

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2603.**

**KISS KATALIN PIROSKA**

**Klinikai haematológia**  
című program

Programvezető: Dr. Masszi Tamás, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Andrikovics Hajnalka, osztályvezető főorvos

# Örökletes genetikai variánsok prognosztikai és prediktív szerepe myeloma multiplexben

Doktori értekezés

**Kiss Katalin Piroska**

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Istenes Ildikó, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Apáti Ágota Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit, MTA doktora,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Horváth Laura, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Marton Imelda, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2021

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés .....	7
1.1 MM kialakulása .....	7
1.2 MM diagnózisa .....	10
1.3 Prognózis becslése .....	12
1.4 Kezelés.....	13
1.4.1 Immunmoduláns szerek .....	13
1.4.2 Proteaszóma inhibitorok .....	14
1.4.3 A myeloma kezelésében alkalmazott egyéb szerek .....	15
1.4.4 Kezelési protokollok .....	16
1.4.5 Fenntartó kezelés .....	18
1.4.6 ASCT .....	18
1.4.7 Kezelés monitorozása, kezelésre adott válasz .....	19
1.5 Új prognosztikai és prediktív markerek.....	20
1.5.1 Genetikai variánsok adatbázisai .....	23
1.5.2 FOPNL fehérje és a centroszóma MM-ben .....	24
1.5.3 PSMB fehérjék és a proteaszóma MM-ben .....	26
2. Célkitűzések.....	29
3. Módszerek .....	30
3.1 Vizsgált egyének.....	30
3.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok .....	31
3.2.1 Nukleinsav izolálás .....	31
3.2.2 Valós idejű PCR.....	31
3.2.2.1 FOPNL rs72773978 .....	31
3.2.2.2 PSMB1 rs12717 .....	32
3.3 Proteaszóma expresszió és funkció vizsgálata .....	32
3.3.1 Proteaszóma és PSMB1 expresszió vizsgálata .....	32
3.3.2 Proteaszóma funkció vizsgálata .....	33
3.4 Fluorszcens in situ hibridizációs vizsgálat (FISH) .....	33
3.5 Statisztikai feldolgozás .....	34
4. Eredmények .....	35

4.1 FOPNL rs72773978.....	35
4.1.1 FOPNL rs72773978 polimorfizmus és klinikai jellemzők .....	35
4.1.2 FOPNL rs72773978 polimorfizmus és a terápia kimenetele .....	35
4.2. PSMB1 rs12717 polimorfizmus .....	44
4.2.1 PSMB1 rs12717 polimorfizmus és klinikai jellemzők .....	44
4.2.2 PSMB1 rs12717 polimorfizmus és a terápia kimenetele .....	44
4.2.3 PSMB1 rs12717 funkcionális vizsgálata .....	49
5. Megbeszélés.....	52
5.1 FOPNL.....	52
5.2 PSMB1.....	56
5.3 Biomarkerek szerepe .....	59
6. Következtetések.....	60
6.1. FOPNL rs72773978.....	60
6.2. PSMB1 rs12717.....	60
7. Összefoglalás .....	62
8. Irodalomjegyzék .....	64
9. Saját publikációk jegyzéke .....	76
9.1 A dolgozat alapjául szolgáló publikációk.....	76
9.2 A tézisekhez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk.....	76
10. Köszönetnyilvánítás.....	78

**Rövidítések jegyzéke**

ASCT	autológ őssejt-transzplantáció (autologous stem cell transplantation)
ATP	adenozin trifoszfát
BiTE	bispecific T-cell engager
BCL-2	B-sejtes lymphoma protein 2
BRAF	B-Raf proto-onkogén, szerin/treonin kináz; v-Raf egér sarcoma virus onkogén homológ B
CAR-T	kiméra antigénreceptor T-sejt
CCND	cyclin D
CD	cluster of differentiation (sejtfelszíni antigén jelölése)
CDK1	cyclin dependens kináz 1
CI	centroszóma index
CI±95%	95%-os konfidencia intervallum
CR	komplett választ
CRAB	hypercalcemia, renal failure, anemia, bone lesions
DNS	deoxiribonukleinsav
DRD	daratumumab-lenalidomid- dexamethason
DSS	Durie-Salmon Staging
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplazmatikus retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAM46C	family with sequence similarity 46 member C
FCGR	Fc gamma receptor
FDA	Food and Drug Administration
FGFR3	fibroblaszt növekedési faktor receptor 3
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FLC	szabad könnyűlánc
FOP	FGFR1 oncogene partner
FOPNL	fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 onkogén partner N terminális
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
GWAS	genom asszociációs vizsgálat
HR	hazard ratio, rizikó
IC <sub>50</sub>	50%-os gátló hatást okozó koncentráció

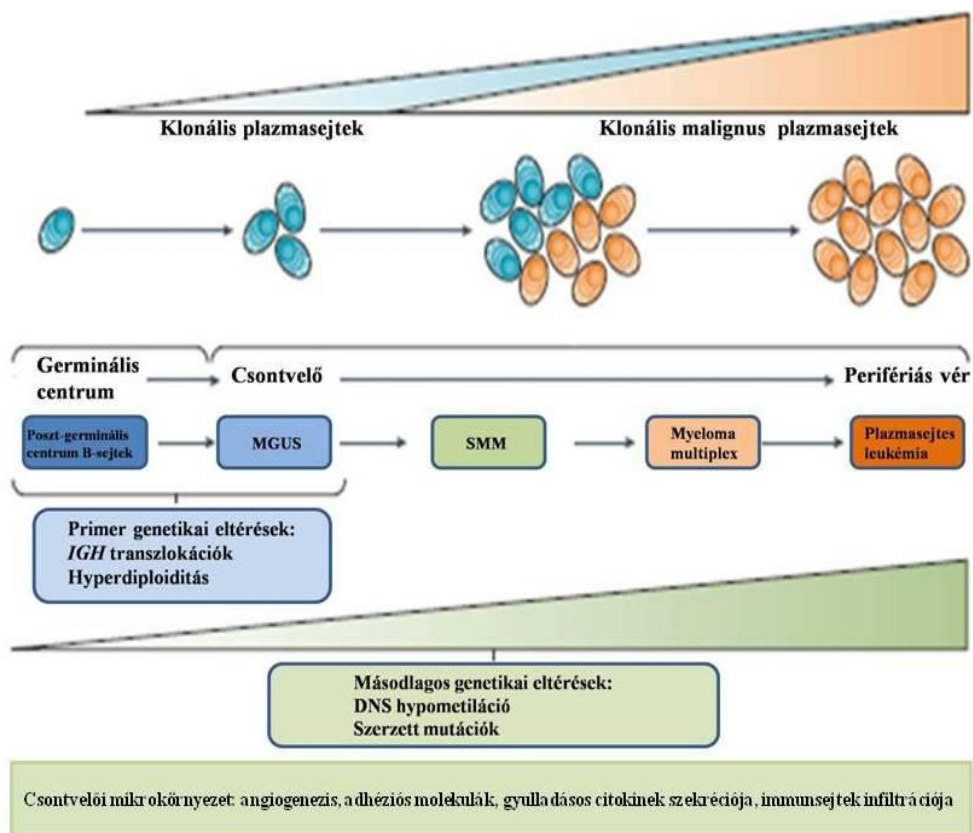
IFN	interferon
Ig	immunglobulin
IgH/IgL	immunglobulin nehézlánc/ immunglobulin könnyűlánc
IL-6	interleukin-6
IMiD	immunmoduláns gyógyszerek
IMWG	Nemzetközi Myeloma Munkacsoport, International Myeloma Working Group
IRD	ixazomib- lenalidomide-dexamethasone
ISS	International Staging System
KRAS	kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue
LDH	laktát dehidrogenáz
LisH	Lis1 azonos
LMP7	latent membrane protein 7
MAF	musculoaponeuroticus fibrosarcoma (MAF bZIP transzkripció faktor)
MDE	myelomát meghatározó események, myeloma defining events
MGUS	ismeretlen jelentőségű monoklonális gammopathia (monoclonal gammopathy of unknown significance)
MM	myeloma multiplex
MMSET	multiple myeloma SET domain
MP	melphalan–prednisolon
MPT	melphalan- prednison-thalidomid
MR	magas rizikó
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
MRD	minimális/mérhető reziduális betegség
MYC	myelocytomatosis onkogén
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	nukleáris faktor-kappa B
NR	hiányzó válasz
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OFD1	oral facial digital 1
OS	összesített túlélés, overall survival
PBS	foszfát pufferelt sóoldat, phosphate-buffered saline
PCM1	pericentrioláris anyag1
PCR	polimeráz láncreakció

PD	progresszív betegség
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein complex
PET	pozitronemissziós tomográfia
PFS	progressziómentes túlélés, progression free survival
PI	proteaszóma gátló
Plk1	polo-like kináz 1
PLL	Pro-Leu-Leu
PR	parciális válasz
PSMB1	Proteasome subunit beta type-1
Rd	lenalidomid-dexamethason
RISS	Revised International Staging System
sCR	szigorú komplett válasz
SD	standard deviation
SLAMF7	signaling lymphocytic activation molecule family member7
SMM	smouldering myeloma
SNP	egy pontos nukleotid-polimorfizmus, single nucleotide polymorphism
SR	standard rizikó
TD	thalidomid-dexamethason
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor $\alpha$
TP53	tumor protein p53
UPR	fel nem tekeredett fehérje válasz, unfolded protein response
VAD	vincristin-doxorubicin-dexamethason
VCD	bortezomib-cyclophosphamid-dexamethason
VD	bortezomib-dexamethason
VDJH	V (variable), D (diversity), J (joining) és C (constant)
VDT-PACE	bortezomib, dexamethasone, thalidomide, cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide és etoposide
VEGF	vaszkuláris endotheliális faktor
VGPR	nagyon jó parciális válasz
VMP	bortezomib-melphalan-prednison
VRD	bortezomib-lenalidomid-dexamethason
VTD	bortezomib-thalidomid-dexamethason

## 1. Bevezetés

### 1.1 MM kialakulása

A myeloma multiplex (MM) rosszindulatú hematológiai megbetegedés, melyet differenciált plazmasejtek malignus burjánzása jellemez. Az abnormális plazmasejtek főként a csontvelőben helyezkednek el, azonban a betegség lefolyása során a kóros plazmasejtek kimutathatók lehetnek a perifériás vérben, valamint egyéb extramedulláris helyeken is. A MM az Egyesült Államokban 2017-ben az összes malignus megbetegedés 1,7%-át, míg a hematológiai betegségek 10%-át jelentette [1]. Magyarországon évente körülbelül 350-400 új MM beteget diagnosztizálnak [2].



**1. ábra Monoklonális paraproteinémiák kialakulása.** A myeloma multiplex egy többlépcsős folyamat során alakulhat ki, különböző prekursor állapotokon keresztül, mint a ismeretlen jelentőségű monoklonális gammopathia (MGUS:gammopathy of undetermined significance) és a smouldering myeloma (SMM). A myeloma multiplex progrediálhat extramedulláris myelomába és plazmasejtes leukémiába is. Primer genetikai eltérések az immunglobulin nehézlánc gént (*IGH*) érintő transzlokációk és az aneuploiditás. A másodlagos genetikai eltérések nagymértékben hozzájárulhatnak az MGUS és SMM myelomába történő alakulásához [1].



A monoklonális paraproteinémiák közé tartozó myeloma multiplex mellett az egyik leggyakoribb az ismeretlen jelentőségű monoklonális gammopathia (MGUS: gammopathy of undetermined significance), valamint a smouldering myeloma (SMM), mely az MM és MGUS közötti klinikai fenotípussal jellemezhető. Mind az MGUS mind pedig az SMM definíció szerint tünetmentes (1. ábra). Mindkét típus MM-be progreddálhat, azonban SMM esetén ennek az esélye magasabb. Ezen felül MGUS és SMM pácienseknél egyéb betegségek kialakulása is előfordulhat (amyloidosis, Waldenstrom macroglobulinémia vagy egyéb lymphoproliferatív rendellenességek) [1, 3].

Az MM mind klinikailag mind biológiailag rendkívül heterogén. Ezen tulajdonságai főként a tumor klónok változatos molekuláris, genetikai jellemzőivel hozhatók összefüggésbe, amelyek már a betegség korai szakaszában is megjelennek és kimutathatók. A myeloma ezen tulajdonságai miatt elkülönül egyéb hematológiai betegségektől, mint például a leukémiák és lymphomák, melyek genetikai változásai jól körül írtak, korlátozottak [4]. Krónikus myeloid leukémia esetén például a Philadelphia kromoszóma, mely a 9. és 22. kromoszómák transzlokációja, vagy a myeloproliferatív neopláziák esetén ismert 2. típusú Janus kináz gén pontmutációi [5]. A follikuláris lymphoma legjellemzőbb pathogenetikai eltérése a t(14;18)(q32;q21) transzlokáció, mely a BCL-2 fehérje emelkedett expresszióját eredményezi [6]. A myeloma multiplex kialakulásában szerepet játszó genetikai változások megértéséhez a B-sejtek fejlődésének, valamint a plazmasejtek biológiájának ismerete elengedhetetlen. A plazmasejtek a hematopoetikus őssejtekből alakulnak ki. Az érési folyamataik a csontvelőben kezdődnek, majd a másodlagos nyirokszervekben folytatódnak. Az első lépés a csontvelőben a prekursor B-sejtekben történő antigén független immunglobulin gén nehézláncát (*IGH*) kódoló gének szerveződése és átrendeződése. Ezen folyamat során a nehézláncot alkotó V (variábilis), D (diverz), J (kapcsolódási, joining) szegmensek különböző kombinációja alakul ki. Ezt követi a könnyűlánc gének (*IGL $\kappa$*  és *IGL $\lambda$* ) átrendeződése [7]. Ezt követően az éretlen B-sejt a másodlagos nyirokszövetekben, antigén által szabályozott, antigén-függő változásokon megy keresztül. Az *IGH* gén hipervaríbilis régiójában végbemenő szomatikus hipermutációk és osztály rekombinációk következményeképp, változatos primer immunglobulin repertoárral rendelkező B-sejtek alakulnak ki [1]. Végül az érett B-sejtek memória sejtekké, vagy hosszú életű plazmasejtekké differenciálódnak, melyek a csontvelőbe térnek vissza [7]. A magas antigén specificitás az *IGH* gén

hipervariábilis régiójában végbemenő két szomatikus változás következtében alakul ki. Az első, a szomatikus hipermutáció, melynek eredménye a hatékonyabb antigén felvétel és prezentáció, valamint adott antigének elleni magas affinitású antitestekkel rendelkező B-sejt klónok szelekciója. A második a konstans régió izotípusváltást eredményező rekombinációja. Ez a folyamat hiba esetén kóros rekombinációt eredményezhet más genomai régiókkal, transzlokációt okozva. Ma már bizonyítékok vannak arra, hogy az izotípusváltás következtében kialakuló hibák, a myeloma kialakulásában szerepet játszanak [8].

Primer genetikai eltérések alapján az MM két nagy csoportba kategorizálható: hiperdiploiditás, valamint az IgH lókuszt érintő transzlokációk. A hiperdiploid kariotípus az MM betegek közel 50%-át érinti, mely során főként a páratlan kromoszómák (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21) számbeli eltérése figyelhető meg [7, 9]. A hiperdiploid MM kedvező prognózissal jár, a betegek medián összesített túlélése 7-10 év lehet [3].

Az IgH transzlokációk közül leggyakoribb a t(11;14)(q13;q32), amely a MM betegek körülbelül 15-20%-ánál mutatható ki. A transzlokáció a sejtciklus folyamatához szükséges cyclin D1 (CCND1) gén emelkedett expressziójához, ezáltal emelkedett cyclin D1 fehérje szinthez vezet [1, 7]. Kedvező prognózissal jár, a betegek medián összesített túlélése 7-10 év lehet [3]. A második leggyakoribb IgH transzlokáció a t(4;14)(p16;q32), amely a páciensek közel 12%-ra jellemző rendellenesség. Ez a transzlokáció egyidejűleg két gén fokozott expresszióját is eredményezi. A MMSET (myeloma multiplex SET domén), mely emelkedett metil-transzferáz fehérjetermelést eredményez, ezáltal különböző fehérjék metilációjához vezet, valamint a FGFR3 (fibroblaszt növekedési faktor receptor 3), mely egy onkogén receptor tirozin kináz [4, 7]. A betegek medián túlélése 5 év. Ebben a csoportban ajánlott a bortezomib alapú kezdeti terápia, valamint korai autológ őssejt-transzplantáció (ASCT), melyet bortezomib alapú fenntartó kezelés követhet [3]. Az IgH transzlokációk közé tartozó kevésbé gyakori citogenetikai abnormalitások körülbelül a betegek 2-3%-ára jellemzőek. Ezek közül a MAF (musculoaponeuroticus fibrosarcoma) onkogént befolyásoló t(14;16)(q32;q23), a MAFB működésére ható t(14;20)(q32;q11) és a t(6;14)(p21;q32), amely a CCND3 gén expresszióját fokozza [7]. A t(6;14) jó prognózisú, 7-10 év összesített túlélés jellemzi. A t(14;16) valamint a t(14;20) eltérések magas rizikójú MM-t eredményeznek 3 éves összesített túléléssel [3].

Ezen alapító, elsődleges genetikai eltérések mellett, számos egyéb kromoszóma eltérést azonosítottak a MM betegek esetén, melyek különböző gyakorisággal fordulnak elő, feltehetőleg befolyásolva a betegség prognózisát. Az 1-es kromoszóma rövid karjának elvesztése del(1p), vagy a hosszú karjának amplifikációja amp(1q21) kedvezőtlen prognózisú. A 13-as kromoszóma deléciója del(13q), vagy a 17-es kromoszóma rövid karjának deléciója, mely a TP53 (tumor protein p53) lókuszt delécióját foglalja magában, szintén kedvezőtlen prognosztikai faktor MM-ben. Egyéb másodlagos genetikai eltérések közé sorolható, a RAS (KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue, NRAS: neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) és a BRAF (B-Raf proto-onkogén, szerin/treonin kináz) gének aktiváló mutációi, az NF $\kappa$ B (nukleáris faktor-kappa B) útvonal mutációi, valamint a FAM46C (family with sequence similarity 46 member C) gént érintő elváltozások [1, 9].

### *1.2 MM diagnózisa*

A myeloma diagnózisához szükséges laboratóriumi vizsgálatok közé tartozik a szérum, vizelet monoklonális fehérje, szérum könnyűlánc kimutatása valamint a csontvelő szövettani vizsgálata és a képképző eljárások [10]. A plazmasejtek által termelt M-protein vagy FLC (szabad könnyűlánc) szűrővizsgálati módszere az agarózgél vagy kapilláris zóna-elektroforézis, mennyiségi meghatározásuk nefelometria és denzitometriás jelöléssel történik. Az immunfixációs módszer érzékenyebb, azonban nem kvantitatív. Alkalmos a fehérje típusának meghatározására, illetve az elektroforézissel már nem kimutatható mennyiségű M-protein jelenlétének kizárására és ezzel a komplett válasz elérésének a megerősítésére [2]. A csak könnyűláncot termelő plazmasejt szaporulat felismerésében, a szérum szabad könnyűlánc assay kifejlesztése hozott jelentős előrelépést, mely diagnosztikus értékén túl prognosztikus, illetve a terápia hatékonyságára vonatkozó eredménnyel is szolgál [10]. A csontvelő szövettani vizsgálata May–Grünwald–Giemsa szerint festett kenetben történik, ezen felül csontvelő aspirátumból történnek a citogenetikai, a fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH), az immunhisztokémiai és az áramlási citometriás vizsgálatok is. A kóros és normál plazmasejtek elkülönítésének módszere az áramlási citometria. Sejtfelszíni markerként CD138, CD38 alkalmazható, az esetek nagy részében CD56 expresszió is jelen van. B-sejtes marker CD19 (CD20, CD22) alkalmazásával a malignus plazmasejtek negatívak [2]. Kiegészítő laboratóriumi vizsgálatok a vérképvizsgálat során igazolt cytopénia, valamint kémiai paraméterek

eltérése (urea, kreatinin, LDH, kalcium, összfehérje szint) vörösvérsejt-süllyedés, kenetvizsgálat esetén látható pénztekercs képződés [2].

A képalkotó vizsgálatokkal kimutathatók a csontléziók és a plazmocytomák. A legegyszerűbb képalkotó módszer a beteg hagyományos röntgen vizsgálata, melyet a diagnózis felállításához, valamint a betegség nyomon követésére is alkalmaznak. Azonban számos hátránya miatt, a szakmai protokollokban felváltották az alacsony dózisu, teljes test komputer tomográfia (CT), valamint az mágneses rezonancia képalkotás (MRI) és a pozitron emissziós tomográfia (PET/CT) vizsgálatok [11].

