101–105.
- [10] *Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., et al.*: Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.*, 2012, 44(1), 47–52.
- [11] *Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J. Z., et al.*: p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88(12), 5413–5417.
- [12] *Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., et al.*: Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2013, 121(8), 1403–1412.
- [13] *Zenz, T., Hübner, S., Denzel, T., et al.*: Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53–p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*, 2009, 114(13), 2589–2597.
- [14] *Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., et al.*: TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28(29), 4473–4479.
- [15] *Chigrinova, E., Rinaldi, A., Kwee, I., et al.*: Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*, 2013, 122(15), 2673–2682.
- [16] *Farooqui, M. Z., Valdez, J., Martyr, S., et al.*: Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.*, 2015, 16(2), 169–176.
- [17] *Deeks, E. D.*: Venetoclax: First Global Approval. *Drugs*, 2016, 76(9), 979–987.
- [18] *Langerbeins, P., Bahlo, J., Rhein, C., et al.*: The CLL12 trial protocol: a placebo-controlled double-blind Phase III study of ibrutinib in the treatment of early-stage chronic lymphocytic leukemia patients with risk of early disease progression. *Future Oncol.*, 2015, 11(13), 1895–1903.
- [19] *Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., et al.*: Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*, 2014, 123(21), 3247–3254.
- [20] *Dicker, F., Herholz, H., Schnittger, S., et al.*: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 2009, 23(1), 117–124.
- [21] *Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., et al.*: TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, 2010, 24(12), 2072–2079.
- [22] *Lazarian, G., Tausch, E., Eclache, V., et al.*: TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int. J. Cancer*, 2016, 139(8), 1759–1763.
- [23] *Pospisilova, S., Gonzalez, D., Malcikova, J., et al.*: ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2012, 26(7), 1458–1461.
- [24] *Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., et al.*: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 2016, 127(20), 2375–2390.
- [25] *Rossi, D., Gaidano, G.*: The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Cancer*, 2016, 114(8), 849–854.
- [26] *Malcikova, J., Stano-Kozubik, K., Tichy, B., et al.*: Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2015, 29(4), 877–885.
- [27] *Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., et al.*: Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.*, 2015, 26(Suppl. 5), v78–v84.
- [28] *Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., et al.*: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008, 111(12), 5446–5456.
- [29] *Oscier, D., Dearden, C., Eren, E., et al.*: Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2012, 159(5), 541–564.
- [30] *Zelenetz, A. D., Gordon, L. I., Wierda, W. G., et al.*: Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 1.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2015, 13(3), 326–362.
- [31] *Tam, C. S., Stilgenbauer, S.*: How best to manage patients with chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion and/or TP53 mutation? *Leuk. Lymphoma*, 2015, 56(3), 587–593.
- [32] *Hallek, M.*: Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.*, 2015, 90(5), 446–460.
- [33] *Eichhorst, B., Cramer, P., Hallek, M.*: Initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 2016, 43(2), 241–250.
- [34] *Lepelletier, P., Preudhomme, C., Vanrumbeke, M., et al.*: Detection of p53 mutations in hematological malignancies: comparison between immunocytochemistry and DNA analysis. *Leukemia*, 1994, 8(8), 1342–1349.
- [35] *Chang, H., Jiang, A. M., Qi, C. X.*: Aberrant nuclear p53 expression predicts hemizygous 17p (TP53) deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2010, 133(1), 70–74.
- [36] *Murnyák, B., Hortobágyi, T.*: Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget*, 2016, 7(40), 64910–64920.
- [37] *Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., et al.*: The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia*, 2016 Oct 14. doi: 10.1038/leu.2016.263. [Epub ahead of print]
- [38] *Herling, C. D., Klaumünzer, M., Rocha, C. K., et al.*: Complex karyotypes, KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*, 2016, 128(3), 395–404.
- [39] *Sutton, L. A., Ljungström, V., Mansouri, L., et al.*: Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*, 2015, 100(3), 370–376.

(Bödör Csaba dr.,
Budapest, Üllői út 26., 1085
e-mail: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu)