Genetikai biomarkerek vizsgálata akut myeloid leukémiában

Doktori tézis

Dr. Kisariné Kövy Petra

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Andrikovics Hajnalka, Ph.D.,
osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók:
Dr. Horváth Laura Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Modok Szabolcs Ph.D., klinikai főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár, MTA doktora
Tagok: Dr. Kriván Gergely, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Tímár Botond, Ph.D., patológus szakorvos

Budapest
2021.

1.Bevezetés

Az akut myeloid leukémia (AML) a myeloid hematopoetikus őssejt klonális megbetegedése, melyet a myeloid sejtek differenciációjának gátlása és proliferációjának fokozódása jellemez. AML-ben heterogén genetikai háttér figyelhető meg. A jelenleg elfogadott elmélet szerint többlépcsős a patogenezise, amelyhez több mutáció egymást követő kialakulása szükséges. Először a pre-leukémiás mutációk jelennek meg, azt követően az alapító mutációk, végül pedig a domináns klón mutációk. Az AML betegek mintegy 50%-ban figyelhető meg kromoszóma eltérés [pl. t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q24.1;q21.2), stb]. Az AML leggyakoribb mutációi közé tartozik az *fms*-like tirozin kináz gén internal tandem duplikáció (*FLT3*-ITD), tirozin kináz domén mutáció (*FLT3*-TKD), a nukleofoszmin 1 (*NPM1*), az izocitrát dehidrogenáz 1 és 2 (*IDH1* és *IDH2*) mutációk. Az *FLT3* szerepet játszik az őssejtek proliferációjában és differenciációjában; a jelátviteli útvonalak konstitutív aktiválódása miatt következményes proliferációs előnyt biztosít az AML sejtklónnak. Az

NPM1 mutáció kóros citoplazmatikus lokalizációt okoz, amely más fehérjék kóros működését eredményezi. Az *IDH1* és *IDH2* aktiváló mutációik kóros onkometabolit termelődést okoznak, az α-ketoglutarát dependens enzimek gátlása kóros metilációs profilhoz és őssejt differenciációhoz vezet.

A mérhető reziduális betegség (MRD) követése AML-ben előre jelzi a relapszust, illetve a betegség kimenetelét. Az MRD jelenléte kezelés után egy független, diagnózis után megállapítható, prognosztikai faktor. Az MRD vizsgálatok célja a megfelelő módszertani háttér biztosítása, a prognosztikai és a terápiás döntések elősegítése, a korai beavatkozási lehetőség biztosítása, a hematopoetikus őssejt-transzplantáció (HSCT) monitorizálása, illetve a gyógyszerkipróbálás és bevezetés felgyorsítása. MRD követésre olyan genetikai markerek alkalmasak, amelyek jól korrelálnak a leukémiás tumor tömegével, nagyfokú stabilitással rendelkeznek relapszusban, érzékenyek (legalább 10^{-4}), illetve technikailag könnyen és gyorsan vizsgálhatók. Ilyen markerek a leukémia alapító mutációi lehetnek.

Az AML standard indukciós kezelése a „7+3”, 7 napig 100-200 mg/m^2 citarabin (AraC) és 3 napig 60 mg/m^2 tartó daunorubicin infúzió. Az indukciós (intenzív) kezelést követően teljes remissziót (CR) elérő betegek esetében a konszolidációs kezelés, legtöbbször nagy dózisú citarabin adása vagy allogén-HSCT követi, mely az AML leggyakoribb posztremissziós kezelési módszerei közé tartoznak. A HSCT kimenetelét klinikai és genetikai faktorok befolyásolják, és számos szövődménye ismert, az egyik leggyakoribb a graft versus hoszt betegség (GvHD). A GvHD kialakulásában különböző citokinek vesznek részt, ilyen pl. a transzformáló növekedési faktor β1 (TGFβ1) is. Főként T sejtek és vérlemezkék szekretálják, de epitél, endotél és kötőszöveti sejtek is. A TGFβ1 az immunrendszer pleiotróp szabályozó citokinje, amely befolyásolja limfociták proliferációját, differenciálódását és migrációját.

2.Célkitűzések

Munkánk során az AML genetikai biomarkereinek vizsgálatát tűztük ki célul.

1.) A Dél-pesti Centrumkórházban 2001.01-2020.12 között diagnosztizált és kezelt felnőtt AML betegek adatbázisának kibővítése és folytatása.

2.) A diagnóziskor jelen lévő mutációk gyakoriságának, társulásainak, remisszióban eltűnésük, relapszuskori újbóli megjelenésüknek a vizsgálata.

3.) Érzékeny droplet digitális PCR (ddPCR) módszer beállítása *NPM1* (DNS és RNS), illetve *IDH1/2* (DNS) mutáció tekintetében.

4.) *NPM1* és *IDH1/2* mutációk MRD monitorozása kuratívan kezelt, remisszióba került, diagnóziskor mutáció pozitív AML betegek esetében, indukciós kezelést követően és HSCT előtt.

5.) 2007-2013 között allogén-HSCT-vel kezelt recipiensek és donoraik *TGFB1* -1347C>T genotípusának meghatározása, az összesített túlélés és a nem relapszushoz köthető halálozás (NRM) elővetítése.

6.) A *TGFB1* -1347C> T genotípus szerepének vizsgálata a szövődmények összefüggésében.

3.Módszerek

3.1.Betegcsoportok

Az AML betegcsoport 2001-2020 között diagnosztizált és kezelt 916 felnőtt AML betegből állt. Az *FLT3*-ITD alacsony (*FLT3*-ITD^{low}) és magas (*FLT3*-ITD^{high}) allélarány elkülönítése, a morfológiai leukémia mentes állapot (MLFS), az összesített túlélés (OS) és a relapszus mentes túlélés (RFS) definícióit az Európai LeukémiaNet (ELN) 2017 ajánlásai írták le.

A HSCT betegcsoportot 2007-2013 között allogén HSCT-vel kezelt 409 beteg és donora képezte. A HSCT-vel kezelt betegek malignus hematológiai betegségben szenvedtek, jelentős részük, AML beteg volt (38%; n=155). Az adatok gyűjtése és analízise mindkét betegcsoport esetén retrospektív módon történt.

3.2.Diagnóziskor alkalmazott módszerek

A citogenetikai vizsgálat során kromoszóma elemzés és a fluoreszcens in situ hibridizáció technika valósult meg a nemzetközi előírások szerint. Molekuláris genetikai vizsgálatok közül fragmens analízist (*FLT3*-ITD, *NPM1*), restrikciós fragmens hossz polimorfizmust (*FLT3*-TKD),

nagy felbontású olvadási görbe analízist, multiplex allél-specifikus polimeráz láncreakciót, illetve Sanger szekvenálást (*IDH*) alkalmaztunk.

3.3.MRD követésre alkalmazott módszer

Az MRD követést ddPCR segítségével végeztük *NPM1* (n=116), *IDH1*/*2* (n=62) AML beteg esetében indukciós terápia után 30-60 nappal, illetve HSCT előtt 1-30 nappal (*NPM1* n=38, *IDH1*/*2* n=22). A ddPCR módszer bevezetése során minden vizsgálat esetében meghatároztuk a hátteret (LoB, limit of blank) és a detektációs határt (LoD, limit of detection) 22-38 negatív kontroll minta felhasználásával (*NPM1* esetében DNS és RNS alapú módszerre egyaránt, *IDH1/2* esetében DNS alapú módszerre).

3.4. *TGFβ1* -1347C>T SNP genotipizálása

A *TGFβ1* -1347C>T genotípust olvadási görbe analízissel vizsgáltuk LightCycler 480II készüléken.

4.Eredmények

4.1.Diagnóziskor jelen lévő mutációk

A 916 AML beteg diagnózisa során 24%-ban figyeltünk meg *FLT3*-ITD mutációt, 8%-ban *FLT3*-TKD, 28%-ban *NPM1*, 8%-ban *IDH1* és 11%-ban *IDH2* mutációt. A betegek 94%-ának (n=861) volt elérhető citogenetikai eredménye, melyből 375 beteg normál kariotípussal rendelkezett.