A betegek diagnózisa az International Myeloma Working Group (IMWG, Nemzetközi Myeloma Munkacsoport) által készített legáltalánosabban elfogadott diagnosztikai kritériumrendszer alapján történik (1. táblázat). A 2014-ben készült guideline szerint az MM diagnózisához szükséges: a csontvelői klonális plazmasejt szaporulat igazolása és a szervi károsodás jelenléte, melyet a CRAB mozaikszó foglal össze (hypercalcemia, renal failure, anemia, bone lesions). Ezt követően 2016-ban egy új verziót készített az IMWG, melyet a már meglévő CRAB kritériumok mellett 3 új specifikus biomarkerrel egészített ki: klonális csontvelői plazmasejtek aránya nagyobb vagy egyenlő 60%-kal, a szérum szabad könnyűlánc arány 100 vagy afeletti, valamint az egy vagy annál több fokális léziók kimutatása MRI vizsgálattal. A három új markert valamint a CRAB tulajdonságokat együttesen myelomát meghatározó eseményeknek nevezik (MDE: myeloma defining events, myelomát meghatározó események). Ezen új kritériumrendszer segítségével lehetővé vált az MM biztosabb felismerése, megkülönböztetése egyéb plazmasejt rendellenességektől [1, 3, 12, 13].

**1. táblázat** Nemzetközi Myeloma Munkacsoport (IMWG) által meghatározott diagnosztikai kritériumok [3]

Rendellenesség	Diagnózis kritériumok
<b>MGUS</b>	
<b>IgM típusú MGUS</b>	Szérum monoklonális fehérjeszint (nem IgM típusú) <3g/dl Klonális csontvelői plazmasejtek <10% Szervi károsodás hiánya (CRAB hiánya)
<b>Könnyű-lánc MGUS</b>	Kóros FLC arány (<0,26 vagy >1,65) A megfelelő könnyű lánc szintjének emelkedése (κFLC arány >1,65 vagy λFLC arány <0,26) Nincs immunglobulin nehézlánc expresszió Szervi károsodás hiánya Klonális csontvelői plazmasejtek <10% Vizelet monoklonális fehérjeszint <500mg/24h
<b>Smouldering MM</b>	Szérum monoklonális fehérjeszint (IgG vagy IgA) ≥ 3g/dl vagy vizelet monoklonális fehérjeszint ≥500mg/24h és/vagy klonális csontvelői plazmasejtek 10%-60% MDE hiánya vagy amyloidosis
<b>MM</b>	Minden kritériumnak teljesülnie kell Klonális csontvelői plazmasejtek ≥10% vagy extramedulláris plasmocytoma Bármelyik vagy több az alábbi MDE közül <ul style="list-style-type: none"> <li>Szervi károsodás, mely az alábbi rendellenességeknek tulajdoníthatók: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hypercalcaemia: szérum kalcium &gt;0,25 mmol/l (&gt;1mg/dl) magasabb, mint a normál felső határ vagy &gt;2,75 mmol/l (&gt;11mg/dl)</li> <li>Veseelégtelenség: kreatinin clearance &lt; 40ml/perc vagy szérum kreatinin &gt; 177μmol/l (&gt;2mg/dl)</li> <li>Anémia: hemoglobinn érték a normál alsó határ alatti &gt;2g/dl vagy &lt;10g/dl</li> <li>Csontléziók: egy vagy több osteolytikus lézió látható a röntgen képen, CT vagy PET-CT</li> </ul> </li> <li>Klonális csontvelői plazmasejt arány ≥60%</li> <li>Szérum FLC arány ≥100 mg/dl</li> <li>Egynél több MRI-vel kimutatható fokális lézió</li> </ul>

CRAB: hypercalcaemia, renal insufficiency, anemia, and bone lesions; CT: komputer tomográfia; FLC: szabad könnyűlánc; MDE: myeloma defining event; MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM: myeloma multiplex; MRI: mágneses magrezonancia képalkotás; PET-CT: pozitron emissziós komputer tomográfia

### 1.3 Prognózis becslése

Az MM betegek prognózisának meghatározásához hagyományosan alkalmazott rendszer a Durie-Salmon Staging (DSS) vagy az International Staging System (ISS). A Durie-Salmon-féle besorolást 2005-ben váltotta fel az ISS, mely a betegeket három különböző prognosztikai csoportra osztja, két laboratóriumi

paraméter alapján (2. táblázat). Egyik a magas szérumbéta-2-mikroglobulin szint, amely csökkent vesefunkcióra utalhat, másik paraméter az alacsony szérumbalbumin szint, amely gyulladáscitokinek főként az interleukin-6 eredménye. Az ISS-t a diagnóziskor szükséges meghatározni. Egy új a Revised International Staging System (RISS) kritérium rendszert adott ki az IMWG, amely 4445, újonnan diagnosztizált, imid-, illetve bortezomib-bázisú kezelésben részesülő beteg analízisén alapul. Az új rendszer magába foglalja az ISS-ben meghatározott paramétereken felül, a specifikus citogenetikai abnormalitások meglétét, vagy hiányát, valamint az emelkedett laktátdehidrogenáz szintet is [14, 15].

## 2. táblázat Az ISS és az RISS kritériumrendszer [14]

ISS stádium	Kritériumok	RISS stádium	Kritériumok
1.	Szérumbéta-2-mikroglobulin < 3,5 mg/l és szérumbalbumin > 35 g/l	1.	ISS 1 nincs magas rizikójú citogenetikai eltérés normál LDH szint
2.	Nem felel meg sem az 1., sem a 3. stádium kritériumainak	2.	nem felel meg sem az 1., sem a 3. stádium kritériumainak
3.	Szérumbéta-2-mikroglobulin > 5,5 mg/l	3.	ISS 3 bármely magas rizikójú citogenetikai eltérés: t(4;14), t(14;16), del(17p) emelkedett LDH szint

ISS: International Staging System; RISS: Revised International Staging System; LDH: laktátdehidrogenáz

### 1.4 Kezelés

A myeloma kezelésében a 2000-es évektől meghatározó változások történtek. Az addig leginkább kortikoszteroidok, melphalan, VAD (vincristin, doxorubicin, dexamethason), valamint az autológ őssejt transzplantációból álló terápiaikkal mellett megjelentek az immunmoduláns gyógyszerek (IMiD) és a proteaszóma gátló (PI) szerek. Ezen új szereknek köszönhetően a 2-3 éves medián túlélést illetően szignifikáns javulás mutatkozott, mely akár 10 vagy több év is lehet [16].

#### 1.4.1 Immunmoduláns szerek

Az MM kezelésében, 1999-ben a thalidomid volt az első új immunmoduláns szer melyet az Food and Drug Administration (FDA) engedélyezett. A lenalidomidet, második vonalbeli kezelésként (dexamethasonnal kombinálva) 2006-ban kezdték

alkalmazni, amely egy thalidomid analóg, azonban hatásosabb annál és kevésbé toxikus. Ezt követően, 2013-ban engedélyezték a harmadik generációs IMiD-et, a pomalidomidot is, mely szerkezetileg hasonló a thalidomidhoz és a lenalidomidhoz is. A pomalidomid szintén relapszusos/refrakter MM betegek kezelésére alkalmazható, azonban csak abban az esetben, amennyiben már legalább két kezelés előzte meg, melyek lenalidomidot és bortezomidot tartalmazott [16, 17].

Az IMiD-ek nem közvetlenül hatnak a myeloma sejtekre. Adhézions molekulák expresszióját csökkentve gátolják a myeloma sejtek és csontvelői stróma sejtek kölcsönhatását, valamint az oszteoklasztokra, az angiogenezisre, a transzkripció faktorok szabályozási folyamataira vannak befolyással. Rendelkeznek direkt apoptotikus hatással is, pro-apoptotikus faktorok emelkedett és anti-apoptotikus faktorok csökkent expresszióját okozzák. Képesek gátolni a különböző gyulladási citokinek termelődését, melyek serkentik az abnormális sejtek növekedését, köztük az tumor nekrozis faktor- $\alpha$ -t (TNF- $\alpha$ ) valamint az interleukin-6-ot (IL-6). (Ezen gátlás során a thalidomidnál a lenalidomid szignifikánsan hatásosabbnak bizonyult.) A vaszkuláris endotheliális faktor (VEGF) gátlása anti-angiogenikus tulajdonságuknak köszönhető, valamint az immunrendszerre is hatással vannak, serkentik a CD4 és CD8 T sejtek termelődését [16, 17].

#### *1.4.2 Proteaszóma inhibitorok*

A bortezomib az első generációs PI, melyet először 2003-ban fogadott el az FDA refrakter MM kezelésére, majd 2005-ben olyan MM betegeknek, akik már valamilyen előzetes terápiában részesültek, 2008-ban pedig első vonalbeli kezelésként hagyták jóvá. A második generációs PI közé tartozik a carfilzomib és az első orálisan alkalmazható ixazomib. A carfilzomib alkalmazása számos előnnyel jár a hatékonyságot, valamint a biztonságot illetően, mellékhatás profilja kedvező, ezen felül pedig bortezomib rezisztencia esetén is alkalmazható különböző kémiai szerkezete, biológiai tulajdonságainak köszönhetően. Ezeket követi az első orálisan alkalmazható PI, az ixazomib, mely fenntartó kezelésként is ideális lehet. További újabb generációs PI még a marizomib, oprozomib, delanzomib, melyek jelenleg klinikai vizsgálatok alatt állnak [17].

A bortezomib a 20S proteaszóma  $\beta 5$  alegységéhez, valamint az LMP7 (latent membrane protein 7) immunproteaszóma alegységéhez reverzibilisen, kovalensen kötődik, a proteaszóma kimotripszin-szerű és részlegesen a tripszin-szerű aktivitás

erős inhibitora [18]. A carfilzomib szintén a 20S proteaszóma  $\beta 5$  és az LMP7 immunproteaszóma alegységéhez kötődik kovalensen, azonban sokkal szelektívebben, mint a bortezomib, valamint irreverzibilisen gátolja a proteaszóma funkciót [18].

A proteaszóma gátlás során az egyik fő hatásmechanizmusa a NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal gátlása, mely számos immun és gyulladásos reakciók szabályozásában, tumorokhoz kapcsolódó folyamatokban is fontos szerepe játszik (apoptózisba, angiogenezisben, proliferációban és migráció). Ezen felül a bortezomib különböző apoptotikus útvonalak aktiválására is alkalmas a proteaszóma gátlása során, valamint a sejtciklus folyamatában is *in vitro* kimutatták, hogy a G2/M fázis átmenetet gátolja, mely szintén apoptózishoz vezet. Emellett a PI olyan útvonalak gátlására is alkalmasak, melyek a csontvelői mikrokörnyezetre vannak hatással, továbbá az endoplazmatikus retikulum stressz indukálásában, növekedési faktor receptorok szabályozásában, valamint celluláris degradáció folyamatában is részt vesznek [16-19].

#### *1.4.3 A myeloma kezelésében alkalmazott egyéb szerek*

A daratumumab (anti-CD38) humán IgG $\kappa$  monoklonális antitest, melynek fő célpontja a CD38 pozitív sejtek. Hatékonyak bizonyult, mind monoterápiában alkalmazva mind pedig bortezomibbal vagy lenalidomiddal [20] kombinálva újonnan diagnosztizált betegek esetén, valamint relapszusos és refrakter myelomában bortezomibbal és dexamethasonnal kombinálva szignifikáns progressziómentes túlélés (PFS) javulás volt megfigyelhető [21]. Másik jelentős anti-myeloma aktivitással rendelkező monoklonális antitest, az elotuzumab (SLAMF7 signaling lymphocytic activation molecule family member7) amely immunmoduláns szerekkel valamint proteaszóma gátlókkal kombinálva kedvező mellékhatásprofilja és hatékonysága révén ígéretesnek mutatkozik az MM kezelésében [22]. Újabb monoklonális CD38 epitóp elleni antitest az isatuximab, mely pomalidomid-dexamethasonnal kombinálva alkalmazható relabált/refrakter myeloma esetén [23].

A hiszton deacetiláz inhibitorok közé tartozó panobinostat, olyan páciensek esetén alkalmazható, akik már két hatástalan megelőző terápián átestek, melyek IMiD és PI bázisúak voltak. Ebben az esetben a panobinostat alkalmazása kombinációban alacsony dóziszú dexamethasonnal, valamint bortezomibbal javasolt. A panobinostat egyéb gyógyszerekkel való kombinációja, első vonalbeli kezelésként, valamint relapszusban még klinikai vizsgálatok alatt állnak [24].



További reményteli szerek a selinexor és venetoclax, refrakter myelomában, melyek keresik a pontos helyüket a kezelési protokollban. A selinexor, olyan relabált/refrakter myelomás betegek esetén alkalmazható, akik már legalább négy megelőző terápián átestek és akik rezisztensek legalább kétféle proteaszóma inhibitorra, imidre és antiCD38 monoklonális antitestre [25]. A venetoclax nincs elfogadva a myeloma kezelésében, azonban a t(11;14) szubtípusú citogenetikai eltéréssel rendelkező betegek esetén mutatkozott hatékonynak [25]. A legújabb klinikai kutatások közé tartozó CAR-T (kiméra antigénreceptor T-sejt) immunterápia során, genetikailag módosított T-sejteket alkalmaznak, melyek szelektíven célozzák meg az antigéneket, ezen sejtek felszínén expresszálandó antigénfelismerő domének alapján. Ezen felül a BiTE (bispecific T-cell engager) platform, a bispecifikus monoklonális antitest terápia, melynek alapja hogy az antitest két különböző antigénhez kötődik, egy a T-sejten lévőhöz és egy pedig tumor asszociált antigénhez, így irányítva a citotoxikus T sejteket a tumor sejtek felé [26].

A melphalan, cyclophosphamid, bendamustin alkiláló ágenseket, valamint a dexamethason, prednison, doxorubicin IMiD és PI szerekkel kombinálva kapják a betegek, ami a hatékonyságukat növeli, ezek továbbra is részei a myeloma elleni fegyvertárnak bár az újabb szerek mellett fokozatos háttérbe szorulásuk várható.

#### *1.4.4 Kezelési protokollok*

Myeloma esetén a tünettől rendelkező betegek kezelése (CRAB, MDE kritériumok megléte), a tünetmentes esetek sűrű monitorozása szükséges. A myeloma első vonalbeli kezelése esetén két nagyobb, a transzplantációra alkalmas (fiatalabb, 65-70 év alatti páciensek), valamint a transzplantációra nem alkalmas (idősebb, 65-70 év feletti páciensek) betegcsoport alapján történik. Számos tanulmány vizsgálja, hogy a különböző kezelési protokollok, melyek új gyógyszereket tartalmaznak, hogyan befolyásolják a PFS-t, valamint az összesített túlélés (OS-t) a már korábban alkalmazott terápiákkal szemben.

A transzplantációra alkalmas betegek kezelése általában 3-4 ciklus indukciós kezeléssel kezdődik, melyet összejt gyűjtés követ. Egyes páciensek ezt követően, azonnal autológ összejt transzplantációban (ASCT) részesülnek, míg más betegek esetén további kezelések történnek és csak az első relapszust követően végeznek ASCT-t [21]. Kezdetben a vincristin-doxorubicin–dexamethason (VAD) volt a standard terápiás protokoll ASCT előtt, azonban manapság az új szereknek

köszönhetően hatékonyabb indukciós terápiákat alkalmaznak, mely minden esetben tartalmaz egy proteaszóma gátlót vagy immunmoduláns gyógyszert, valamint kortikoszteroidot [27]. A bortezomib-cyclophosphamid-dexamethason (VCD), bortezomib-thalidomid-dexamethason (VTD) [28], bortezomib-dexamethason (VD) bortezomib-lenalidomid-dexamethason (VRD) [29] kombinációk jól alkalmazhatók, hatékonyak újonnan diagnosztizált betegek esetén. Idősebb betegek esetén, illetve neuropátia fennállása vagy rizikója (pl. amyloidosis) esetén a cyclophosphamid-bortezomib-dexamethason (CyBorDex) kezelés alkalmazható [30]. Az USA-ban már újabban egyre általánosabb a daratumumabbal kiegészített 4-es kombinációk elsővonalbeli alkalmazása (DaraVRd, DaraKRd), melyek a korábbinál mélyebb válaszokat eredményeznek jelentős toxicitásnövekedés nélkül [31]. Magyarországon a legtöbb protokollban szereplő dexamethasont valamint a bortezomibot leszámítva számos szer beszerzése nehéz, vagy nem lehetséges esetenként egyedi méltányossággal kérhetők, így hazánkban a transzplantációra alkalmas betegek kezelése VTD, VCD vagy bortezomib–doxorubicin-dexamethason (PAD) [30, 32] indukciós kezelésekkal történik [2]. Ezeken felül, plazmasejtes leukémiában vagy extramedulláris plasmocytomában jól alkalmazható a VDT-PACE (bortezomib, dexamethason, thalidomid, cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamid és etoposid), mely egy több hatóanyagot tartalmazó kemoterápia [3]. A lenalidomid magas vagy alacsony dózisu dexamethasonnal is jól alkalmazható transzplantációra alkalmas betegek esetén [33].

Transzplantációra nem alkalmas betegek kezelésének megkezdése esetén fontos tényező a beteg állapota (fittsége, mobilitása). Leggyakrabban melphalan alapú protokollt alkalmaznak, melyet ASCT-re alkalmas betegek esetén nem lehet mivel őssejt károsító hatását mutatták ki. Kezdeti terápiaként, újonnan diagnosztizált betegek esetén VRD, valamint ennek alternatívája a daratumumab-lenalidomid- dexamethason (DRD) alkalmazható [34]. Hatékonyak bizonyult a melphalan- prednison- thalidomid (MPT), lenalidomid-dexamethason (Rd), valamint kimutatták, hogy a bortezomib-melphalan-prednison (VMP) [10] kezeléssel kedvezőbb OS érhető el, továbbá a thalidomid-dexamethason (TD) [35] is hatékonyabb az idősebb pácienseknél, mint az melphalan–prednisolon (MP) kezelés, azonban a kedvezőtlen események gyakorisága nagyobb mértékben fordulhat elő [3]. Relapszus esetén az ixazomib-lenalidomid-dexamethason (IRD) kedvezőbb PFS-t eredményezett az Rd kezeléssel szemben [36].

Az MM kezelése során a citogenetikai rizikócsoportok is fontos szerepet játszanak, nagymértékben hozzájárulnak a kedvezőbb terápia kiválasztásához, melyhez különböző kezelési protokoll ajánlások vannak, külön választva a transzplantációra alkalmas és nem alkalmas betegcsoportokat [37].

#### *1.4.5 Fenntartó kezelés*

Általánosságba véve megkülönböztetünk konszolidációs és fenntartó kezelést. Előbbi a kezdeti terápiát rövid ideig követő; míg az utóbbi jóval hosszabb ideig tartó, alacsonyabb intenzitású kezelést jelent. Fenntartó terápiaként leggyakrabban alkalmazott szer, a lenalidomid [15].

Palumbo és mtsai. az alábbi ajánlásokat dolgozták ki a fenntartó kezelés alkalmazására:

- transzplantációra nem alkalmas betegek esetén még nincs érvényben fenntartó kezelés;
- thalidomid adható standard rizikójú betegeknek, azonban hosszútávú alkalmazása esetén nő a rizikója a perifériás neuropátia kialakulásának;
- lenalidomid alkalmazása esetén magas az esély egy második hematológiai malignitás kialakulására;
- bortezomib a thalidomid egy hatásos alternatívája lehet, perifériás neuropátiára kisebb a rizikó.

#### *1.4.6 ASCT*

Az ASCT az 1970-es 1980-as évek óta a 65-70 éves kor alatti betegek esetén standard kezelésnek számít. A kezelésre való felkészülés során a páciensek perifériás őssejt gyűjtésen esnek át, melyet myeloablatív kondicionálás követ és a gyűjtött őssejtek visszajuttatása. Általában az ASCT-t 4-6 ciklus kezdeti indukciós terápia előzi meg. Különböző tanulmányok eredményei, melyek legfőképpen az új terápiás szerek alkalmazására épülnek a kezelésnél azt mutatták, hogy a korai (4-6 ciklus kezelést követően azonnal) és a halasztott (relapszus esetén) ASCT esetén az OS-t illetően nem volt különbség, azonban minden beteg esetén megfontolandó melyik kezelés a legalkalmasabb számára [1, 15]. Az allogén transzplantáció fiatal, nagy rizikójú betegek esetén nagyon ritkán alkalmazható módszer [2].

#### 1.4.7 Kezelés monitorozása, kezelésre adott válasz

A kezelésre adott válasz vizsgálata általában szérum és vizelet vizsgálattal történik, mely során az M-protein szint és könnyűlánc myeloma esetén a szérum-könnyűlánc szint mérésére kerül sor. Továbbá csontvelő vizsgálat, mellyel a minimális reziduális betegséget lehet kimutatni. Non-szekretoros és extramedulláris myelomában a csontvelő vizsgálata és a képalkotók (MRI, PET) segítenek. Ezen vizsgálatokat ajánlott a kezelési ciklusokat követően elvégezni. Ha a beteg elért egy adott választ, akkor amíg nem meríti ki a progresszió definícióját, addig abban marad. A myeloma kezelésében alkalmazott egységes válaszkritériumokat az IMWG határozta meg más szervezetekkel együttműködve, melyeket időközönként felülvizsgálják, módosítanak (3. táblázat). Utoljára a minimális/mérhető reziduális betegség (MRD) fogalmával bővítették, mely molekuláris genetikai és áramlási citometrián alapuló technikákkal vizsgálható [1, 2, 38, 39].

**3. táblázat** Kezelés során meghatározott válaszkritériumok az IMWG alapján [10, 38, 40]

#### IMWG válaszkritériumok

<b>Szigorú komplett válasz (sCR)</b>	Alább definiált komplett válasz kiegészítve: normál FLC arány, valamint csontvelő biopsziából immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva klonális plazmasejtek hiánya
<b>Komplett válasz (CR)</b>	Szérum és vizelet negatív immunfixáció, lágyrész plasmocytomák eltűnése, csontvelő aspirátumban 5% alatti plazmasejt arány
<b>Nagyon jó parciális válasz (VGPR)</b>	Szérum és vizelet M-protein immunfixációval még kimutatható de elektroforézissel már nem  Szérum M-protein legalább 90%-os csökkenése, valamint 24 órás gyűjtött vizeletben az M-protein szint <100 mg/24h
<b>Parciális válasz (PR)</b>	Szérum M-protein legalább 50%-os csökkenése és 24 órás gyűjtött vizelet M-protein szintjének legalább 90%-os vagy 200mg/24h alá csökkenése  Abban az esetben, ha a vizelet és szérum M-protein szint nem detektálható az M-protein kritérium helyett alkalmazandó: legalább 50%-os csökkenés az érintett és nem érintett FLC szintek között

	Ha a fent említett módszerek egyike se alkalmazható: csontvelői plazmasejtek arányának 50%-os csökkenése szükséges, valamint lágyszövet plasmocytomák méretének 50%-os csökkenése
<b>Minimális válasz</b>	Szérum M-protein szintjének minimum 25%, de legfeljebb 49%-os csökkenése, valamint 24h vizelet M-protein szintjének 50-89%-os csökkenése. Lágyszövet plasmocytomák méretének 50%-os csökkenése is szükséges
<b>Stabil betegség</b>	nem felel meg egyéb kritériumoknak
<b>Progresszív betegség (PD)</b>	25%-os emelkedése, a legalacsonyabb megfigyelt válaszártékhez képest az alábbi kritériumoknak:  Szérum M-protein (az abszolút emelkedésnek 5g/dl-nél nagyobbak kell lennie)  Szérum M-protein emelkedés nagyobb, mint 1g/dl, ha a legalacsonyabb M komponens legalább 5g/dl volt  Vizelet M-protein (az abszolút emelkedésnek 200mg/24h-nál nagyobbak kell lennie)  Mérhetetlen vizelet és szérum M-protein szint esetén FLC figyelembevétele (az abszolút emelkedésnek 10mg/dl-nél nagyobbak kell lennie)  M-protein és FLC hiányában, csontvelői plazmasejtek aránya (az abszolút emelkedésnek 10% felettinek kell lennie)  Új csontléziók megjelenése, keringő plazmasejtek 50%-os növekedése
<b>Túlélés végpontok [40]</b>	
<b>Progressziómentes túlélés (PFS)</b>	a kezelés kezdetének időpontjától a progresszív betegség megjelenéséig vagy a halálig eltelt idő
<b>Összesített túlélés (OS)</b>	diagnózistól halálig eltelt idő

IMWG: International Myeloma Working Group; FLC: szabad könnyűlánc

### 1.5 Új prognosztikai és prediktív markerek

A myeloma multiplex esetén a betegség heterogenitása, melyet a tumor és csontvelői mikro környezet is nagymértékben befolyásol, a várható túlélés pár hónaptól akár több 10 évig is lehetséges. A nagyfokú heterogenitás magyarázatára, számos

prognosztikai markert írtak már le, azonban nehéz eldönteni, melyik igazán jelentős. Különböző próbálkozások irányulnak arra, hogy a különböző prognosztikai faktorok segítségével egységes rizikó besorolási rendszert alakítsanak ki, mellyel hatásosabban lehetne a betegeket csoportosítani, összehasonlítani.

Megkülönböztetünk prognosztikai és prediktív markereket, melyek fogalma elkülönül egymástól. A prognosztikai markerek a betegség kimeneteléről adnak információt, míg a prediktív markerek a különböző gyógyszerekről és kezelésekről, továbbá ezek hatására elért válasz és kimenetel valószínűségéről. Egy marker lehet prediktív, prognosztikai vagy mindkettő. A prediktív markerek a személyre szabott terápia esetén lehetnek hasznosak, míg a prognosztikai markerek a rizikó besorolásokhoz nyújthatnak segítséget [41].

MM esetén a prognosztikai faktorokat két csoportra oszthatjuk: a) tumor faktorok és b) host, beteg faktorok. Myeloma esetén számos a prognózissal kapcsolatban lévő markert azonosítottak és jellemeztek már, melyek többsége még az új terápiás szerek bevezetése előtti vizsgálatokból származik, azonban prediktív biomarker csak kevés van [41]. A legfontosabb tumorhoz kapcsolt faktorok a kromoszómális rendellenességek és a gén expressziós profil. Egyes IgH lókuszt érintő transzlokációk, kedvezőtlenül befolyásolják a várható túlélést. Különböző mutációk (DNS hibajavításban résztvevő gének) szintén hatással lehetnek a betegség kimenetelére. Azonban ezen eltérések nemcsak önmagukban, hanem egyéb laboratóriumi paraméterekkel (pl. a hemoglobin és a  $\beta$ 2-mikroglobulin szint) is együttesen befolyásolhatják a betegség heterogenitását, rizikó besorolását és a túlélést [42].

A génextpressziós technológiák, leginkább specifikus expressziós változások markereinek detektálására használhatók, szintén segítik a betegség prognózisának megállapítását [42]. Azonban e módszerek hátránya, hogy nem standardizáltak és a reprodukálhatóság hiánya is hatással van eredményeik pontosságára. Több nagyobb tanulmány foglalkozik az MM génextpressziós profiljával [43]. Ezek közül az egyik modell az Arkansasi Egyetemen végzett 70gén modell (University of Arkansas for Medical Sciences). Ezen vizsgálatok olyan gének azonosítására irányultak, melyek a sejtciklus szabályozásában, angiogenezisben, sejt adhézióban, migrációban és proliferációban vesznek részt [44]. A másik 15gén modell (Intergroupe Francophone du Myélome) a magas rizikójú betegeket a proliferációt szabályozó gének vizsgálatába vonta be, az alacsony rizikójú betegeket pedig a hiperdiploid kariotípus esetén

vizsgálta [45]. A két modell multivariancia analízissel történő összehasonlítása során a 70gén modell minden vizsgált csoporton szignifikánsnak mutatkozott, míg a 15gén modell csak a bortezomib vizsgálatok esetén. Azonban a két tanulmány összehasonlítása során, a vizsgálati körülmények, mérési technikák és egyéb paraméterek eltértek egymástól. Ennek folyamán a génexpressziós vizsgálatok klinikai alkalmazhatósága nem elérhető, jelenleg inkább kutatási eszközök maradnak [43]. Egy harmadik génexpressziós modell a SKY92 egy prognosztikai biomarker a két évnél rövidebb várható túlélésű, magas rizikójú betegek számára [46].

A páciensekkel kapcsolatos prognosztikai faktorok közül a legfontosabb az életkor. Az Francophone Myeloma Intergroup vizsgálata alapján a fiatalabb életkor, mint független tényező befolyásolja a hosszabb túlélést. A betegek fittségi állapota nagymértékben befolyásolhatja az alkalmazni kívánt terápia milyenségét, valamint lényeges faktor még a komorbiditások, társuló betegségek megléte [43]. A terápiára adott válasz mind a prognosztikai, mind a prediktív csoportba besorolható. A válasz mélysége és a kimenetel között lényeges, fontos kapcsolat mutatható ki, ennek folyamán a jól megválasztott kezelési stratégia hatására elért mélyebb válasz kedvezőbb kimenetelt eredményez.

Prediktív biomarkerek esete nem ennyire egyértelmű. Például a 17p13 deléció kedvezőtlen prognosztikai marker, de nem prediktív a választ, illetve a kimenetelt illetően egyik jelenleg elfogadott gyógyszerre sem. Számos olyan marker van, ami segít a betegeket rizikócsoportba sorolni, azonban olyan ajánlás, amely a terápiás válasz előre jelzésére szolgálnak a különböző csoportok esetén kevés található [41].

Különböző klinikai kutatások irányulnak, prediktív biomarkerek alkalmazásával a célzott terápiák vizsgálatára [42]. Egy tanulmány, lymphomás betegek esetén különböző markerek elemzésével kimutatta, hogy bizonyos polimorfizmus (*PSMB1* P11A, Proteasome subunit beta type-1) önmagában és más markerrel együtt is hatással lehet a kimenetelre az alkalmazott kezeléstől függően [47]. Ennek további vizsgálata myelomás betegeknél is ígéretesnek bizonyult [48]. A prediktív értékkel rendelkező biomarkerek azonosítása, valamint a kialakult rezisztencia hátterében álló génelváltozások vizsgálata, segíthet optimalizálni a relapszusos és refrakter myelomás betegek kezelését [42].

### 1.5.1 Genetikai variánsok adatbázisai

A DNS szekvencián kimutatható örökletes genetikai variánsoknak fontos szerepük van a különböző fenotípusos változások kialakulásában, valamint a különböző kórképek genetikai háttere befolyásolja a betegségekre való hajlamot, azok patogenezisét, rizikóját. Ezen variánsok azonosítása, vizsgálata hozzájárulhat a megelőzéshez, diagnózishoz valamint betegség fennállása esetén egy célzottabb kezeléshez, az arra adott válaszhoz, továbbá a személyre szabott gyógyászat fejlődésére is hatással van [49]. A humán genom nukleotid sorrendjének felállítására irányuló vizsgálat a Human Genom Projekt volt, mely 1990-ben kezdődött és 2001 februárjában hozták nyilvánosságra az első adatokat [50]. Ezt követte a 2002 októberében elindult nemzetközi HapMap projekt. Ennek során, olyan nyilvános genom adatbázis megalkotása volt a cél, amelyben megtalálhatóak gyakori egyponos nukleotid polimorfizmusok (SNP), kapcsoltsági adatok, SNP genotipizálási technikák és web-alapú eszközök az adatok tárolására és megosztására [49]. A HapMap projekt magába foglalta a teljes genom asszociációs vizsgálatokat (genome wide association study, GWAS) is. A GWAS során gyakori genetikai variánsok, legtöbbször SNP-k betegségekkel, klinikai állapotokkal való összefüggéseit vizsgálják, nagy áteresztőképességű genotipizálási módszerek alkalmazásával. Mivel az egy kromoszóma régió belüli SNP-k szoros kapcsolatban állnak, elegendő néhány jól megválasztott SNP vizsgálata, így egy betegség fennállását, ahhoz a bizonyos lókuszhoz, haplotípushoz asszociálják, ahol ezen SNP-k kódoltak. Ezen vizsgálatok kivitelezéséhez nagy segítséget nyújt a haplotípus térkép. A GWAS vizsgálatok egyik legnagyobb hibája azonban a fals pozitív összefüggések kimutatása. Ennek egyik oka lehet a hibás genotipizálás, valamint a vizsgálatokra nem alkalmazható  $p < 0,05$  szignifikancia szint, mely helyett Bonferroni korrekciót használnak a fals pozitív eredmények csökkentésére. Felmerülhet még hibaként, hogy a különböző populációk esetén az allélfrekvenciák változók. Ezáltal a vizsgálatok hibásan azonosíthatják az egyes populációs alcsoportok esetén, a betegséghez kapcsolódó géneket [51]. A <https://www.ebi.ac.uk/gwas/> honlapon publikált GWAS vizsgálatok elérhetők.

Az 1000 genom projektet 2008 és 2015 között végezték, megalkotva egy egyszerűbb szekvencia adatbázist nagyszámú, 1500 egyén szekvenálási adatai alapján, amely olyan genetikai variánsokat tartalmaz melyek a populáció 1-5%-ánál jelen vannak [51].



Az MM egy rendkívül heterogén multifaktoriális kórkép, ezáltal a kialakulására, rizikójára, a betegségre való hajlamra, valamint a betegség fennállása esetén a kimenetelre, kezelésre számos genetikai vizsgálat irányult. Olyan funkcionális jelentőséggel bíró géneken található polimorfizmusokat vizsgáltak, melyek hatással vannak az immun folyamatokra a veleszületett immunitás esetén, ezek közül is leginkább a gyulladáscsökkentő citokinek, interleukin-6 (IL-6), tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), valamint az NF- $\kappa$ B. Különböző tanulmányok irányultak arra, hogy egyes SNP-k milyen mértékben befolyásolhatják, van-e hatásuk a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP enzimek, DNS-javítás és sejtciklus valamint az apoptózist szabályozó gének (p53) működésére [52]. Egy nagy GWAS vizsgálat az MM poligénes tulajdonságának vizsgálatára irányul, melyben több kromoszómán lévő lókuszt elemez egyenként és együtt [53]. Az MM túlélésre irányuló első GWAS során a 16-os kromoszómán azonosítottak egy lókuszt, mely hatással volt az összesített túlélésre. A vizsgálat alapján az *FOPNL* (fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 onkogén partner N terminális) lókuszon lévő SNP-k, emelkedett expressziót eredményeznek, mely kedvezőtlen túléléssel lehet kapcsolatban [54].

### 1.5.2 *FOPNL* fehérje és a centroszóma MM-ben

A *FOPNL* (fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 onkogén partner N terminális) fehérje a 16p13.11 kromoszóma régióban kódolt. Hivatalos elnevezése a génnek: centroszómális protein 20 (*CEP20*), egyéb megnevezései lehetnek: *FOPNL*, *FOR20*. A *FOPNL* a FOP (FGFR1 onkogén partner) fehérje-családdal mutat nagyfokú szerkezeti hasonlóságot, melyet 4 alcsoportra oszthatunk: FOP-fehérjék, OFD1 (oral facial digital 1) fehérjék, a növényi TONNEAU1 fehérje és a *FOPNL*. Az *FOPNL* számos szövetben előforduló centroszómális fehérje, mely a sejtosztódás egyes fázisai során kimutatható a pericentrioláris anyag 1 (PCM1)-gazdag pericentrioláris térben is [55]. Fő funkciója a csillók kialakulásának, a normál ciliogenezisnek a szabályozása, valamint közvetett szerepet játszik a sejtciklus szabályozási folyamatában is. Ezeken felül hozzájárul a mikrotubulusok depolimerizációjához és a sejtmozgáshoz is [55-57].

Az *FOPNL* fehérje a csillók többlépcsős kialakulása során szükséges, hiánya a ciliogenezis teljes gátlását, vagy a csillók hosszának csökkenését eredményezheti. Kialakulásuk és lebomlásuk a sejtciklussal szoros összhangban van, részt vesznek olyan folyamatok szabályozásában, melyek a sejtek és a körülöttük lévő környezet kölcsönhatásainak feldolgozásához szükségesek [55, 58-60].

A FOPNL egy másik fő funkciója a polo-like kináz 1 (Plk1) mitotikus kináz centroszómához segítése a sejtciklus során. A Plk1 egyéb mitotikus kinázokkal együtt, nélkülözhetetlen a megfelelő kromoszóma szegregációhoz. A FOPNL szükséges ahhoz, hogy az sejtciklus az S fázison áthaladjon, hiánya zavart okozhat, mivel nincs, ami a Plk1-et oda vonzza. Kimutatták, hogy FOPNL hiányában a Plk1 expresszió önmagában nem elegendő, azonban a FOPNL működését a Plk1 nem befolyásolja, nincs rá hatással [61, 62].

A centroszóma mikrotubulus organizáló központ, normál funkciója a mitotikus bipoláris orsó irányítása a mitózis folyamán, mely elengedhetetlen a megfelelő kromoszóma szegregációhoz és a citokinézishez. A centroszóma apró organelum, két egymásra merőlegesen elhelyezkedő henger alakú centriólumból áll, melyet a pericentrioláris anyag vesz körül. A centroszóma a sejtciklus alatt csak egyszer duplikálódik, amely során mindkét leánysejt egy centroszómát kap. Maga a duplikáció folyamata szorosan kapcsolódik a sejtciklushoz és szabályozott, valamint a centroszóma is részt vesz a sejtciklus szabályozási folyamatában. Működési zavara főként tumoros megbetegedéseket illetően gyakori, mely esetén a genom nagyfokú strukturális átrendeződésen mehet keresztül, továbbá kromoszóma instabilitással is összefüggésben van. A centroszóma abnormalitások, szolid tumorok jelentős részénél, valamint leukémiák és lymphomák esetén is kimutathatók. A centroszóma rendellenességek különböző formákban lehetnek jelen: centroszómák számának emelkedése (centroszóma amplifikáció), abnormális struktúra és funkció, több centriólum, pericentrioláris anyag és a centroszómális fehérjék felhalmozódása. Szolid tumorok vizsgálata esetén a centroszóma abnormalitások és az aneuploiditás között erős pozitív korrelációt mutattak ki, amely a betegség előrehaladott állapotával és agresszív klinikai lefolyással is összefüggésben lehet [63, 64]. Myeloma multiplexet illetően a centroszóma abnormalitással foglalkozó tanulmányok egyike kimutatta, hogy a sejtenkénti átlagos centroszóma szám, MGUS-hoz és a kontroll plazmasejtekhez képest (lymphomás betegek csontvelői sejtjei), szignifikánsan emelkedett volt MM-ben [65]. Másik tanulmány vizsgálta, a plazmasejtes neoplázia egyes szakaszain (MGUS-tól az MM-ig) a centroszóma amplifikációt. Kimutatta, hogy minden esetben jelen volt eltérés, mely a betegség előrehaladásával fokozatos emelkedést mutatott. A vizsgálatok következményeképp megállapították, hogy a centroszóma amplifikáció, a myeloma patogenezisében egy korai eseménynek tekinthető [66]. A centroszóma amplifikáció egyik fő következménye az aneuploiditás. Azonban ezidáig, nincs olyan

tanulmány, amely világos összefüggést mutatott volna ki myeloma esetén a centroszóma amplifikáció és aneuploiditás vagy a kromoszómális eltéréseket illetően [63]. Az aneuploiditás a mitózis esetén multipoláris orsókat eredményez, amely osztódás szempontjából alapvetően hatástalan, ezáltal intramitotikus, posztmitotikus sejthalál következhet be vagy ezen sejtek előregednek, megakadályozva a tumornövekedést. Így az aneuploiditásnak mintegy anti-proliferatív hatása lehetséges, mely során tumorszuppresszorként is funkcionálhat. A myeloma klónok melyeknél centroszóma amplifikáció és kromoszóma rendellenességek megfigyelhetők, elveszíthetik érzékenységüket az apoptotikus szignálok iránt így nem eliminálódnak tovább negatív szelekció révén, valamint ezen sejtek esetén a gyógyszerek vagy sugárzás indukálta apoptózis aktiváció is alacsonyabb lehet [64].

A sejtciklus folyamatában és szabályozásában számos tumor asszociált fehérje vesz részt (CDK1-cyclin B, p53, Plk1, Myc stb.), melyek közül vannak olyanok, amelyek a myeloma patogenezisének alapját képező kétféle genetikai eltérés a hiperdiploiditás és IgH transzlokációs abnormalitások kialakulásában jelentős szerepet töltenek be. Szoros kapcsolat mutatható ki a centroszóma amplifikáció és az *IGH* transzlokációs eltérések között. Alacsony és magas centroszóma indexszel (CI) rendelkező tumorok génexpressziós vizsgálata során, a magas CI esetén mutattak ki túlnyomórészt magas expressziót. Ezek a gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek kapcsolatban állnak a centroszómával, sejtciklussal, proliferációval, részt vesznek a DNS javításban/G2 sejtciklus ellenőrzőpontok. [A gén expresszió alapuló index (centroszóma index CI), a fő centroszómális fehérjéket kódoló gének expresszióját foglalja magába, amelyek szoros kapcsolatot mutatnak centroszóma amplifikációval] [63]. Egy tanulmány újonnan diagnosztizált MM betegek vizsgálata során kimutatta, hogy az emelkedett CI, emelkedett centroszóma amplifikáció kedvezőtlen prognózist jelent. Továbbá azon pácienseket illetően, akiket kemoterápiával vagy ASCT-vel kezeltek és bortezomib terápiában részesült relapszusos betegeknél szignifikánsan kedvezőtlen túlélés volt megfigyelhető emelkedett CI esetén. Multivarancia analízis pedig az emelkedett CI-t független prognosztikai faktorként mutatta ki [67].