4.2.Genetikai markerek relapszusban

A mutációk ismételt megjelenését relapszusban, azaz stabilitását mutációtól függően 116-161 diagnózis-relapszus mintapáron vizsgáltuk. *FLT3*-ITD esetében 5%-ban (3/55) eltűnt a mutáció relapszusban, 27%-ban (15/55) megváltozott mérete és 11%-ban (11/100) új mutációként jelent meg. Az *FLT3*-TKD mutációk 67%-a (8/12) tűnt el relapszusban és 1%-ban (1/118) jelent meg újként. Az általunk vizsgált mutációk közül a *NPM1* volt az egyetlen, amelyik új mutációként nem jelent meg relapszusban, a diagnóziskor pozitív esetek 9%-a (7/79) eltűnt relapszusban. Az *IDH1/2* mutációk 13%-a (3/23) relapszusban nem volt megfigyelhető és 3%-ban (3/93) új

mutációként jelentek meg. Citogenetikai eredmény 105 diagnózis-relapszus mintapár esetén volt elérhető. Az eredmények 68%-os stabilitást mutattak, 32%-ban relapszusban megváltozott az AML betegek kariotípusa.

4.3.Prognózis becslés

A 746 kuratív célú indukciós kezelésben részesülő AML beteg összesített túlélését vizsgáltuk. A kedvező és intermedier citogenetikai rizikó besorolásba tartozó betegek összesített túlélése kedvezőbb volt, mint a (24-hónapos OS: kedvező csoportban 73,2 ± 3,9%, az intermedier csoportban 38,4 ± 2,4%, míg a kedvezőtlenben 17,1 ± 2,9%, $p<0,001$). Az intermedier citogenetikával rendelkező *FLT3*-ITD$^{neg/low}$ betegek esetében szintén kedvezőbb volt a 24-hónapos túlélés, mint a *FLT3*-ITD^{high} betegek esetében (24-hónapos OS: *FLT3*-ITD^{neg} 42,7 ± 3,0%, *FLT3*-ITD^{low} 37,1 ± 5,5% és *FLT3*-ITD^{high} 22,0 ± 5,6%, $p=0,004$). A 2017-es ELN ajánlásokat figyelembe véve az intermedier citogenetikával rendelkező betegek esetében az *NPM1* és *FLT3*-ITD mutáció társulások az irodalmi adatoknak megfelelően befolyásolta az összesített túlélést (24-

hónapos OS *NPM1*^{poz}-*FLT3*-ITD$^{neg/low}$: 44,9%±4,2%, *NPM1*^{neg}-*FLT3*-ITD$^{neg/low:}$ 39,0±3,4%; *NPM1*^{poz}-*FLT3*-ITD^{high}: 21,2%±6,7%, *NPM1*^{neg}-*FLT3*-ITD^{high}: 17,6± 9,2%; p=0,002). Az *IDH1*, illetve *IDH2* mutáció pozitivitás nem befolyásolta az OS-t az intermedier citogenetikával rendelkező alcsoportban.

4.4.DdPCR alkalmazás és *NPM1* típus meghatározás

A diagnóziskor kapilláris elektroforézissel, fragmens analízissel *NPM1* mutáció pozitívnak detektált AML betegek mutáció típusának meghatározását, illetve MRD követését ddPCR módszerrel valósítottuk meg. Az *NPM1* mutációval rendelkező betegek 97%-a (n=194) *NPM1*-A vagy -N típusú, azonban 3%-a (n=6) N típusú primerrel sem volt kimutatható (ritka *NPM1* mutáció).

4.5.MRD követés

Az indukciós kezelést követően az *NPM1* DNS MRD^{neg} [mutáció típustól függően <0,01% (A típusú mutáció), <0,05% (N típusú mutáció)] betegek túlélése kedvezőbb volt, mint az MRD^{poz} betegeké (24-hónapos OS: MRD^{neg} 58,5 ± 7,5% vs MRD^{poz} 39,3 ± 6,2%