### 1.5.3 PSMB fehérjék és a proteaszóma MM-ben

Eukarióta sejtek esetén a celluláris funkció egyik lényeges eleme az intracelluláris fehérjék lebomlása, mely történhet nem specifikus módon a lizoszómákban, azonban a fehérjék nagy részének degradációját a 26S proteaszóma

komplex végzi (2. ábra). A 26S proteaszóma ATP (adenozin trifoszfát) függő proteáz, mely az ubiquitin rendszerrel együttműködve vesz részt a fehérje lebontás folyamatában, azonban számos egyéb funkciója ismert. A lebontandó fehérjék legalább négy ubiquitin monomerből álló polyubiquitin konjugációt követően kerülhetnek be a proteaszómákba. A 26S proteaszóma részt vesz a sejtciklus folyamatában, DNS javításban, immunválasz és jelátviteli folyamatok, transzkripció, metabolizmus, fehérjék minőségi ellenőrzése esetén is fontos szerepet tölt be.

A 20S rész belső kamrájában találhatóak a proteolitikusan aktív helyek ( $\beta$  alegységek), melyek a proteolízisért felelősek, és ehhez a belső részhez az  $\alpha$  gyűrűk szolgáltatják a kaput. A 19S a polyubiquitinált fehérjék felismeréséért felelős rész, mely folyamat biztosítja a szelektivitást; a külső  $\alpha$  gyűrű kinyitásáért, mely elengedhetetlen a szubsztrát 20S proteaszómába való transzlokációjáért; a szubsztrátok de-ubiquitinalizációjáért. A 14 alegységből 3  $\beta$  alegység, hidrolitikus aktivitással, különböző szubsztrát specificitású threonin proteáz katalitikus centrummal rendelkezik. Ezek az aktív helyek a proteolitikus kamra külső felszínén találhatóak, és a peptid kötések hasítását végzik a karboxil terminális végen. A  $\beta 1$  alegység kaszpáz-szerű aktivitással rendelkezik, mely a peptid kötések hidrolizálását negatív töltésű aminosav részekre végzi. A  $\beta 2$  alegység tripszin-szerű aktivitással leginkább pozitív töltésű aminosavakra, a  $\beta 5$  alegység pedig kimotripszin-szerű aktivitása révén nagy hidrofób aminosav részekre hasítja a fehérjéket [68, 69].

A gerincesek esetén további 4 különböző katalitikus  $\beta$  alegység van. Három interferon (IFN) $\gamma$ -indukálható immunproteaszóma a  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  és  $\beta 5i$ , melyek emelkedett kimotripszin és tripszin-szerű aktivitással rendelkeznek és egy tímusz specifikus  $\beta 5t$  tímuszproteaszóma, melyeknek a szerzett immunitás esetén van szerepük [18, 68, 70].

A *PSMB1* gén 6q27 kromoszóma régióban található, a proteaszóma  $\beta 6$  alegységét kódolja. Funkciójáról nagyon kevés ismeretünk van, szakirodalma is kevés. Ez az alegység nem rendelkezik proteolitikus aktivitással, azonban a 20S proteaszóma kialakulásában van jelentősége. A proteaszómák összeszerelődése az  $\alpha$  alegységek gyűrűvé alakulásával kezdődik, melyek mintegy állványként szolgálnak a  $\beta$  alegységek számára. Ezt követően csatlakoznak a  $\beta$  alegységek  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  és  $\beta 6$ , melyeket az úgynevezett Ump1 (underpinning maturation of proteasome) proteaszóma érést segítő faktor segít [68]. A  $\beta$  alegységek közül 5 ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  és  $\beta 7$ ) N-terminális propetiddel szintetizálódik, melyek az összeszerelődés végső lépése során tűnnek el. Szekvenciájuk nem konzervatív, és hosszúságuk is különbözik. Ezek közül csak a  $\beta 5$

alegység propeptid deléciója végzetes, a többi esetleges deléciója nem befolyásolja nagy mértékben a  $\beta$  alegységek helyes pozíciójának kialakulását. A nem katalitikus alegységek szükségesek a threonin rész kialakulásához, valamint ezen katalitikus központokat védik az acetilációtól és az inaktivációtól is [18, 68]. Ezen felül, egy 2019-es tanulmányban kimutatták, hogy a *PSMB1* vírus indukálta veleszületett immunválasz során negatív szabályozóként működik. A vizsgálat során a *PSMB1* túlzott expressziója hatására a vírus indukálta IFN promotor aktivációja gátolt volt, míg a *PSMB1* elcsendesítése során emelkedett termelődést mutatott [71].

A malignus plazmasejtek transzkripciós faktorok aktivitásának hatására gyors proliferációra képesek, valamint nagy mennyiségű abnormális immunglobulint termelnek és szekretálnak. Az ubiquitin proteaszóma rendszernek, a proteaszóma 26S alegysége meghatározó eleme [72]. Fontos szerepe van az intracellulárisan felhalmozódott, fel nem tekeredett fehérjék valamint a toxikus fehérjék lebontási folyamatának szabályozásában [73]. Az MM kezelés során a proteaszóma gátlás fehérje felhalmozódáshoz, endoplazmatikus retikulum stresszhez és végül sejthalálhoz vezet. A myeloma sejtek apoptózisát szelektíven indukáló proteaszóma inhibitorok, a 26S proteaszóma alegységének gátlása során érik el [72].

## 2. Célkitűzések

Munkánk során a myeloma multiplex esetén korábban a nemzetközi irodalomban azonosított *FOPNL* és *PSMB1* polimorfizmusok vizsgálatát tűztük ki célul egy klinikailag jól jellemzett MM betegcsoportban.

1. A myeloma túlélésre irányuló első GWAS vizsgálat során kedvezőtlen prognosztikai faktorként azonosított *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus genetikai vizsgálata magyarországi beteg és egészséges kontroll egyének mintáin. Vizsgálni kívántuk hatással van-e a variáns allél a klinikai jellemzőkre (nem, életkor, ISS, citogenetikai abnormalitások), az MM-ben szenvedő betegek esetén.
2. Vizsgálati tervünk része, a meghatározott *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus prediktív hatásának felderítése (az összesített túlélés, valamint a progressziómentes túlélés számítása különböző kezelésben részesült MM betegcsoportok esetén).
3. Egy új, feltételezhetően a myeloma kezelése során alkalmazott bortezomib kezelésre ható *PSMB1* rs12717 polimorfizmus genetikai vizsgálata myeloma multiplexben szenvedő betegcsoporton, valamint klinikai jellemzők (nem, életkor, ISS, citogenetikai abnormalitások) elemzése a különböző genetikai variánsok esetén.
4. *PSMB1* rs12717 polimorfizmus prediktív hatásának vizsgálata (az összesített túlélés, valamint a progressziómentes túlélés számítása különböző kezelésben részesült MM betegcsoportok esetén).
5. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus funkcionális vizsgálata egészséges egyének mintáin. A vizsgálattal arra kerestük a választ, hatással van e a polimorfizmus a proteaszómák szerkezetének kialakulására, proteolitikus aktivitásaira valamint, hogy a bortezomib gátlás során a proteolitikus aktivitások hogyan alakulnak az egyes genetikai variánsok esetén.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Vizsgált egyének

Vizsgálataink során a betegcsoportot csak kezelést igénylő myeloma multiplexes betegek alkották, a smouldering myelomában szenvedő betegeket nem vontuk be.

Az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus vizsgálatát 373 MM-ben szenvedő betegcsoporton végeztük el. A betegek diagnózisa és követése a Dél-pesti Centrumkórházban történt 2005 és 2013 közötti időszakban. A vizsgálat során az rs72773978 polimorfizmus magyarországi allélfrekvenciájának meghatározásához a kontroll csoport 112 egészséges véradóból állt. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmust illetően, 211 MM beteget vontunk be a vizsgálatba. A betegek diagnózisa és követése a Dél-pesti Centrumkórházban történt 2007 és 2013 közötti időszakban. A proteaszóma és *PSMB1* expresszió és funkciójának vizsgálatát 7 egészséges önkéntes egyén mintáján végeztük el. A betegek és egészséges egyének tájékoztatáson alapuló beteg beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

A klinikai adatfeldolgozás retrospektív módon történt: az alkalmazott kezelési protokollok függtek a beteg állapotától, hogy transzplantációra alkalmas-e, valamint meghatározó volt az is, hogy a beteg milyen citogenetikai rizikócsoportba tartozott [10, 13, 41]. Az alkalmazott terápiákat két nagyobb csoportra osztottuk. A bortezomib alapú kezelések a következő terápiás megközelítések: bortezomib-thalidomid-dexamethason (VTD) [28]; bortezomib-melphalan-prednison (VMP) [10]; bortezomib–doxorubicin-dexamethason vagy bortezomib–cyclophosphamid–dexamethason (PAD+VCD) [30, 32]; bortezomib-dexamethason (VD) [74]. A nem bortezomib alapú protokollok: cyclophosphamid–thalidomid–dexamethason vagy thalidomid-dexamethason [35]; vincristin–doxorubicin–dexamethason (VAD) [27]; melphalan–prednisolon (MP), lenalidomid–dexamethason [13].

A különböző kezelésekre adott válasz, az egyes terápiás ciklusokat követő vizsgálatok alapján határozható meg [38]. A terápia a legjobb válasz eléréséig történik, mely után a betegek rendszeres monitorozása ajánlott az esetleges relapszus, valamint a különböző szövődmények megelőzése céljából. Megfigyeléseink során terápiás válasz megjelenésének értékeltük a komplett választ (CR), nagyon jó parciális választ

(VGPR), parciális választ (PR) valamint a minimális választ (MinR), míg a terápiás válasz hiányának a stabil és a progresszív betegséget.

## 3.2 Molekuláris genetikai vizsgálatok

### 3.2.1 Nukleinsav izolálás

A genomiális DNS izolálás etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) vagy Na-citráttal alvadásgátolt perifériás vérből vagy csontvelőből történt, Gentra Puragene Blood kittel (Qiagen), a gyártó utasításainak megfelelően. A mintákat  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.2.2 Valós idejű PCR

#### 3.2.2.1 FOPNL rs72773978

Az FOPNL polimorfizmus (CEP20 c.227-897T>A intronikus, aminosavcserét nem eredményező SNP) vizsgálata, valós idejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel történt, LightCycler 480II (Roche) készüléken. A méréshez használt amplifikációs primerek és hibridizációs próbák, melyeket LightCycler Probe Design szoftverrel (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) terveztünk, az alábbiak voltak: forward primer: 5'-TGA TGG GAG GCA GTG AG-3'; reverz primer: 5'-GGG AAG CTT GAT CTG TGT TT-3'; anchor próba: 5'-Cy5-AGG CAG TGA TGC TAG TGA TGG GC-foszfát; szenzor próba: 5'-GCC AAC AGG AGG CAG AGC-fluoreszcein. A PCR a következő összetevőket tartalmazta: PCR MyTaq<sup>TM</sup> Mix (Bioline, Bio-25042, Taunton, USA) a gyártó leírásának megfelelően, 25ng genomiális DNS, ezen kívül a primerek eltérő koncentrációban, forward:  $0,25\mu\text{M}$ , reverz:  $0,75\mu\text{M}$  valamint a jelölt oligonukleotidokat azonos arányban ( $0,4\mu\text{M}$ ). A PCR a kezdeti denaturációt követően 70 ciklusból állt, amelyet  $35^{\circ}\text{C}$ -ről  $85^{\circ}\text{C}$ -ig tartó olvadási görbe analízis követett. A két hibridizációs próba közül a szenzor a szekvencia variábilis (polimorfizmust tartalmazó) részére illeszkedik. A szenzorhoz képest az anchornak jóval magasabb az olvadási hőmérséklete, így az olvadáspont analízis kizárólag a szenzortól függ. A 70 ciklusos ( $95^{\circ}\text{C}$  20 mp,  $55^{\circ}\text{C}$  30 mp,  $72^{\circ}\text{C}$  45 mp) PCR-ben keletkező termékek olvadási görbe analízise során a készülék a hőmérsékletet fokozatosan emelte  $35^{\circ}\text{C}$ -ről  $85^{\circ}\text{C}$ -ra folyamatos fluoreszcencia mérés mellett. Bázis eltérés esetén az polimorfizmusra illeszkedő szonda olvadáspont csökkenést okoz, amelynek segítségével az rs72773978 allél genotípusa meghatározható.



### 3.2.2.2 *PSMB1* rs12717

A *PSMB1* rs12717 variánst (c.31C>G nukleotid csere cDNS szinten; p.Pro11A vagy P11A aminosavcsere) a fentebb leírt módszerhez hasonlóan határoztuk meg. A reakció során alkalmazott amplifikációs primerek és hibridizációs próbák az alábbiak voltak: forward primer: 5'- GTG AGA CAG CAA GTG TCG -3'; reverz primer: 5'- GTG ACT CCT AAA TAG GCT TCA G -3'; szenzor próba: 5'- GGC TCC TGG CAG AGA CTT GG – fluoreszcein; anchor próba: 5' - Cy5- ATG GAA CCG CAC AGA GCC G - foszfát. A valós idejű PCR során a reakcióelegy az amplifikációs primereket eltérő koncentrációban tartalmazta: forward 0,15  $\mu$ M; reverz 0,5  $\mu$ M; továbbá 25 ng genomiális DNS-t és egyenként 0,25  $\mu$ M koncentrációjú jelölt oligonukleotidot tartalmazott MyTaq<sup>TM</sup> Mix-szel (Bioline, Bio-25042, Taunton, USA). A PCR körülmények az alábbiak voltak: kezdeti denaturáció 3 perc 95°C-on, 70 ciklus mely 95°C-on denaturációval kezdődött, az annealáció 50°C-on majd az extenzió 72°C-on történt, végül az olvadási görbe analízis 40°C-80°C-ig.

### 3.3 Proteaszóma expresszió és funkció vizsgálata

A vizsgálatok az Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat, Természettudományi Kutatóközpontjában történtek.

#### 3.3.1 *Proteaszóma és PSMB1* expresszió vizsgálata

A proteaszóma expresszió és funkció vizsgálata során, a *PSMB1* rs12717 polimorfizmust illetően, homozigóta C/C és G/G genotípusú egészséges egyének (3 férfi és 4 nő, átlag életkor: 42 $\pm$ 8 év) mintájával dolgoztunk. Az EDTA-val alvadástól teljes vért 1%-os paraformaldehiddel 37°C-on 5 percig fixáltuk. Centrifugálást (500g, 5 perc) és PBS-es (foszfát pufferelt sóoldat, phosphate-buffered saline) mosást követően, 10 másodperc 37kHz, 50/100W szonikáció történt. Következő lépésként, a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk, majd poliklonális nyúl anti-*PSMB1* (1:80, Biomol, Hamburg, Germany) vagy anti-proteaszóma 20S  $\alpha$ + $\beta$  antitestekkel jelöltük (1:100, Abcam, Cambridge, UK). Az alkalmazott antitestek az alábbi sejttípus specifikus markerekkel voltak konjugálva: phycoerythrin (PE) konjugált anti-CD3 (1:200), PE konjugált anti-CD14 (1:100), vagy Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP) konjugált anti-CD19 (1:100). Az antitestekkel az inkubáció mindegyik esetben 37°C-on 40 percig történt. Mosást követően a sejteket, Alexa Fluor 488-konjugált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (H+L) (1:100, Life Technologies) antitesttel inkubáltuk 37°C-on, 30 percig. Mosás után, 2,5  $\mu$ M

DRAQ5-t (Biostatus, Shepshed, UK) tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk a sejteket. Az optikai interferencia elkerülése miatt, amikor a PerCP-konjugált markert alkalmaztuk, a DRAQ5 festést kihagytuk. A sejteket FACSCanto II áramlási citométerrel vizsgáltuk 488nm hullámhosszon (emissziós filterek az alábbiak voltak: 488/10, 585/42, 670LP és 660/20 nm). A mérés során szekvenciális kapuzást alkalmaztunk, így először a DRAQ5 festett sejtek szelektálódtak (kivéve az anti-CD19). A további kapuzás az előre és oldalra szórt fény alapján történt. A T-sejtek CD3, B-sejtek CD19, valamint a monocyták azonosítása CD14 jelölés alapján történt. A granulocyták azonosítása kizárólag a szórt fény intenzitása szerint történt. A relatív anti-PSMB1 és anti-proteaszóma 20S jelölés kifejezése a medián fluoreszcencia intenzitásokkal történt, azon medián értékekkel elosztva, amelyeket a másodlagos antitestekkel kaptunk (autofluoreszcencia kontroll).

### 3.3.2 Proteaszóma funkció vizsgálata

A vizsgálatot, perifériás vér mononukleáris sejtjeiből végeztük, melyeket sűrűség gradiensén alapuló centrifugálással izoláltunk, 1200-as fordulatszámon 20 percig, (Leucoprep Lymphocyte Separation Media, Intron Biotechnology, Dél-Korea). Ezt követően 3-szor mostuk a sejteket sóoldattal, majd 40mM Tris-t, 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM β-mercaptoethanol és 10% glycerolt tartalmazó pufferral lizáltuk. Szonikációt követően, eltávolítottuk a sejttermelést, majd Bradford-módszerrel mértük a fehérjekoncentrációt és 2,5mg/ml-re állítottuk be. A lizátumok kimotripsin-szerű, kaspáz-szerű és tripszin-szerű aktivitását Proteasome Activity Fluorometric Assay Kit II (UBPBio) kittel határoztuk meg, a gyártó utasításainak megfelelően, melynek során 30μl lizátumhoz 120μl puffert adtunk, amely tartalmazta a fluorogén peptid szubsztrátot. A bortezomib gátlás vizsgálatához, a reakció indítása előtt, a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig előinkubáltuk a gyógyszerrel. A fluoreszcens termék keletkezését (460nm), fluoreszcens tálcá leolvasóval határoztuk meg. A specifikus aktivitást a görbe kezdeti emelkedése és a minta fehérje koncentrációja alapján határoztuk meg.

### 3.4 Fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálat (FISH)

A vizsgálatok a Dél-pesti Centrumkórház Citogenetikai Laboratóriumában történtek. A vizsgálat során fluoreszcensen jelölt próbákat alkalmaztunk csontvelői sejteken, melyek alapján az alábbi citogenetikai abnormalitások voltak kimutathatók: t(11;14), t(4;14), t(14;16) *IGH* transzlokációk, 13q és 17p deléción, 1q amplifikáció

valamint hiperdiploid eltérések. A kromoszóma rendellenességek szerint a betegek két nagy csoportját különböztettük meg: magas rizikójúnak (MR) tekintettük azokat, akiknél t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p) és 1q amp volt kimutatható, a többi beteget pedig a standard rizikójú (SR) csoportba soroltuk. A *FOPNL* csoportnál 373 betegből 346 esetében volt elérhető FISH eredmény, míg a *PSMB1* vizsgálat során 211 betegből 194 esetében.

### 3.5 Statisztikai feldolgozás

A nem folyamatos változók összehasonlítására khi-négyzet vagy Fischer tesztet alkalmaztunk. A folyamatos változók vizsgálata pedig Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis teszttel történt. A polimorfizmusok esetén a kontroll és betegcsoportnál az allélfrekvenciát 95% konfidencia intervallummal adtuk meg (95%CI). A progressziómentes túlélést (PFS) az első kezelési ciklust követően és az összesített túlélést (OS) Kaplan-Meier görbékkel vizsgáltuk, az eredményeket log-rank teszttel hasonlítottuk össze. Multivariancia analízis Cox-regresszióval történt. A vizsgálatokhoz SPSS (20.0 verzió) program csomagot használtuk (SPSS, IBM Corp., Armonk, NY). A *PSMB1* expresszió, proteaszóma funkció összehasonlítására a különböző csoportok esetén Student t-tesztet alkalmaztunk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4.1 FOPNL rs72773978

#### 4.1.1 FOPNL rs72773978 polimorfizmus és klinikai jellemzők

373 MM-ben szenvedő betegcsoporton végeztük el a vizsgálatot. A teljes csoporton a polimorfizmus az alábbi eloszlást mutatta: homozigóta AA genotípusú volt 328 (87,9%) egyén, heterozigóta AT 43 (11,5%) és homozigóta TT 2 (0,5%) beteg volt. A vizsgálati csoport allélfrekvenciája ( $AF \pm 95\%CI$ )  $6,3 \pm 1,8\%$  volt, míg az egészséges kontroll csoport esetén is hasonló minor allélfrekvencia volt megfigyelhető ( $6,3 \pm 3,2\%$ ). A National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbSNP adatbázisban található eredmények esetén sem volt különbség (variáns allélfrekvencia: 6,67%). A homozigóta TT egyének alacsony száma miatt a további vizsgálatokat, domináns modell alkalmazásával végeztük: az AT genotípusú betegeket összevontunk a TT minor variánst hordozókkal. Vizsgálataink során az alábbi klinikai jellemzőket vettük figyelembe: nem, életkor, ISS, citogenetikai eltérések. A férfiak 188 (50,4%) és nők 185 (49,6%) aránya közel azonos volt. Az átlag életkor  $60,5 \pm 11,2$  év volt. Az ISS megállapítása minden esetben a diagnózis felállításával egy időben történt. ISS1-es 103 (30,6%), ISS2-es 88 (26,2%) és ISS3-as csoportba 145 (43,2%) beteg tartozott. A citogenetikai eltéréseket illetően, 27 esetben nem volt elérhető FISH eredmény így az összehasonlításokat 346 betegnél végeztük el. 282 betegnél volt kimutatható eltérés, 64 beteg esetén pedig a rendelkezésre álló fluoreszcens próbák alkalmazásával nem volt citogenetikai eltérés kimutatható. A betegek 72%-át a standard rizikójú, míg 28%-át pedig magas rizikójú citogenetikai rizikó csoportba soroltuk. Figyelembe véve a betegek klinikai paramétereit, egyik esetben sem volt szignifikáns különbség az FOPNL minor allélhordozást illetően (4. táblázat).

#### 4.1.2 FOPNL rs72773978 polimorfizmus és a terápia kimenetele

A betegek nagy része ( $n=241$ , 64,6%) bortezomib alapú (PI) kezelést kapott, míg a többi páciens nem bortezomib (nem-PI) alapú terápiában részesült. A PI csoportban szignifikánsan gyakoribb volt variáns allélhordozás, mint a nem-PI csoportban (15,4% vs. 6,1%,  $p=0,008$ ) (4. táblázat). Az IMiD alapú terápiát figyelembe véve (thalidomid vagy lenalidomid) nem volt különbség megfigyelhető, a minor allélhordozást illetően. További csoportosítás esetén, a variáns allél

gyakorisága, az eltérő terápiás protokollokban nem különbözött: PI és IMiD párosítás (VTD) esetén 14,8% volt; csak PI kezelésnél, IMiD nélkül (PAD, VCD, MPV vagy VD) 15,9% ( $p=0,86$ ); csak IMiD esetén 6,6%, és ha a kezelés nem PI vagy IMiD alapú volt 5,4% volt ( $p=0,69$ ) (5. táblázat).

**4. táblázat** Betegcsoport jellemzői az *FOPNL* rs72773978 genotípusok szerint

<i>FOPNL</i>	AA		AT&TT		p érték		
	n	n	%	n		%	
<b>Teljes csoport</b>	<b>373</b>	<b>328</b>	<b>87,9%</b>	<b>45</b>	<b>12,1%</b>		
<b>Kor</b>	373	328	60,46±11,2	45	60,35±10,9	0,773	
<b>Nem</b>	373						
<b>Férfi</b>		188	165	87,8%	23	12,2%	1
<b>Nő</b>		185	163	88,1%	22	11,9%	
<b>ISS</b>	336						
<b>1</b>		103	91	88,3%	12	11,7%	0,309
<b>2</b>		88	73	82,9%	15	17,1%	
<b>3</b>		145	130	89,7%	15	10,3%	
<b>FISH</b>	282						
<b>Hiperdiploid</b>		86	80	93,0%	6	7,0%	0,13
<b>Tx pozitív</b>		99	86	86,9%	13	13,1%	0,72
<b>MR</b>		97	84	86,6%	13	13,4%	0,71
<b>Kezelés</b>	373						
<b>Bortezomib alapú</b>		241	204	84,7%	37	15,3%	0,008
<b>Nem bortezomib alapú</b>		132	124	93,9%	8	6,1%	
<b>ASCT</b>	373						
<b>Igen</b>		206	181	87,9%	25	12,1%	1
<b>Nem</b>		167	147	88,0%	20	12,0%	
<b>Kezelésre adott válasz</b>	360						
<b>CR</b>		142	117	82,4%	25	17,6%	0,088
<b>VGPR</b>		65	59	90,8%	6	9,2%	
<b>PR</b>		115	106	92,2%	9	7,8%	
<b>NR/PD</b>		38	34	89,5%	4	10,5%	

ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; CR: komplett válasz; ISS: International Staging System; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; MR: magas rizikójú citogenetikai abnormalitások; NR/PD: nincs válasz/progresszív betegség PR: Parciális válasz; Tx pozitív: IgH transzlokáció pozitív citogenetikai abnormalitások; VGPR: Nagyon jó parciális válasz;

A MM első vonalban adott kezelése minden esetben a legjobb válasz eléréséig folytatódott, ezt követően a transzplantációra alkalmas betegeknél ASCT történt. A betegeket két csoportra osztva az ASCT kezelés jelenlététől függően,

hasonló minor allélfrekvencia volt megfigyelhető, valamint ennek alapján tovább vizsgálva a PI és nem-PI alcsoportokat sem volt különbség (6. táblázat).

**5. táblázat** Kezelési csoportok összehasonlítása az *FOPNL* rs72773978 genotípusok alapján

<i>FOPNL</i>	AA		AT&TT		p érték	
	n	%	n	%		
<b>PI</b>	373	113 95	84,1%	18	15,9%	0,86
<b>PI+IMiD</b>		128 109	85,2%	19	14,8%	
<b>IMiD</b>		76 71	93,4%	5	6,6%	0,69
<b>nem-PI/IMiD</b>		56 53	94,6%	3	5,4%	

PI: proteaszóma inhibitor; IMiD: immunmoduláns szerek

**6. táblázat** ASCT és kezelések összehasonlítása az *FOPNL* rs72773978 genotípusok alapján

<i>FOPNL</i>	AA		AT&TT		p érték	
	n	%	n	%		
<b>ASCT&amp;PI</b>	373	151 128	84,8%	23	15,1%	1
<b>ASCT PI nélkül</b>		90 76	84,4%	14	15,6%	
<b>ASCT&amp;IMiD</b>		55 53	96,4%	2	3,6%	0,47
<b>ASCT IMiD nélkül</b>		77 71	92,2%	6	7,8%	

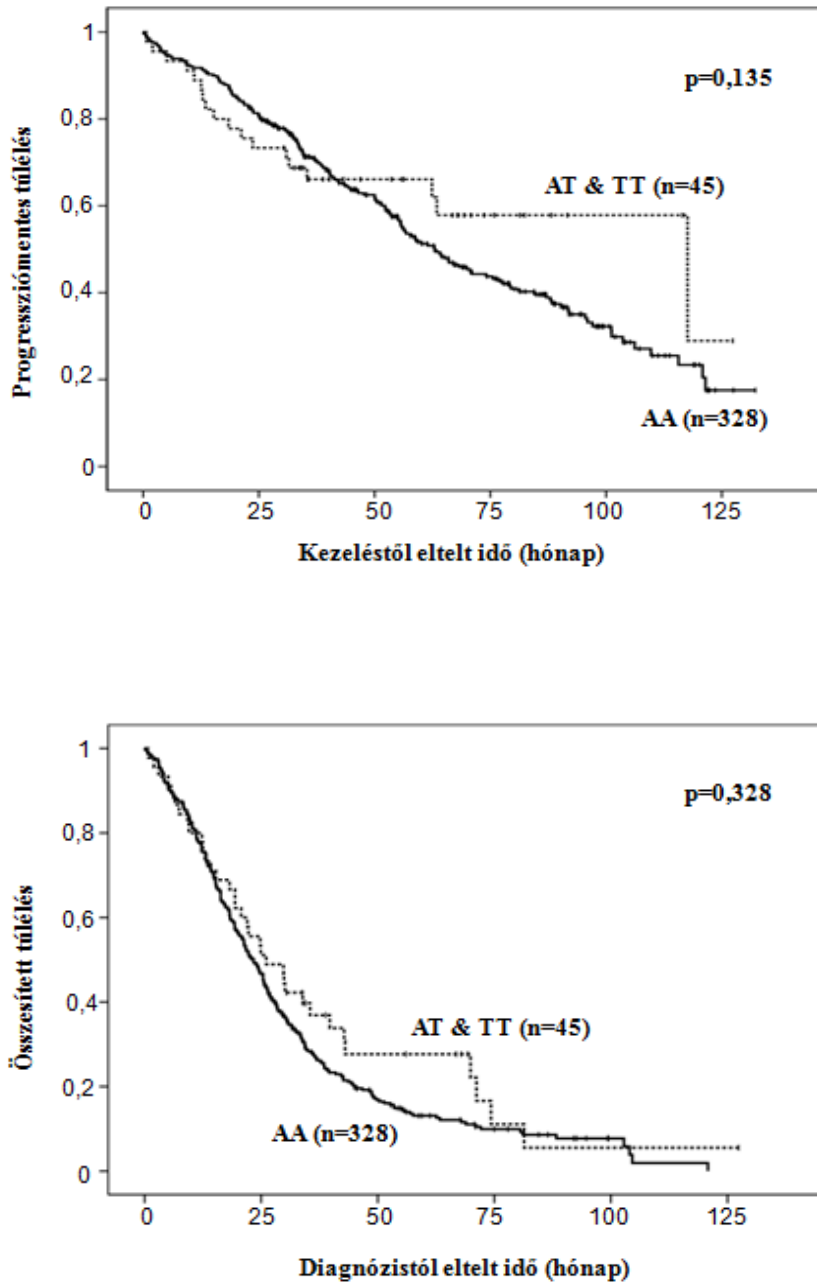
ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; PI: proteaszóma inhibitor; IMiD: immunmoduláns szerek

A teljes csoportot figyelembe véve, a betegek 39,4%-a érte el a CR-t, 18,1% a VGPR-t, 31,9% PR-t és 10,6%-nál NR/PD volt. A terápiára adott választ illetően, nem volt különbség a vad típusú és az *FOPNL* variánst hordozók között ( $p=0,088$ ). Azonban, a PI alapú terápiás alcsoport vizsgálata során, szignifikánsan több *FOPNL* hordozó ért el CR-t, mint a vad típusú betegek (66,7% vs. 47,7%;  $p=0,047$ ). Ez a megfigyelés a nem-PI alcsoport esetén már nem volt érvényes (12,5% vs. 18,8%;  $p=1$ ).

Az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus progressziómentes (PFS) és összesített túlélésre (OS) gyakorolt hatását vizsgálva a teljes csoporton, azt tapasztaltuk, hogy a variáns allélhordozás nincs hatással sem a PFS, sem pedig az OS alakulására (PFS:  $p=0,135$ ; OS:  $p=0,328$ ) (3. ábra).

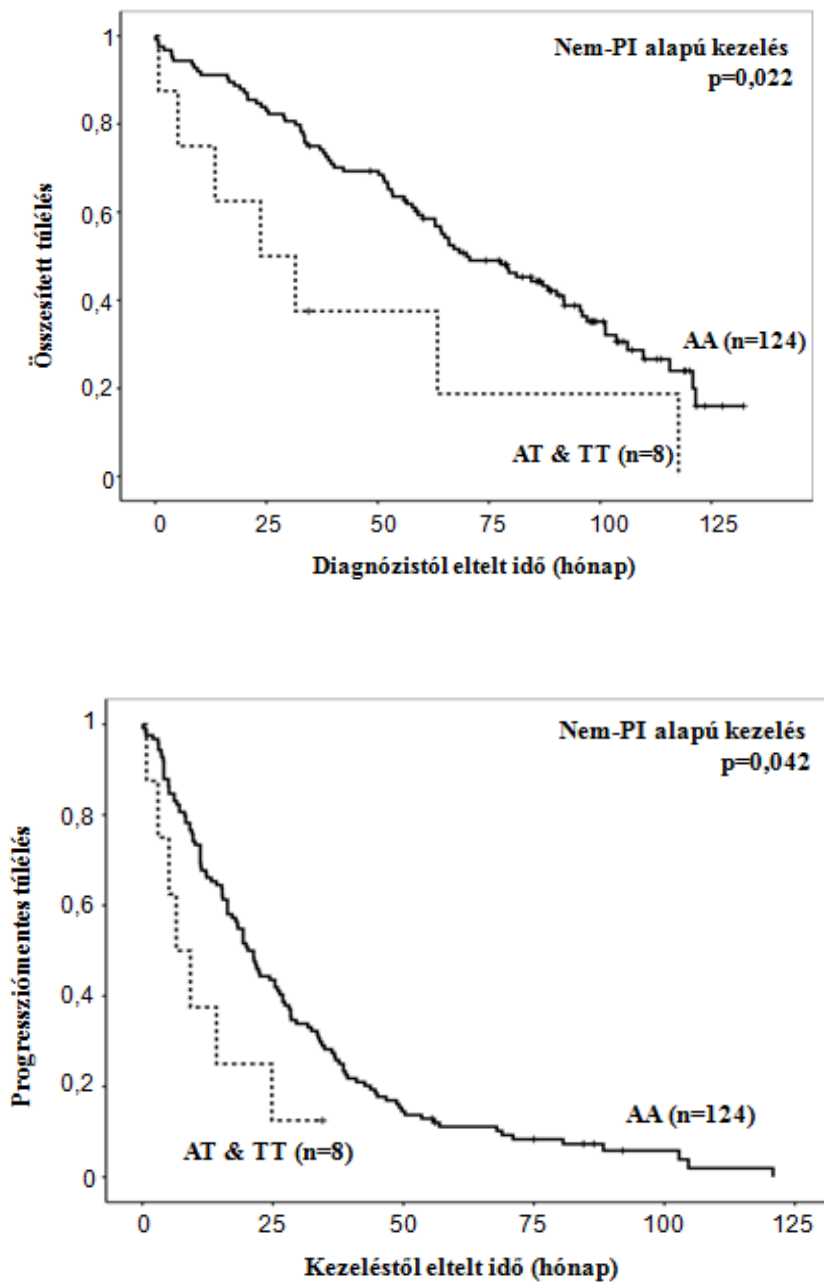
A továbbiakban a *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus kezelés kimenetelét befolyásoló hatását különböző kezelési alcsoportokban is megvizsgáltuk, mivel a polimorfizmus jelenléte statisztikai interakciót mutatott a bortezomib kezeléssel, mind a PFS és mind az OS-t illetően (PFS:  $p=0,011$ ; OS:  $p<0,001$ ). A nem-PI alapú terápiában részesülő betegeknél a minor allélhordozás esetén szignifikánsan kedvezőtlen PFS és OS volt kimutatható [medián PFS: 20,2 (16,8-23,6) hónap a vad típus esetén, ezzel szemben 6,5 (0,8-12,2) hónap a hordozók esetén,  $p=0,042$ ]; medián OS: 70,0 (53,3-86,7) hónap vad típusnál és 23,7 (0-48,7) hónap variáns esetén,  $p=0,022$ ] (4. ábra).

Érdekes módon, a PI alapú kezelést kapott betegek esetén ellentétes tendencia volt kimutatható [medián PFS: 24,6 (21,8-27,4) hónap vad típus esetén, míg 30,1 (19,6-40,6) hónap a hordozóknál  $p=0,082$ ]. Hasonlóan az előző eredményekhez, az OS-t illetően a variáns allél esetén szignifikánsan kedvezőbb kimenetel volt megfigyelhető [medián OS: 55,6 (48,8-62,3) hónap vad típus esetén, míg 120 hónapos követést követően sem volt elérhető a variáns allélt hordozó betegeknél,  $p=0,048$ ] (5. ábra). Hasonló módon vizsgálva az IMiD alapú terápia hatását a PFS és OS esetén, nem volt különbség az *FOPNL* variánst hordozók és nem hordozó csoportok között.

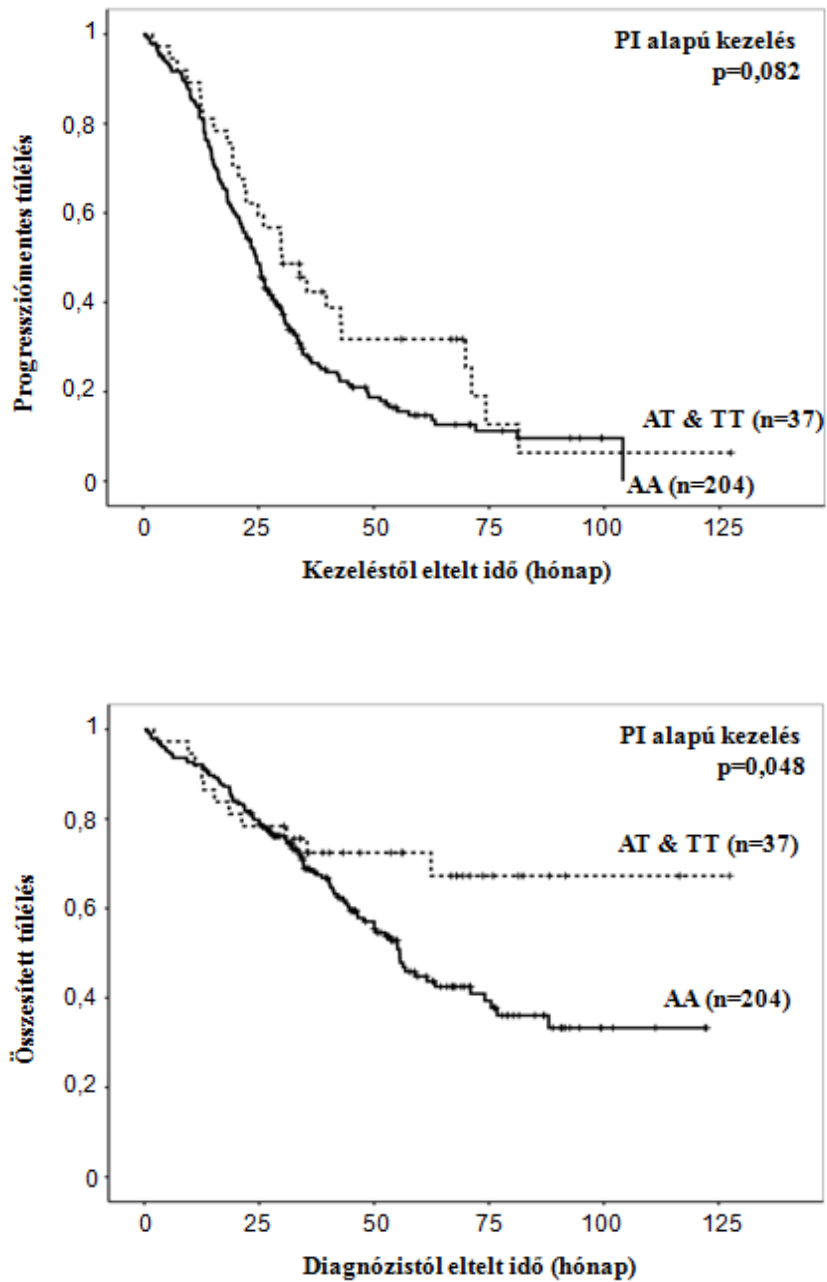


**2. ábra** Progressziómentes túlélés (PFS, felső ábra) és összesített túlélés (OS, alsó ábra) Kaplan-Meier elemzése az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus szerint, a teljes vizsgálati csoporton. Nem volt eltérés az egyes genotípusokat illetően.

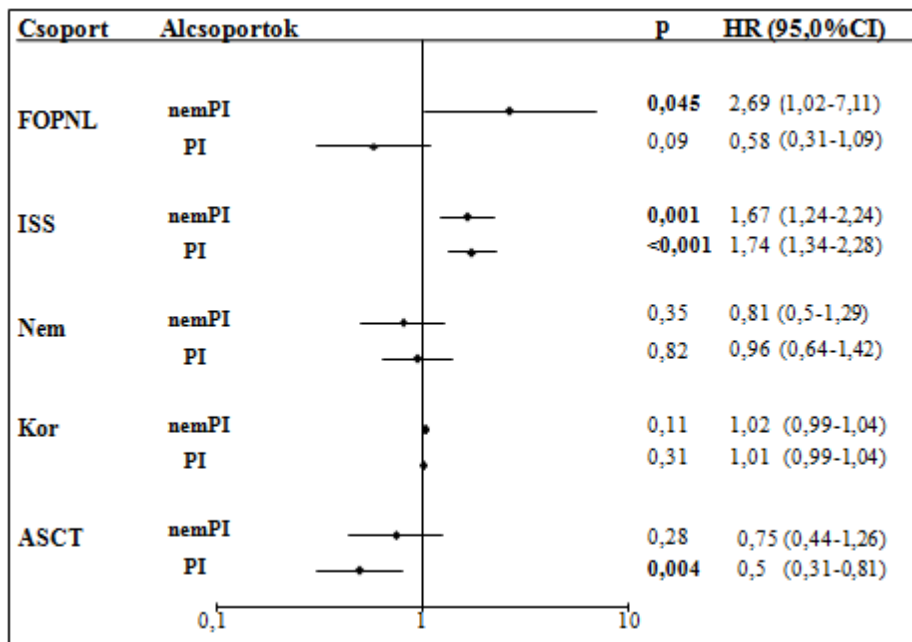
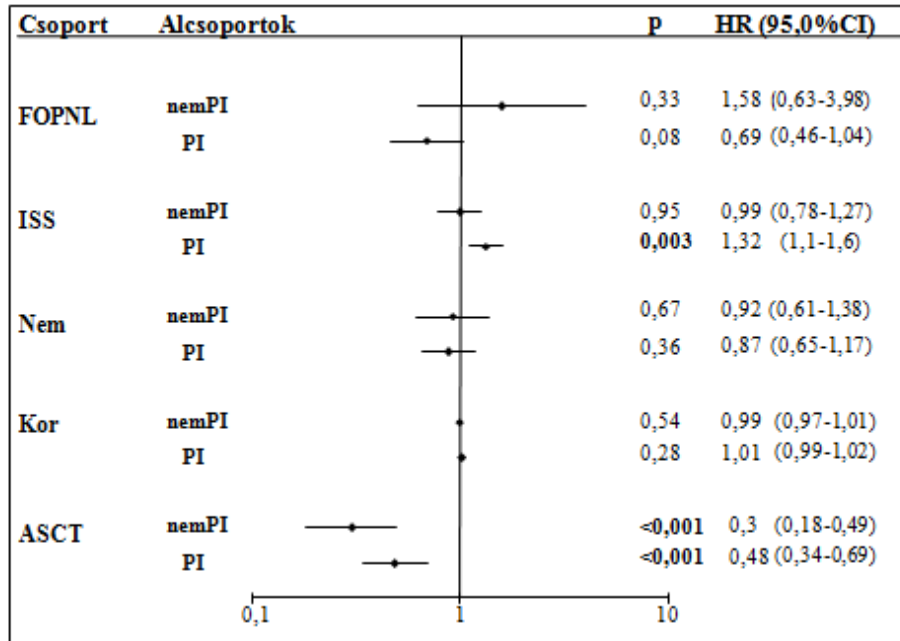




**3. ábra** Progressziómentes túlélés (PFS, felső ábra) és összesített túlélés (OS, alsó ábra) Kaplan-Meier elemzése az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus szerint, a nem bortezomib alapú terápiában részesülő betegcsoporton. Mindkét esetben a minor allél hordozása kedvezőtlenebb prognózissal társult.