p=0,029). Többváltozós elemzésben az indukciós kezelés utáni *NPM1* MRD pozitivitás (A és N típus egyaránt) az életkor, a diagnóziskor azonosított citogenetika és az *FLT3*-ITD mutáció megléte/hiánya, valamint a fehérvérsejtek (WBC) számától független kockázati tényezőnek bizonyult (OS: HR 2,16 95% CI 1,25-3,74, p=0,006). Az allo-HSCT előtt mért MRD (n=32) esetében az *NPM1* DNS MRD^{neg} kedvező prognosztikai tényezőnek bizonyult (24-hónapos OS MRD^{neg} 74,7 ± 9,8% vs MRD^{poz} 16,2 ± 14,6%, p=0,012). Indukciós kezelést követően 39 beteg esetében DNS és RNS minta is elérhető volt. A minták 46%-ában az RNS alapú módszerrel detektálni lehetett az *NPM1* mutációt, míg DNS alapú módszerrel ezek a minták mind negatívnak bizonyultak. További RNS és DNS mintapárok esetén az RNS alapú mérések átlagosan 2-3 nagyságrenddel magasabb értéket mértek, amelyek az RNS alapú vizsgálatok érzékenységét bizonyította.

A diagnóziskor *IDH1/2* AML betegek közül 62 beteg volt alkalmas MRD követésre. Eredményeinkből megfigyeltük, hogy az indukciót követően *IDH1/2* MRD^{neg} betegek 24-hónapos túlélése kedvezőbb, mint az

MRD^{poz} betegeké (24-hónapos OS MRD^{neg} 62,5 ± 9,0% vs MRD^{poz} 41,3 ± 9,2%, p=0,003). Többváltozós elemzésben az indukciós kezelés utáni az *IDH1/2* (variánstól függetlenül) MRD pozitivitás a túlélés független rizikófaktorának bizonyult az életkor, a diagnóziskori citogenetikai rizikó kategória, az *FLT3*-ITD, az *NPM1* és a WBC alapján (OS: HR: 2,81 95% CI: 1,09-7,23, p=0,032). Az MRD követett *IDH1/2* mutáció pozitív allo-HSCT-n átesett betegek közül 21 esetben volt elérhető HSCT-t megelőző hónapban DNS minta. A pre-HSCT *IDH1/2* MRD negativitás nem mutatott összefüggést a HSCT-t követő összesített túléléssel.

4.6. *TGFB1* genotípus

A recipiens *TGFB1*-1347C>T polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a HSCT kimenetelével, sem a teljes, sem az egyes alcsoportokban (akut vagy krónikus malignitás, testvér vagy idegen HLA egyeztetett donor, myeloablatív vagy redukált intenzitású kondicionálás, különböző GvHD profilaxis alcsoportokban). A myeloablatív kondícionálásban (MAC) részesülők alcsoportjában (n=261) a *TGFB1*-1347TT genotípusú

donorral transzplantált betegek túlélése kedvezőtlenebb (60-hónapos OS: CC: 62,1% ± 4,8%, TC: 46,8% ± 4,8% és TT: 35,6% ± 9,3%, p=0,032; amely független volt az életkortól, a donortípustól és a GvHD profilaxistól). Az aGvHD III-IV fokozat gyakorisága növekvő tendenciát mutatott a donor *TGFB1* -1347T allél heterozigótaságával és homozigótaságával párhuzamosan (CC: 11%, CT: 17%, TT: 24%, p=0,057). A kedvezőtlen túlélés hátterében az NRM összefüggését igazoltuk a donor *TGFB1* genotípussal [24-hónapos NRM a donor genotípusai szerint; CC: 24,1% (16,5-32,5%), CT: 26,1% (18,5-34,2%) és TT: 45,5% (27,8-61,6%), p=0,035]. A gombás fertőzések gyakrabban fordultak elő halálokként, ha a donor *TGFB1* -1347C> T hordozó volt (CC: 9,7% vs. CT: 38,1% vs TT: 33,3%, p=0,022), ami hozzájárulhatott a megnövekedett halálozáshoz.

5. Következtetések

1.) Munkám során 916 felnőtt újonnan diagnosztizált AML beteg adatbázisa került kialakításra. A 20 évet átölelő adatbázis tartalmazza a betegek alapvető klinikai adatait, vérkép paramétereit, áramlási citometriai, citogenetikai, valamint molekuláris genetikai eredményeit diagnóziskor és genetikai adatait relapszuskor.

2.) Az *FLT3, NPM1, IDH1, IDH2* mutációk gyakorisága és relapszuskor mutatott stabilitása megegyezik az irodalomi adatokkal. Alátámasztja, hogy az *FLT3* domináns klón mutáció, az *NPM1* alapító klón, míg az *IDH1/2* pre-leukémiás, alapító és domináns klón mutációként egyaránt viselkedhet.