**4. ábra** Progressziómentes túlélés (PFS, felső ábra) és összesített túlélés (OS, alsó ábra) Kaplan-Meier elemzése az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus szerint, a bortezomib alapú terápiában részesülő betegcsoporton. A PFS esetén nem volt különbség, míg az OS esetén a variáns allélhordozás kedvezően befolyásolta a túlélést.



**5. ábra** Progressziómentes túlélés (PFS, felső ábra) és összesített túlélés (OS alsó ábra) multivariancia elemzés összehasonlítása a különböző, bortezomib (PI) és nem bortezomib (nem-PI) alapú terápiában részesülő betegcsoportokon. Az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus független rizikó faktornak bizonyult a nem-PI kezelést kapott csoport esetén, míg ellenkező hatás figyelhető meg a bortezomib terápia esetén. ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; CI: konfidencia intervallum; *FOPNL*: fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 onkogén partner N terminális; HR: hazard ratio; ISS: International Staging System; PI: proteaszóma inhibitor

Multivariancia analízis során (Cox-modell), vizsgálva az életkort, nemet, ISS-t és ASCT-t a *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus hordozása független rizikófaktornak bizonyult az OS-t illetően a nem-PI kezelt betegcsoportnál (PFS:  $p=0,33$ ; HR: 1,58; 95%CI: 0,63-3,98; OS: $p=0,045$ ; HR: 2,69; 95%CI: 1,02-7,11) A PI kezelt betegcsoport tekintetében azonban, tendencia volt megfigyelhető az ellentétes irányban (PFS:  $p=0,08$ ; HR: 0,69; 95%CI: 0,46-1,04; OS:  $p=0,09$ ; HR: 0,58; 95%CI: 0,31-1,09) (6. ábra). Betegcsoportunkban tehát az *FOPNL* polimorfizmus eltérő prediktív hatást mutatott az alkalmazott kezeléstől függően.

## 4.2. *PSMB1* rs12717 polimorfizmus

### 4.2.1 *PSMB1* rs12717 polimorfizmus és klinikai jellemzők

A genotípus eloszlás a vizsgált 211 MM páciens esetén az alábbi volt: 84 (39,8%) beteg homozigóta C/C, 95 (45%) heterozigóta C/G és 32 (15,2%) homozigóta G/G (táblázat). A betegcsoport esetén a variáns allélfrekvencia AF:  $37,7 \pm 4,7\%$  volt, amely nem különbözött, az 1000 Genome Project vizsgálat során a kaukázusi referencia populáción meghatározottól (AF:  $40,7 \pm 7,0\%$ ), vagy a National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbSNP adatbázisban található eredményektől (AF: 34,8-46,0%) [75]. A betegek klinikai paraméterei esetén, kor, nem, ISS, FISH, egyik esetben sem volt szignifikáns különbség az *PSMB1* minor allélhordozást illetően (7. táblázat).

### 4.2.2 *PSMB1* rs12717 polimorfizmus és a terápia kimenetele

Bortezomib alapú kezelésben részesült, 154 (72,9%) beteg, 57 (27,1%) pedig egyéb nem bortezomib alapú terápiaiban. A PI csoportban a variáns allélfrekvencia szignifikánsan alacsonyabb volt (55,8% vs. 71,9%  $p=0,05$ ). A PI alapú csoportban, 83 beteg bortezomib-thalidomid-dexamethason (VTD), 45 beteg pedig melphalan-prednisolon-bortezomib (MPV), 20 beteg bortezomib-doxorubicin-dexamethason (PAD) esetben alkalmaztunk, és 6 beteg bortezomib-dexamethason (VD) kezelést kapott. Nem bortezomib alapú kezelések esetén cyclophosphamid-thalidomid-dexamethason terápiát 36 beteg, vincristin-doxorubicin-dexamethason (VAD) 8 beteg, lenalidomid-dexamethason 3 páciens és melphalan-prednisolon (MP) 10 beteg kapott. különböző kezelési alcsoportokban nem volt különbség megfigyelhető, sem az allélfrekvenciákat, sem pedig az egyes genotípusú csoportokat illetően (7. táblázat).

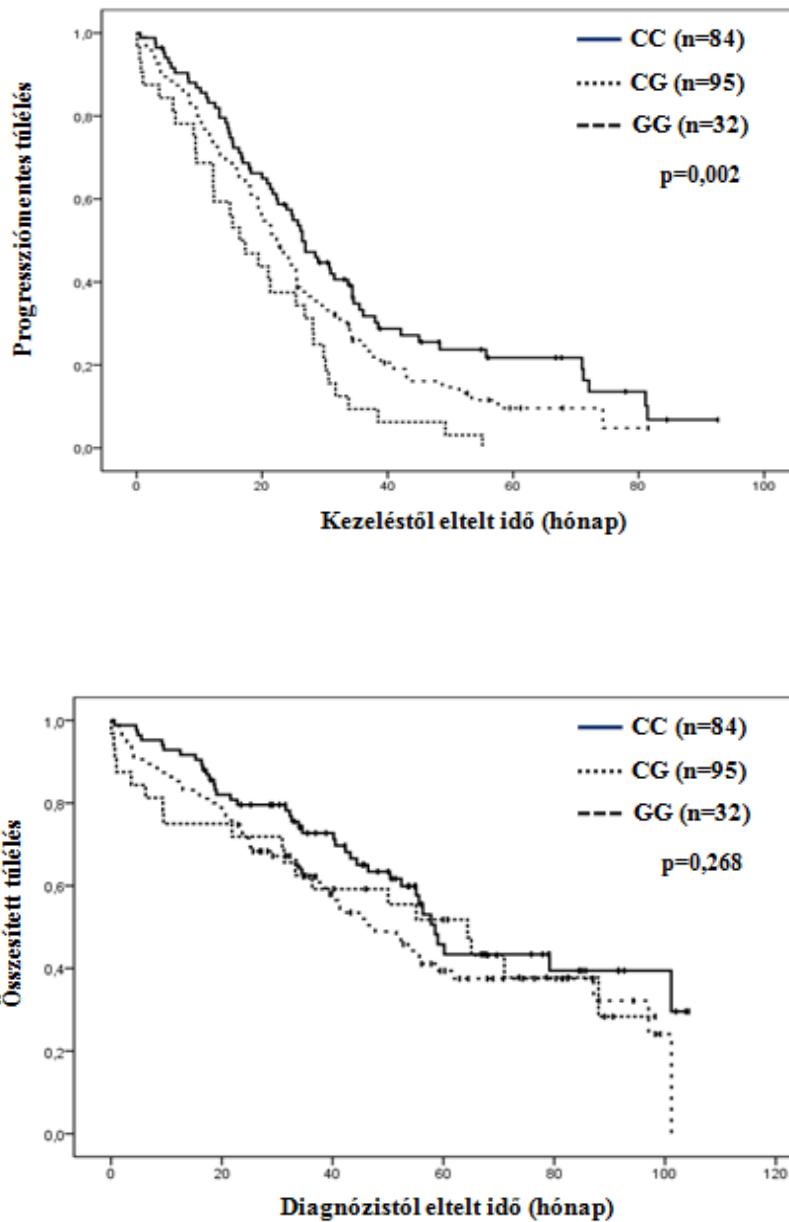
6. táblázat Vizsgált betegcsoport jellemzői a *PSMB1* rs12717 genotípusok szerint

<i>PSMB1</i>	CC		CG		GG		p érték	
	n	n	%	n	%	n		%
<b>Teljes csoport</b>	211	84	39,8%	95	45,0%	32	15,2%	
<b>Kor</b>		63 (28-84)		64 (32-84)		62,2 (49-84)		0,306
<b>Nem</b>								
<b>Férfi</b>	105	42	40,0%	49	46,7%	14	13,3%	0,745
<b>Nő</b>	106	42	39,6%	46	43,4%	18	17,0%	
<b>ISS</b>								
<b>1&amp;2</b>	105	38	36,2%	52	49,5%	15	14,3%	0,419
<b>3</b>	104	45	43,3%	42	40,4%	17	16,3%	
<b>FISH</b>								
<b>SR</b>	133	50	37,6%	57	42,9%	26	19,5%	0,067
<b>MR</b>	61	27	44,3%	30	49,2%	4	6,6%	
<b>Kezelés</b>								
<b>Bortezomib alapú</b>	154	68	44,2%	67	43,5%	19	12,3%	0,05
<b>Nem bortezomib alapú</b>	57	16	28,1%	28	49,1%	13	22,8%	
<b>VTD</b>	83	33	39,8%	39	47,0%	11	13,3%	0,8
<b>PAD</b>	20	11	55,0%	6	30,0%	3	15,0%	0,303
<b>MPV</b>	45	21	46,7%	20	44,4%	4	8,9%	0,339
<b>VD</b>	6	3	50,0%	2	33,3%	1	16,7%	0,836
<b>Thal</b>	36	10	27,8%	17	47,2%	9	25,0%	0,111
<b>Len</b>	3	1	33,3%	2	66,7%	0	0,0%	0,667
<b>VAD</b>	8	2	25,0%	5	62,5%	1	12,5%	0,588
<b>MP</b>	10	3	30,0%	4	40,0%	3	30,0%	0,399
<b>ASCT</b>								
<b>Igen</b>	111	45	40,5%	52	46,8%	14	12,6%	0,546
<b>Nem</b>	100	39	39,0%	43	43,0%	18	18,0%	
<b>Kezelésre adott válasz</b>								
<b>CR</b>	87	41	47,1%	34	39,1%	12	13,8%	0,151
<b>VGPR</b>	41	13	31,7%	25	61,0%	3	7,3%	
<b>PR</b>	65	23	35,4%	30	46,2%	12	18,5%	
<b>NR/PD</b>	14	5	35,7%	5	35,7%	4	28,6%	

ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; CR: komplett válasz; ISS: International Staging System; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; MR: magas rizikójú citogenetikai abnormalitások; Len: lenalidomid; MP: melphalan-prednisolon; MPV: melphalan-prednison-bortezomib; NR/PD: nincs válasz/progresszív betegség; PAD: bortezomib-doxorubicin-dexamethason; PR: Parciális válasz; SR: standard rizikójú citogenetikai abnormalitások; Thal: thalidomid; Tx pozitív: IgH transzlokáció pozitív citogenetikai abnormalitások; VAD: vincristin-doxorubicin-dexamethason; VD: bortezomib-dexamethason; VGPR: Nagyon jó parciális válasz; VTD: bortezomib-thalidomid-dexamethason.

A bortezomib alapú terápiában részesülő páciensek esetén magasabb volt a transzplantáltak aránya (59,1%), amely annak tudható be, hogy az ASCT-re alkalmas betegek kezelése VTD protokoll alapján történt, míg a rosszabb állapotban lévő betegek egyéb terápiában részesültek. Az ASCT betegeknél az allélfrekvencia  $36,0 \pm 6,4\%$ , míg akiknél nem került sor ASCT-re  $39,5 \pm 6,9\%$  volt. A kezelésre adott választ elemezve a betegek 41,2%-a ért el CR-t, 19,4% VGPR-t, 30,8% PR-t és 6,6% NR-t. 4 beteg nem került be a vizsgálatba korai halálozás miatt. Az egyes válaszok és a különböző genotípusok között nem volt kapcsolat megfigyelhető.

További vizsgálataink a túlélés végpontokra irányultak, volt-e szignifikáns hatása a variáns allél hordozásának. A teljes betegcsoportot elemezve C/G és G/G genotípusú páciensek progressziómentes túlélése szignifikánsan kedvezőtlenebb volt, míg az OS-t illetően nem különböztek az eltérő genotípusú csoportok [medián PFS: 23,4 (20,7-26,1) hónap  $p=0,002$ ; medián OS: 55,7 (49,6-61,8) hónap  $p=0,268$ ] (7. ábra).



**6. ábra.** Progressziómentes túlélés (PFS, felső ábra) és összesített túlélés (OS, alsó ábra) Kaplan-Meier elemzése az *PSMB1* rs12717 polimorfizmus szerint, a teljes vizsgálati csoporton. A variáns allél hordozása a PFS esetén szignifikánsan kedvezőtlenebbnek bizonyult, OS esetén nem volt különbség megfigyelhető

Ezt követően alsó csoport analízist végeztünk, melyet statisztikai interakció vizsgálat előzött meg. A teszt alapján a *PSMB1* genotípussal szignifikáns interakció volt a FISH alsó csoport esetén PFS-nél ( $p=0,044$ ), valamint ISS esetén az OS-nél



( $p=0,022$ ). A bortezomib kezelést, továbbá az ASCT-t illetően nem volt bizonyítható interakció.

Ezt követően az alcsoportok elemzését végeztük el. Az ISS esetén az 1&2 és a 3-as csoport esetén is kedvezőtlenül befolyásolta a PFS-t a minor allél, míg az OS-t illetően csak az ISS3-as csoportnál volt ez megfigyelhető. A többi alcsoport esetén egyetlen esetben sem volt kimutatható különbség az OS-t illetően, azonban a PFS elemzéseknél a variáns allélt hordozó betegeknél egyes csoportokban kedvezőtlenebb hatás volt kimutatható (8. táblázat).

**7. táblázat** Progressziómentes túlélés (PFS) és összesített túlélés (OS) a különböző alcsoportokon vizsgálva, *PSMB1* rs12717 genotípusok szerint

		PSMB1 P11A			
		C/C	C/G	G/G	P
<b>PFS</b>					
<b>ISS</b>					
<b>1&amp;2</b>	38 (13,4-62,6)	25,5 (19,2-31,8)	26,8 (17,7-35,9)	0,04	
<b>3</b>	24,9 (19,1-30,7)	18,2 (7,8-28,6)	9,4 (4,9-13,8)	0,005	
<b>FISH</b>					
<b>SR</b>	34,4 (28,0-40,1)	24,2 (20,5-27,9)	16,4 (7,5-25,3)	<0,001	
<b>MR</b>	18,2 (10,6-25,8)	18,2 (12,6-23,8)	21,0 (12,1-29,9)	0,356	
<b>Bortezomib</b>					
<b>Nem</b>	22,5 (15,2-29,8)	19,3 (16,7-21,9)	17,3 (6,6-27,9)	0,387	
<b>Igen</b>	26,4 (20,1-32,6)	24,2 (20,4-28,0)	16,4 (6,3-26,5)	0,006	
<b>ASCT</b>					
<b>Nem</b>	15,4 (12,7-18,1)	15,3 (6,4-24,2)	12,2 (3,7-20,7)	0,31	
<b>Igen</b>	34,6 (29,1-40,1)	27,4 (22,4-32,4)	21,3 (13,2-29,4)	0,006	
<b>OS</b>					
<b>ISS</b>					
<b>1&amp;2</b>	NR	87,1 (47,6-126,6)	NR	0,391	
<b>3</b>	52,4 (39,5-65,3)	29,2 (14,6-43,8)	21,8 (0-51,1)	0,012	
<b>FISH</b>					
<b>SR</b>	NR	52,3 (39,7-64,9)	64,4 (28,5-100,3)	0,038	
<b>MR</b>	43,2 (27,6-58,8)	41,3 (25,1-57,5)	50,0 (0-105,9)	0,513	
<b>Bortezomib</b>					
<b>Nem</b>	58,5 (56,1-60,8)	39,5 (12,7-66,3)	65,1 (19,9-110,3)	0,597	
<b>Igen</b>	NR	47,7 (31,7-63,6)	55,1 (23,5-86,6)	0,513	
<b>ASCT</b>					
<b>Nem</b>	40,2 (25,7-54,6)	25,1 (9,3-40,9)	64,4 (0-139,3)	0,541	
<b>Igen</b>	79,2	56,0 (20,2-91,8)	55,1 (23,1-87,1)	0,331	

A táblázatban a medián túlélési értékek vannak megadva hónapban. ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; ISS: International Staging System; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció; MR: magas rizikójú citogenetikai abnormalitások; NR: not reached, SR: standard rizikójú citogenetikai abnormalitások;

Multivariancia analízis során a teljes betegcsoporton, figyelembe véve a kort, ISS-t, FISH-t, bortezomib kezelést, valamint az ASCT-t a G/G variáns allél hordozása független rizikófaktor volt a PFS esetén. Homozigóta G/G betegek progressziómentes túlélése, összehasonlítva a C/C genotípusú betegekével, szintén szignifikánsan kedvezőtlenebbül alakult, míg a C/G vs. C/C összehasonlítás során, tendencia volt megfigyelhető. Az OS elemzése során, a C/G és C/C genotípusú csoportok esetén volt szignifikáns különbség, mely a homozigóta genotípusokat illetően nem volt kimutatható (9.táblázat).

**8. táblázat** Progressziómentes túlélés (PFS) és összesített túlélés (OS) multivariancia elemzése a teljes vizsgálati csoporton, a *PSMB1* rs12717 polimorfizmus szerint

	PFS			OS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
<b>Kor</b>	1,005	0,987-1,024	0,554	0,998	0,976-1,021	0,872
<b>ISS</b>	1,36	1,120-1,652	0,002	1,904	1,466-2,473	<0,001
<b>FISH</b>	1,647	1,178-2,303	0,004	1,606	1,076-2,396	0,02
<b>Bortezomib</b>	1,013	0,711-1,444	0,942	0,998	0,644-1,546	0,991
<b>ASCT</b>	0,518	0,353-0,761	0,001	0,479	0,295-0,776	0,003
<b>PSMB1</b>			0,002			0,041
<b>PSMB1 C/G vs. C/C</b>	1,327	0,950-1,855	0,97	1,718	1,122-2,629	0,013
<b>PSMB1 G/G vs. C/C</b>	2,293	1,458-3,604	<0,001	1,57	0,876-2,811	0,129

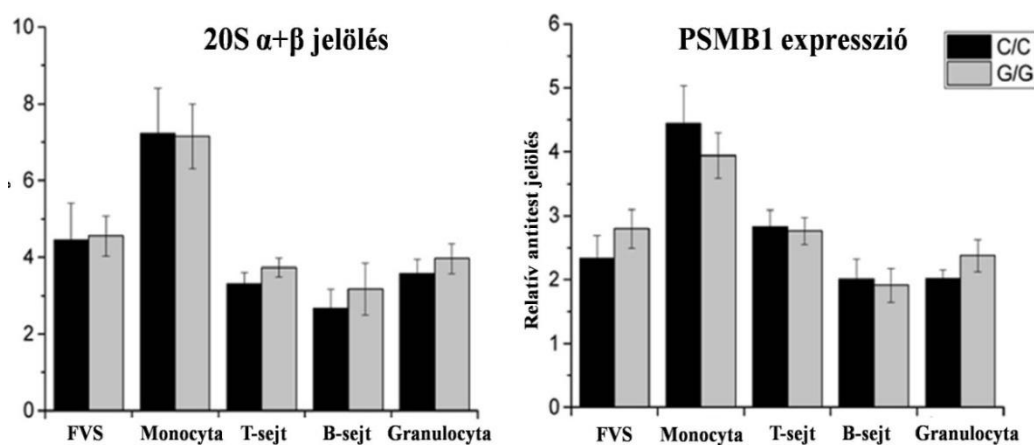
ASCT: autológ őssejt-transzplantáció; CI: konfidencia intervallum; HR: hazard ratio; ISS: International Staging System; FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció;

#### 4.2.3 *PSMB1* rs12717 funkcionális vizsgálata

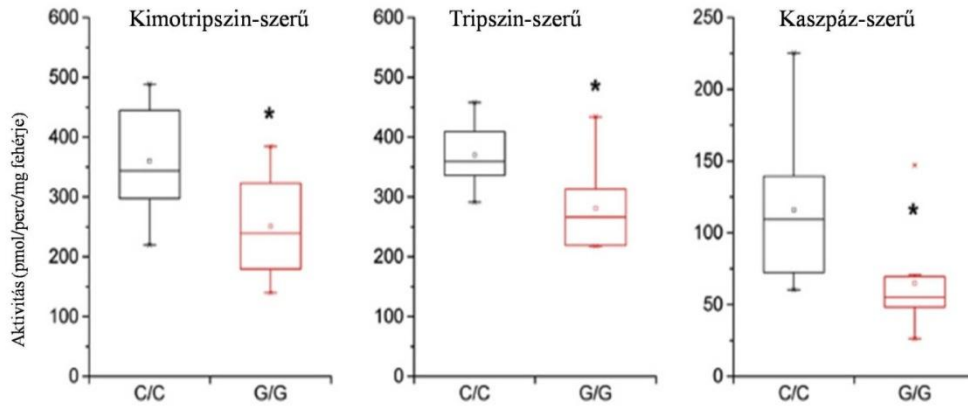
A méréseket homozigóta C/C és G/G genotípusú, egészséges egyének perifériás véréből végeztük el. Meghatároztuk a proteaszómák mennyiségét majd vizsgáltuk a *PSMB1* expressziót, hatással lehet-e bármelyikre a *PSMB1* polimorfizmus, befolyásolhatja-e bármelyiket. A fehérvérsejteket, valamint a különböző, izolált sejttípusokat vizsgálva (monocyta, T-, B-sejtek, granulocyta) a 20S ( $\alpha+\beta$ ) proteaszóma mennyiségek nem különböztek az egyes genotípusok esetén. Továbbá a *PSMB1* expressziót illetően, a homozigóta C/C és G/G genotípusú csoportok között sem volt különbség az egyes fehérvérsejt alcsoportok esetén sem (8.ábra).

A proteaszómák 20S alegységének proteolitikus aktivitásának vizsgálata (kimotripszin-, tripszin- és a kaszpáz-szerű aktivitás) a G/G genotípusú egyéneknél alacsonyabbnak bizonyultak a C/C genotípusú egyének eredményeihez képest. Ezen tulajdonság feltehetően a proteaszóma funkció szelektív csökkenését eredményezheti a *PSMB1* P11A variáns allélt hordozó egyéneknél (9.ábra).

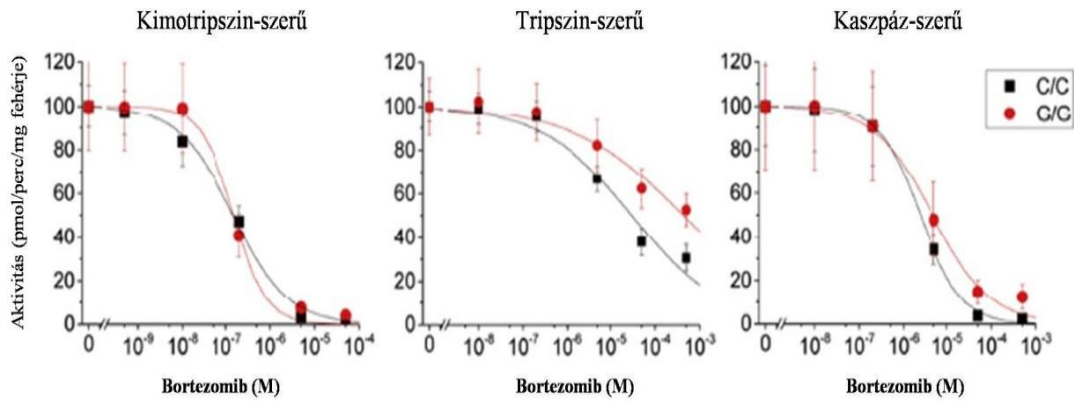
A bortezomib gátló hatása *in vitro* a proteaszómák kaszpáz-szerű aktivitását illetően, a homozigóta C/C genotípusú egészséges egyének esetén háromszor magasabb volt, mint a G/G genotípust hordozó egyéneknél (a bortezomib azon koncentráció értéke, mely 50%-os gátlást eredményez  $IC_{50}$  G/G: 2,05 vs.  $IC_{50}$  C/C: 6,07  $\mu$ M). A bortezomib gátló hatásában a különbség a tripszin-szerű aktivitás esetén sokkal kifejezettebb volt, az  $IC_{50}$  értékek egy nagyságrenddel tolódtak el ( $IC_{50}$  G/G: 44,4 vs.  $IC_{50}$  C/C: 462  $\mu$ M). A kimotripszin-szerű aktivitás esetén nem volt eltérés a különböző genotípusokat illetően ( $IC_{50}$  G/G: 0,146 vs.  $IC_{50}$  C/C: 0,150  $\mu$ M) (10. ábra).



**7. ábra** A 20S proteaszóma mennyiségi (bal oldali ábra) és a PSMB1 expresszió vizsgálata (jobb oldali ábra) C/C és G/G genotípusú egyének fehérvérsejt alcsoportjain A vizsgált sejt típusokat illetően (fehérvérsejt, monocyt, T-, B-sejt, granulocyt) nem volt eltérés a proteaszóma mennyiségek esetén (bal oldali ábra), valamint a PSMB1 expresszió sem különbözött (jobb oldali ábra) FVS: fehérvérsejt, PSMB1: Proteasome subunit beta type-1 [76].



**8. ábra** Proteolítikus aktivitás vizsgálat *PSMB1* P11A C/C és G/G genotípusok esetén. A vizsgált aktivitások minden esetben a G/G genotípusú egyének mintáin alacsonyabbak [76].



**9. ábra** A bortezomib in vitro vizsgált relatív gátló hatása, a proteaszóma egyes proteolítikus aktivitásai esetén. Csökkent tripszin-szerű és kaszpáz-szerű proteolítikus aktivitás figyelhető meg a variáns allél (G/G) esetén [76].

## 5. Megbeszélés

### 5.1 FOPNL

Munkánk során a *FOPNL* rs72773978 polimorfizmust vizsgáltuk, hogy hatással van-e az MM prognózisára. A *FOPNL* rs72773978 polimorfizmust korábban egy nagy esetszámú (n=1635), az MM túlélésre irányuló első GWAS vizsgálat részeként [54] kedvezőtlen prognosztikai faktorként írták le (csökkentett összesített túlélést eredményezett). Vizsgálataink során a teljes betegcsoporton elemezve nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az rs72773978 polimorfizmus hordozást illetően sem az OS, sem pedig a PFS esetén. Vizsgálataink szerint, az eltérés fő oka a betegcsoportokban alkalmazott különböző kezelések, a bortezomib kezelés bevezetése volt. Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző PI és nem-PI alapú terápiák esetén változott a polimorfizmus prognosztikai hatása az összesített és progressziómentes túlélést illetően is. A bortezomib alapú protokollok alkalmazása során a *FOPNL* minor allél hordozás szignifikánsan kedvezően befolyásolta az OS-t, valamint a PFS esetén is tendencia volt megfigyelhető. Ezzel szemben a nem bortezomib alapú terápiáknál ellentétes hatás volt megfigyelhető. Bár Ziv és mtsai. [54] vizsgálata kiterjedt a különböző kezelési protokollokra is, az SNP hatását nem elemezte külön csoportosítva az immunmoduláns szereket és proteaszóma gátló gyógyszereket. Ennek háttérében az állhat, hogy bortezomibot csak a vizsgálati csoportuk kis részén alkalmazták (306 fős csoport esetén 33,6% és a 239 fős csoportnál 1,3 % volt). Érdekes módon, megismételve a vizsgálatot egy összevont nagyobb multicenter kohorszon (n=1080, amelyben a PI kezelésre vonatkozó adatok nem voltak ismertek), az eredmény azt mutatta, hogy a variáns allél hatása a túlélésre kevésbé volt kifejezett az eredeti csoport megállapításához képest [54]. Ezen eredmények közötti különbség lehetséges magyarázata az lehet, hogy az általunk vizsgált csoportban a bortezomib kezelt betegek aránya jóval magasabb volt.

Ziv kitért tanulmányának korlátaira is, melyek közül egyik lehetett a betegek nem konzekutív beválogatása. Azonban azt találta, hogy a diagnózist követően korán (0-5,9hónap) vagy későn (6-11,9 vagy 12-23,9 hónap) beválasztott betegek esetén a kedvezőtlen hatás nem változott. Vizsgálataink során a variáns allél frekvenciáját illetően különbség volt megfigyelhető a bortezomib alapú és nem bortezomib alapú kezelt betegek között (15,4% vs. 6,1%), mely részben azzal magyarázható, hogy a nem

bortezomib bázisú terápiás alcsoportba az *FOPNL* variánssal rendelkező betegek, halálozás miatt már a beválogatást megelőzően nem kerültek be.

További három további tanulmány irányult az *FOPNL* variáns prediktív hatásának vizsgálatára. Erickson egy másik, de szintén az *FOPNL* génen található polimorfizmus (rs7184559) esetén vizsgálta az összesített túlélést. Különböző kezelési protokollokat figyelembe véve (TT2: Totál terápia 2, mely nem PI alapú kezeléseket csoportosít és TT3 melybe a PI alapú kezelések tartoznak) nem talált szignifikáns kapcsolatot az *FOPNL* variáns allél és a kedvezőtlen OS között [77]. Johnson négy különböző kohorsz esetén multivariancia (Cox-modell) analízisben végezve a vizsgálatokat, figyelembe véve a kort, nemet, ISS-t és a kezelést, nem tudta alátámasztani Ziv és mtsai. megfigyelését az rs72773978 polimorfizmussal kapcsolatban [78]. A legfrissebb vizsgálat 871 fős, svéd MM betegcsoporton történt, mely szerint az összesített túlélés és az *FOPNL* génen található rs72773978 polimorfizmus között nincs szignifikáns kapcsolat [79]. Ezen megerősítő tanulmányok, vizsgálatok végzésére nagyobb hangsúly kellene, különösen az olyan betegségek esetén, melyek kezelése heterogén lehet. Továbbá, esetünkben az *FOPNL* variáns kedvezőtlen hatásának megerősítése a nem PI kezelt betegek alcsoportján azt mutathatja, hogy az *FOPNL* fehérjének szerepe lehet az MM patogenezisében és kezelésében egyaránt.

Az *FOPNL* (vagy CEP20) a centroszómában található fehérje. A centroszóma egy mikrotubulus organizáló központ, melynek egyik fő szerepe a mitózis folyamán elengedhetetlen a normál kromoszóma szegregációhoz. Működésének zavara során, leggyakrabban tumorok esetén aneuploidia, különböző kromoszóma rendellenességek és jelentős strukturális változások a genomban figyelhetők meg. A centroszóma amplifikáció során tehát előfordulhat számbeli, méretbeli, funkcionális és strukturális eltérés is [64, 66]. Centroszóma amplifikáció számos szolid tumornál jelen van, valamint leukémiákban és lymphomákban is megfigyelték. Érdekes módon már MGUS esetén is kimutatható, amely valószínűsíti, hogy a centroszóma amplifikáció a myeloma patogenezisének egy korai része lehet. A centroszóma amplifikációt MM esetén, mint kedvezőtlen prognosztikai faktor írták le [54, 64, 66, 67]. Ziv három tanulmány génexpressziós adatainak vizsgálata során szignifikáns kapcsolatot talált a túlélést illetően, az emelkedett *FOPNL* expresszió és a magasabb centroszóma index között. Ez alapján feltételezhető, hogy az *FOPNL* variáns kedvezőtlen kimenetele transzkripciós stabilitással vagy transzkripciós szabályozással is lehet kapcsolatban

[54]. A centroszóma zavarainak jeleit és a kromoszóma instabilitást azonban, nem állt módunkban a hagyományos citogenetikai módszereinkkel vizsgálni. FISH eredményeink alapján a hiperdiploid és a különböző IgH transzlokációk, valamint az egyéb kromoszóma rendellenességek gyakorisága nem különbözött az *FOPNL* variánst hordozók és vad típusú MM betegek között.

A pontos mechanizmus, hogyan is eredményez az *FOPNL* variáns eltérő választ a terápiára, nem ismert; így a proteaszóma gátló szerek esetén kimutatott ellentétes hatás magyarázata csupán csak feltételezett lehet. Az *FOPNL* fehérje szerepet játszik abban, hogy a polo-like kináz 1-et (Plk1) a centroszómához toborozza [61, 62], mely szükséges a ciliogenezishez, centroszómák éréséhez, a mikrotubulusok szerveződéséhez valamint a sejtciklus szabályozásához is [80, 81]. A centroszómális fehérjék rendszerében bekövetkező változás során, proteaszóma gátlás felelős lehet a mikrotubulus rendszer károsodásáért, valamint a sejtciklus szabályozási rendszerének zavarához is vezethet, mivel a proteaszóma inhibitorok a G2/M fázisban állíthatják meg a sejtciklust [82]. A centroszómák komplex szerkezetét aktív ubiquitin-proteaszóma szerkezettel több mint egy évtizede írták le [83], így maga a centroszóma képes a proteaszóma aktivitás gátlásra válaszolni [84]. Feltételezhetően a centroszóma is szerepet játszhat azon polyubiquitinált fehérjék degradálásában, melyeket a proteaszóma valamilyen okból kifolyólag nem ismer fel. Az *FOPNL* túlzott expressziója miatti kedvezőtlen túlélés, visszafordítható lehet a proteaszóma inhibitorokkal befolyásolva.

Összefoglalva eredményeinket, az *FOPNL* variáns vizsgálata során különböző hatás volt megfigyelhető az MM kimenetelét illetően, aszerint, hogy a betegek bortezomib bázisú vagy immunmoduláns alapú terápiában részesültek. Bortezomibot tartalmazó kezelés esetén teljes mértékben megváltozott, az a kedvezőtlen hatása az *FOPNL* variáns allélnak, amelyet a nem bortezomib kezelt betegek esetén figyelhattunk meg. Érdekes módon egy tanulmányban azt találták, hogy azoknál az MM betegeknél, akiknél centroszóma amplifikáció kimutatható volt kedvezőbb OS volt megfigyelhető. Ez szemben állt azzal a megfigyeléssel, hogy ez kedvezőtlen prognosztikai faktor lenne. Ezen ellentétet szintén az eltérő (régebbi) kezelési protokollok eredményezhették, miszerint a centroszóma amplifikáció pozitív MM szubklónok valószínű érzékenyebbek lehetnek az újabb, bortezomib bázisú terápiákra [85]. Megállapításaink hangsúlyozzák tehát a fontosságát a GWAS által azonosított

variánsok ismétlő tanulmányainak, különösen azoknak melyeknek prediktív vagy prognosztikai hatása lehet a túlélésre, olyan betegségeknél melyek háttere és kezelése rendkívül heterogén. Így vizsgálataink alapján az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus nem prognosztikai, hanem prediktív markerként lehet hatással a myeloma multiplexet illetően.



## 5.2 *PSMB1*

Munkánk további részeként a *PSMB1* rs12717 polimorfizmus hatását elemeztük myelomás betegcsoporton. Feltételeztük, hogy a vizsgált SNP befolyásolhatja a túlélést, valamint a bortezomib kezelésre is hatással lehet. Tanulmányunk kiinduló pontja, egy olyan klinikai vizsgálat volt, melynek részeként relapszusos folliculáris lymphomás betegeknél hasonlították össze a kimenetelt rituximab monoterápia esetén illetve bortezomibbal kombinálva, figyelembe véve különböző biomarkereket. Olyan fehérjéket (NF- $\kappa$ B, p65, PSMB5, CD68) és géneket (*PSMB* gének, *FCGR2A*, *FCGR3A*) vizsgálták, melyek lényeges kapcsolatban voltak az alkalmazott gyógyszerekkel. Egyedi (*PSMB1* P11A) és biomarker pár (*PSMB1* P11A C/G és alacsony CD68 expresszió) vizsgálatban is szignifikánsan kedvezőbb PFS-t tudtak kimutatni a bortezomibbal kombinált terápiában részesülő betegeknél, mint rituximab monoterápia esetén. Az OS-t illetően szignifikáns kapcsolat nem volt [47]. Az általunk vizsgált MM betegcsoporton a *PSMB1* rs12717 polimorfizmusnak szignifikáns hatása volt a PFS-t illetően, azonban ezt az összefüggést OS esetén nem tudtuk kimutatni. Az alcsoport analízisek eredményei alapján is csak a PFS-nél volt szignifikáns kapcsolata bortezomib bázisú kezelést kapó betegek csoportjában (PFS: bortezomib igen  $p=0,006$ , bortezomib nem  $p=0,387$ ; OS: bortezomib igen  $p=0,513$ , bortezomib nem  $p=0,597$ ). Azonban elemzéseink során maga a bortezomib kezelés és a *PSMB1* genotípus között statisztikai kölcsönhatás nem volt megfigyelhető, így a különbség akár a non-PI csoport feltételezhetően az alacsony esetszámainak következménye is lehet.

A *PSMB1* rs12717 szakirodalma kevés, myelomás betegcsoporton egy tanulmány vizsgálja. Feltevésük az volt, hogy a *PSMB* géneken található variációk, hatással vannak a kezelés során kialakult bortezomib rezisztenciára vagy a hosszútávú kimenetelre. A vizsgálat során a 20S proteaszóma  $\beta$ -alegység (PSMB1,5,6,8,9,10) szekvenciáját elemezték, relapszusos MM betegeknél. A páciensek egy nagyobb klinikai vizsgálat résztvevői voltak, amelyben bortezomib kezelést hasonlítottak össze nagy dózisú dexamethasonnal szemben. A különböző *PSMB* SNP vizsgálatok során, az rs12717 variáns allélt illetően a progresszióig eltelt idő, valamint az összesített túlélés között sem volt szignifikáns kapcsolat kimutatható. Ezen megfigyelés fő limitációja az alacsony esetszám volt, mivel az összehasonlítást csupán 23 beteg esetén végezték el (bortezomib kezelt betegek  $n=12$ ; dexamethason kezelt betegek  $n=11$ ,  $p=0,077$ ) [48].

További vizsgálataink a polimorfizmus funkcionális hatására irányultak. Eredményeink alapján kimutatható volt, hogy a relapszus kialakulásának esélye egy variáns allél hordozása esetén emelkedik, valamint homozigóta formában ez az emelkedés még kifejezettebb, amely gén dózis hatás jelenlétét mutathatja. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus funkcionális következményéről korábbról nem volt publikált adat. A funkcionális analíziseket egészséges egyének mintáin végeztük el, mivel myelomás betegek mintáiból származó plazmasejtek hozzáférhetősége meglehetősen limitált, továbbá ezen sejtek számos olyan szomatikus mutációt hordozhatnak, melyek a vizsgálatok során nagymértékben befolyásolhatják az eredményeket. Myeloma sejtvonal esetén, pedig a *PSMB1* rs12717 genotípus nem elérhető információ.