3.) Laboratóriumunkban új szűrő és MRD monitorozásra alkalmas DNS (*IDH1/2, NPM1*) és RNS (*NPM1*) módszereket vezettünk be. Az *NPM1* mutáció esetében az RNS alapú módszer 2-3 nagyságrenddel érzékenyebb, mint a DNS.

4.) Az indukciós kezelést követően mérhető *NPM1* MRD pozitivitás független rizikó faktor, *FLT3*-ITD allélaránytól függetlenül kedvezőtlen hatással rendelkezik.

5.) Az indukciós kezelést követően mérhető *IDH1/2* MRD pozitivitás független rizikó faktor, mely kedvezőtlen hatással rendelkezik.

6.) Diagnóziskor *NPM1*, illetve *IDH/2* pozitív AML betegek HSCT előtti MRD pozitivitása is prognosztikai jelentőségű.

7.) Allogén-HSCT-t követően a recipiens *TGFB1* genotípusa nem befolyásolta a HSCT kimenetelét, míg donor *TGFB1* -1347TT genotípusa kedvezőtlen kimenetellel társult myeloablatív kondícionálás esetén, melynek hátterében a megnövekedett nem relapszushoz köthető halálozás állt.

6.Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

1. Petra Kövy, Zoltán Őrfi, András Bors, András Kozma, László Gopcsa, János Dolgos, Nóra Lovas, József Harasztdombi, Viktor Lakatos, Ágnes Király, Gábor Mikala, István Vályi-Nagy, Péter Reményi, Hajnalka Andrikovics. Nucleophosmin1 and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 as measurable residual disease markers in acute myeloid leukemia. Plos One. 2021 Jun 21;16(6):e0253386. doi: 10.1371/journal.pone.0253386. eCollection 2021.

2. Petra Kövy, Nóra Meggyesi, Lívia Varga, Katalin Balassa, András Bors, László Gopcsa, Melinda Paksi, Árpád Bátai, Eszter Vad, János Sinkó, Attila Tordai, Tamás Masszi, Péter Reményi, Hajnalka Andrikovics. Investigation of TGFB1 -1347C>T variant as a biomarker after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2020 Jan;55(1):215-223. doi: 10.1038/s41409-019-0656-4. Epub 2019 Sep 16.

3. Kövy Petra, Kozma András, Bors András, Meggyesi Nóra, Ádám Emma, Borsy Adrienn, Dolgos János, Lovas Nóra, Harasztdombi József, Lakatos Viktor, Vályi-Nagy István, Mikala Gábor, Reményi Péter, Andrikovics Hajnalka. Új terápiás célpont akut myeloid leukémiában: izocitrátdehidrogenáz 1 és 2 mutációk. Hematológia –Transzfuziológia. June 2019; 52(2):106-114. DOI: 10.1556/2068.2019.52.2.4

6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb közlemények

1. Andrikovics H, Kövy P, Bors A, Csabán D, Meggyesi N, Õrfi Z, Borsy A, Kozma A, Dolgos J, Harasztdombi J, Mikala G, Reményi P, Vályi-Nagy I. [Importance of next generation sequencing in precision oncology approach of acute myeloid leukemia]. Magy Onkol. 2019 Dec 9;63(4):282-287.

2. Varga G, Mikala G, Kiss KP, Kosóczki É, Szabó E, Meggyesi N, Balassa K, Kövy P, Tegze B, Szombath G, Tordai A, Andrikovics H, Homolya L, Masszi T.ProteasomeSubunitBetaType 1 P11A Polymorphism Is a New Prognostic Marker inMultipleMyeloma.ClinLymphomaMyelomaLeuk. 2017;17(11):734-742; doi: 10.1016/j.clml.2017.06.034. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28733196

3. Kiss KP, Varga G, Mikala G, Balassa K, Bors A, Kovy P, Meggyesi N, Kozma A, Csacsovszki O, Remenyi P, Valyi-Nagy I, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. The adverseeffect of FOPNL genomicvariant is reversed by bortezomib-based treatment protocols in multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 2018;59(3):710-716. doi: 10.1080/10428194.2017.1346250. Epub 2017 Jul 9. PMID:28691553