A proteaszóma két heptamerikus gyűrűjét alkotó belső  $\beta$  alegységében található, a *PSMB1* által kódolt fehérje a  $\beta 6$  alegység, amely nem rendelkezik direkt proteolitikus aktivitással, azonban hozzájárul a proteaszóma szerkezetének kialakulásához, stabilitásához [18]. Vizsgálataink során a homozigóta G/G genotípussal rendelkező egészséges egyének esetén szignifikánsan alacsonyabb proteolitikus aktivitások voltak kimutathatók a homozigóta C/C egyénekkel szemben. Ezenfelül a proteaszómák kaspáz- és tripszin-szerű aktivitásai a bortezomib gátlásra kevésbé voltak érzékenyek a G/G genotípusú egyéneknél. Megállapításaink alapján maga a polimorfizmus nem semleges, valószínű közvetett kapcsolat állhat fenn a proteaszóma funkcióval kapcsolatban. A pontos magyarázathoz, hogyan eredményezhet a *PSMB1* rs12717 G/G genotípusa csökkent aktivitást, valamint változást a proteaszómák bortezomib érzékenységében további vizsgálatok szükségesek. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus funkcionális vizsgálata során kapott eredményeink lehetséges magyarázata, hogy a megfelelő celluláris homeosztázis fenntartása érdekében a sejtek, a proteaszómák csökkent proteolitikus aktivitását egyéb, alternatív degradáló mechanizmusok emelkedésével kompenzálják, melyek ugyan kevésbé hatékonyak, de végül csökken az érzékenység a proteaszóma gátlásra. A proteaszóma inhibitorok által kiváltott, fehérje katabolizmus homeosztázisának fenntartására, a kompenzáló válasz lehet az autofagocitózis. Ennek során a fehérje aggregátumok feldolgozása autofagocitózissal történik [86, 87]. A *PSMB1* homozigóta G/G genotípusú egyének esetén a bortezomibra való csökkent érzékenység volt megfigyelhető. Ezen megállapítás az intenzív fehérje szintézist és szekréciót végző sejtekre lehet igaz, mint az MM sejtek. MM esetén nagy mennyiségű immunoglobulin

termelődik és szekretálódik, melynek szabályozásában az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz fontos szerepet játszik. A myeloma sejtek a nem megfelelő, felhalmozódott fehérjék eltávolításához egy olyan jelátviteli útvonalat aktiválhatnak, mely során különböző chaperonok, enzimek, fehérje degradáló mechanizmusok elemei indukálódnak, így egy olyan adaptív válasz indul el, mely segítségével a homeosztázis visszaállítható [88]. Maga a proteaszóma aktívan részt vesz az ER minőség-ellenőrzésében a fel nem tekeredett fehérjék proteolízise által. Proteaszóma gátlás során az emelkedett fehérjék szintje az ER-ben endoplazmatikus retikulum stresszhez vezet. Ezen folyamatok vezetnek a fel nem tekeredett fehérje válasz (unfolded protein response, UPR) aktivációjához [87]. Ezen kompenzáló folyamat során a fehérjeszintézis csökken, enzimek és proteaszóma komponensek száma emelkedik, megelőzve a fehérje felhalmozódást. Átmenetileg a sejtek nem megfelelő környezeti stressz okozta túlélését eredményezheti. Amennyiben ez a stressz folyamat hosszú ideig áll fenn (proteaszóma gátlás) az UPR sejtciklus leállításához, apoptózis indukálásához vezet [73]. A bortezomib a 26S proteaszóma gátlása során, a myeloma sejtek apoptózisát indukálja, hatására abnormális aggregátumok keletkeznek az ER-en belül, mely kiválthat UPR-t is, tehát úgymond a bortezomib segítő funkciója figyelhető meg [88] [89].

A PSMB alegységekben történő változások befolyásolhatják a proteaszóma szerkezetét, kialakulását, funkcióját és a proteaszóma gyógyszer kötő helyeinek konformációs változásait. A bortezomib a  $\beta 5$  alegységhez kötődve gátolja az ubiquitinált fehérjék hidrolízisét. Hatással van a  $\beta 1$  és a közelében található  $\beta 6$  alegységre is [48]. A bortezomib rezisztencia mechanizmus egyik oka lehet pl. a proteaszóma egyes alegységeiben bekövetkező mutáció.[90] Egy vizsgálat először jellemzett funkcionálisan 4 olyan PSMB5 mutációt, melyeknek a rezisztencia kialakulásában szerepe volt, hosszan tartó bortezomib kezelés alatt álló myelomás betegeknél [91]. A bortezomib hatását a proteaszómákra számos tanulmány vizsgálja. Azonban PSMB1-hez hasonló, azzal kapcsolatban lévő adat mindezidáig nem jelent meg.

A *PSMB1* rs12717 mind prognosztikai, mind pedig prediktív biomarkerként is hatással lehet a myelomára. Funkcionális vizsgálataink alapján, segíthet azon betegek azonosításában, akik valószínű szuboptimális választ mutatnak bortezomibra és

alternatív kezelésben részesülhetnek. Azonban ezen eredmények megerősítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

### 5.3 Biomarkerek szerepe

A különböző biomarkerek mind a diagnózis meghatározásában, mind a követésében fontos szerepet töltenek be a malignus megbetegedések esetén, az erre irányuló kutatások pedig számos területen nyújtanak újabb és újabb lehetőségeket [92]. A MM klinikailag sokszínű betegség, ami leginkább az alapjául szolgáló genetikai eltérések heterogenitásából következik. A legtöbb eddig meghatározott biomarker segíti a betegek rizikó besorolását és a tumor előrehaladottság mérését, azonban nem számol az MM klonális heterogenitásával [92]. Különböző genetikai elváltozások mutathatók ki a diagnózis időpontjában és relapszuskor is. A betegség előrehaladása során, a terápiás kudarc leginkább a szerzett gyógyszer rezisztencia és a klonális evolúció kialakulása következtében lesz [93].

A terápia egyénre alakításához, jobb prognózis becsléshez, maximális túlélési előnyhöz újabb prognosztikai és prediktív biomarkerek használatára van szükség [92].

Az új biomarkerek közé tartoznak:

- az MRD, melynek mérése történhet áramlási citometriával, valamint új generációs szekvenálási technikával
- „likvid” biopszia, ennek során perifériás vérminta felhasználásával vizsgálják a keringő tumorsejteket és keringő szabad tumor DNS-t. Minimálisan invazív technika.
- immun biomarkerek: matrix proteoglikán; tumor neoantigének; tumor infiltráló lymphocyták [42, 92].
- Ezeken felül az SNP-eket, mint potenciális prognosztikai és prediktív markerként vizsgálják MM esetén [93].

A különböző biomarkerek hasznosak lehetnek, a malignus megbetegedésekre való hajlam azonosításában is, valamint a prediktív biomarkerek segíthetnek a megfelelő célzott kezelés kiválasztásában az alacsony és magas rizikójú betegeket illetően [94].

## 6. Következtetések

### 6.1. *FOPNL* rs72773978

Az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus allélfrekvenciája nem különbözött az MM betegek és az egészséges egyéneknél, valamint vizsgálatunk során nem volt eltérés az irodalmi adatokhoz képest sem. A minor allél hordozás nem befolyásolta szignifikánsan a vizsgáltunkban szereplő klinikai jellemzőket (nem, életkor, ISS, citogenetikai abnormalitások), valamint a kezelésre adott válasz során sem volt megfigyelhető különbség. Szignifikáns eltérést találtunk azonban a kezelések összehasonlítása során. A bortezomib bázisú kezelésben részesülő betegek esetén a variáns allél hordozás gyakoribbnak bizonyult, mint az immunmoduláns alapú terápiában részesülő betegcsoportban (15,4% vs. 6,1%,  $p=0,008$ ).

Az *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus az MM betegcsoporton elemezve, az összesített túlélést és a progressziómentes túlélést illetően eltérő hatást mutatott az alkalmazott kezeléstől függően. A nem bortezomib alapú kezelés esetében a minor allélt hordozók kedvezőtlenebb prognózist mutattak, mind a PFS-t mind pedig az OS-t illetően is (PFS  $p=0,042$ ; OS  $p=0,022$ ), mely különbség multivariancia analízis során az OS esetén függetlennek bizonyult (OS:  $p=0,045$ ; HR: 2,69; 95%CI: 1,02-7,11). Érdekes módon, a bortezomib kezelt alcsoport esetén ellentétes hatás volt megfigyelhető, a minor allélt hordozóknál az OS szignifikánsan jobbnak bizonyult a ( $p=0,048$ ), a PFS esetén pedig tendencia volt ( $p=0,082$ ), mely multivariancia analízis során is kimutatható volt (PFS:  $p=0,08$ ; HR: 0,69; 95%CI: 0,46-1,04; OS:  $p=0,09$ ; HR: 0,58; 95%CI: 0,31-1,09).

Vizsgálataink alapján a *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus nem mint prognosztikai, hanem mint prediktív marker lehet hatással a myeloma multiplexet illetően.

### 6.2. *PSMB1* rs12717

A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus vizsgálata során meghatározott allélfrekvencia nem különbözött az irodalmi adatoktól. A különböző genotípusú csoportok és a klinikai jellemzők elemzése során nem volt megfigyelhető eltérés.

A *PSMB1* rs12717 polimorfizmust vizsgálva a teljes betegcsoporton az OS-t, illetően nem volt kimutatható kapcsolat, azonban szignifikánsan kedvezőtlenebb PFS

volt megfigyelhető a variáns allélt hordozó páciensek esetén ( $p=0,002$ ), mely multivariancia során is független rizikófaktor volt (PFS:  $p<0,001$ ; HR: 2,293; 95%CI: 1,458-3,604). Az alcsoport analízisek eredményei is ezt a tendenciát mutatták, miszerint a C/G és G/G genotípusú egyének progressziómentes túlélése szignifikánsan kedvezőtlenebbnek bizonyult több esetben is, azonban az OS esetén csak az ISS-nél volt ez megfigyelhető.

A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus funkcionális vizsgálata során egészséges C/C és G/G genotípusú egyének mintáin, a proteaszómák mennyisége, valamint expressziója nem különbözött szignifikánsan az eltérő genotípusok esetén. A katalitikus alegységek esetén, a variáns allélt homozigóta formában hordozó egyéneknél szignifikánsan alacsonyabb proteolitikus aktivitások voltak megfigyelhetőek. Bortezomib gátlás alatt in vitro vizsgálva a kimotripszin-, tripszin- és a kaspáz-szerű aktivitásokat, emelkedett  $IC_{50}$  értékek voltak kimutathatók a tripszin,- és a kaspáz-szerű aktivitások esetén a C/C genotípusú egyének mintáin.

Vizsgálataink alapján, a *PSMB1* rs12717 mind prognosztikai valamint a funkcionális eredmények alapján prediktív marker is lehet MM esetén.

## 7. Összefoglalás

A myeloma multiplex rendkívül heterogén, melyet az alapjául szolgáló genetikai eltérések, a tumor és csontvelői mikroökönyezet is nagymértékben befolyásolnak. A genetikai háttérnek vizsgálata, új prognosztikai és prediktív biomarkerek azonosítása, nemcsak a rizikó stratifikációban, hanem a beteg számára legmegfelelőbb terápia kiválasztásában is fontos szerepet töltenek be. Két újonnan azonosított polimorfizmus hatását elemeztük magyarországi myelomás betegcsoporton. Először a myeloma várható túlélést illetően kedvezőtlen prognosztikai faktorként leírt *FOPNL* rs72773978 polimorfizmust vizsgáltuk, majd a *PSMB1* rs12717 variánst, mint a bortezomib terápiát befolyásoló prediktív markert.

Az *FOPNL* rs72773978 minor allél kedvezőtlen hatása teljes mértékben megváltozott az alkalmazott kezeléstől függően. Ellentétes hatás volt megfigyelhető az immunmoduláns és a bortezomib bázisú kezelés során. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus elemzése során rövidebb progresszió-mentes túlélés volt kimutatható a variáns allélt hordozó myelomás betegek esetén. A polimorfizmus funkcionális vizsgálatát illetően pedig, a variáns allél homozigóta hordozó egészséges egyéneknél a proteaszómák csökkent proteolitikus aktivitása, valamint a bortezomib terápia csökkent gátló hatása volt megfigyelhető a tripszin-szerű és kaspáz-szerű aktivitások esetén.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a különböző genetikai variánsok vizsgálata hozzájárulhat a pontosabb prognózis becsléshez, valamint a személyre szabott terápia alkalmazásához.

## Summary

Multiple myeloma is an extremely heterogeneous disease greatly influenced by underlying genetic abnormalities, the tumour and bone marrow microenvironment. The investigation of the genetic background, the identification of new prognostic and predictive biomarkers play an important role not only in risk stratification, but also in selecting the most appropriate therapy for the patient. We analysed the effect of two newly identified polymorphisms in a group of multiple myeloma patients in Hungary. First, we studied the *FOPNL* single nucleotide polymorphism (rs72773978) identified as a novel adverse prognostic factor which was associated with poor overall survival in myeloma. Next, we investigated *PSMB1* rs12717 variant, as a predictive marker influencing bortezomib therapy.

The adverse effect of the *FOPNL* rs72773978 minor allele was completely reversed depending on the treatment applied. The opposite effect was observed between immunomodulatory and bortezomib-based treatments. The analysis of the *PSMB1* rs12717 polymorphism revealed shorter progression free survival in myeloma patients carrying the variant allele. Concerning the functional study of the polymorphism, decreased proteolytic activity of proteasomes and decreased inhibitory effect of bortezomib therapy were observed with trypsin-like and caspase-like activities.

Our results suggest that the study of different genetic variants may contribute to more precise prognosis estimates and for the application of personalized therapy.



## 8. Irodalomjegyzék

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, Gay F, Anderson KC. (2017) Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17046.
2. Varga G, Mikala G, Varoczy L, Illes A. (2016) [Management of multiple myeloma in Hungary in 2016]. *Orv Hetil*, 157(4): 123-137.
3. Rajkumar SV. (2016) Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 91(7): 719-734.
4. Cagnetta A, Lovera D, Grasso R, Colombo N, Canepa L, Ballerini F, Calvio M, Miglino M, Gobbi M, Lemoli R, Cea M. (2015) Mechanisms and Clinical Applications of Genome Instability in Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*, 2015: 943096.
5. Krahling T, Balassa K, Meggyesi N, Bors A, Csomor J, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Remenyi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. (2014) [Complex molecular genetic algorithm in the diagnosis of myeloproliferative neoplasms]. *Orv Hetil*, 155(52): 2074-2081.
6. Freedman A, Jacobsen E. (2020) Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*, 95(3): 316-327.
7. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. (2015) Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood*, 125(12): 1870-1876.
8. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. (2019) Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*, 10: 1121.
9. Chesi M, Bergsagel PL. (2013) Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*, 97(3): 313-323.
10. Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, Larocca A, Niesvizky R, Morgan G, Landgren O, Hajek R, Einsele H, Anderson KC, Dimopoulos MA, Richardson PG, Cavo M, Spencer A, Stewart AK, Shimizu K, Lonial S, Sonneveld P, Durie BG, Moreau P, Orłowski RZ. (2014) International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*, 32(6): 587-600.

11. Terpos E, Dimopoulos MA, Moulopoulos LA. (2016) The Role of Imaging in the Treatment of Patients With Multiple Myeloma in 2016. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 35: e407-417.
12. Anderson KC, Alsina M, Atanackovic D, Biermann JS, Chandler JC, Costello C, Djulbegovic B, Fung HC, Gasparetto C, Godby K, Hofmeister C, Holmberg L, Holstein S, Huff CA, Kassim A, Krishnan AY, Kumar SK, Liedtke M, Lunning M, Raje N, Reu FJ, Singhal S, Somlo G, Stockerl-Goldstein K, Treon SP, Weber D, Yahalom J, Shad DA, Kumar R. (2016) NCCN Guidelines Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2016. *J Natl Compr Canc Netw*, 14(4): 389-400.
13. Vincent Rajkumar S. (2014) Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 89(10): 999-1009.
14. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. (2015) Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 33(26): 2863-2869.
15. Rajkumar SV. (2016) Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol*, 91(1): 90-100.
16. Holstein SA, McCarthy PL. (2017) Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. *Drugs*, 77(5): 505-520.
17. Noonan K, Colson K. (2017) Immunomodulatory Agents and Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs*, 33(3): 279-291.
18. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. (2010) Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13): 1411-1442.
19. Kubiczkova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. (2014) Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med*, 18(6): 947-961.
20. Bahlis NJ, Dimopoulos MA, White DJ, Benboubker L, Cook G, Leiba M, Ho PJ, Kim K, Takezako N, Moreau P, Kaufman JL, Krevvata M, Chiu C, Qin X, Okonkwo L, Trivedi S, Ukropec J, Qi M, San-Miguel J. (2020) Daratumumab

- plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: extended follow-up of POLLUX, a randomized, open-label, phase 3 study. *Leukemia*, 34(7): 1875-1884.
21. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, Spicka I, Hungria V, Munder M, Mateos MV, Mark TM, Qi M, Schecter J, Amin H, Qin X, Deraedt W, Ahmadi T, Spencer A, Sonneveld P, Investigators C. (2016) Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 375(8): 754-766.
  22. Wang Y, Sanchez L, Siegel DS, Wang ML. (2016) Elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 9(1): 55.
  23. Richardson PG, Beksac M, Špička I, Mikhael J. (2020) Isatuximab for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther*, 20(12): 1395-1404.
  24. Sivaraj D, Green MM, Gasparetto C. (2017) Panobinostat for the management of multiple myeloma. *Future Oncol*, 13(6): 477-488.
  25. Rajkumar SV. (2020) Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 95(5): 548-567.
  26. Zanwar S, Nandakumar B, Kumar S. (2020) Immune-based therapies in the management of multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 10(8): 84.
  27. Monconduit M, Le Loet X, Bernard JF, Michaux JL. (1986) Combination chemotherapy with vincristine, doxorubicin, dexamethasone for refractory or relapsing multiple myeloma. *Br J Haematol*, 63(3): 599-601.
  28. Cavo M, Pantani L, Petrucci MT, Patriarca F, Zamagni E, Donnarumma D, Crippa C, Boccadoro M, Perrone G, Falcone A, Nozzoli C, Zambello R, Masini L, Furlan A, Brioli A, Derudas D, Ballanti S, Dessanti ML, De Stefano V, Carella AM, Marcatti M, Nozza A, Ferrara F, Callea V, Califano C, Pezzi A, Baraldi A, Grasso M, Musto P, Palumbo A, Network GIM. (2012) Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 120(1): 9-19.
  29. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC. (2005) Bortezomib or high-dose

- dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*, 352(24): 2487-2498.
30. Reeder CB, Reece DE, Kukreti V, Chen C, Trudel S, Hentz J, Noble B, Pirooz NA, Spong JE, Piza JG, Zepeda VH, Mikhael JR, Leis JF, Bergsagel PL, Fonseca R, Stewart AK. (2009) Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia*, 23(7): 1337-1341.
  31. Moreau P, Attal M, Hulin C, Arnulf B, Belhadj K, Benboubker L, Béné MC, Broijl A, Caillon H, Caillot D, Corre J, Delforge M, Dejoie T, Doyen C, Facon T, Sonntag C, Fontan J, Garderet L, Jie KS, Karlin L, Kuhnowski F, Lambert J, Leleu X, Lenain P, Macro M, Mathiot C, Orsini-Piocelle F, Perrot A, Stoppa AM, van de Donk NW, Wuilleme S, Zweegman S, Kolb B, Touzeau C, Roussel M, Tiab M, Marolleau JP, Meuleman N, Vekemans MC, Westerman M, Klein SK, Levin MD, Femand JP, Escoffre-Barbe M, Eveillard JR, Garidi R, Ahmadi T, Zhuang S, Chiu C, Pei L, de Boer C, Smith E, Deraedt W, Kampfinkel T, Schechter J, Vermeulen J, Avet-Loiseau H, Sonneveld P. (2019) Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 394(10192): 29-38.
  32. Oakervee HE, Popat R, Curry N, Smith P, Morris C, Drake M, Agrawal S, Stec J, Schenkein D, Esseltine DL, Cavenagh JD. (2005) PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 129(6): 755-762.
  33. Palumbo A, Cerrato C. (2013) Diagnosis and therapy of multiple myeloma. *Korean J Intern Med*, 28(3): 263-273.
  34. Facon T, Kumar S, Plesner T, Orłowski RZ, Moreau P, Bahlis N, Basu S, Nahi H, Hulin C, Quach H, Goldschmidt H, O'Dwyer M, Perrot A, Venner CP, Weisel K, Mace JR, Raje N, Attal M, Tiab M, Macro M, Frenzel L, Leleu X, Ahmadi T, Chiu C, Wang J, Van Rampelbergh R, Uhlar CM, Kobos R, Qi M, Usmani SZ. (2019) Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*, 380(22): 2104-2115.
  35. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Russell NH, Bell SE, Szubert AJ, Navarro Coy N, Cook G, Feyler S, Byrne JL, Roddie H, Rudin C, Drayson MT,

- Owen RG, Ross FM, Jackson GH, Child JA, Group NHOS. (2011) Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (CTD) as initial therapy for patients with multiple myeloma unsuitable for autologous transplantation. *Blood*, 118(5): 1231-1238.
36. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, Sandhu I, Ganly P, Baker BW, Jackson SR, Stoppa AM, Simpson DR, Gimsing P, Palumbo A, Garderet L, Cavo M, Kumar S, Touzeau C, Buadi FK, Laubach JP, Berg DT, Lin J, Di Bacco A, Hui AM, van de Velde H, Richardson PG. (2016) Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 374(17): 1621-1634.
37. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, Dispenzieri A, Fonseca R, Sher T, Kyle RA, Lin Y, Russell SJ, Kumar S, Bergsagel PL, Zeldenrust SR, Leung N, Drake MT, Kapoor P, Ansell SM, Witzig TE, Lust JA, Dalton RJ, Gertz MA, Stewart AK, Rajkumar SV, Chanan-Khan A, Lacy MQ, Mayo C. (2013) Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*, 88(4): 360-376.
38. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, Munshi N, Lonial S, Bladé J, Mateos M-V, Dimopoulos M, Kastritis E, Boccadoro M, Orłowski R, Goldschmidt H, Spencer A, Hou J, Chng WJ, Usmani SZ, Zamagni E, Shimizu K, Jagannath S, Johnsen HE, Terpos E, Reiman A, Kyle RA, Sonneveld P, Richardson PG, McCarthy P, Ludwig H, Chen W, Cavo M, Harousseau J-L, Lentzsch S, Hillengass J, Palumbo A, Orfao A, Rajkumar SV, Miguel JS, Avet-Loiseau H. (2016) International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 17(8): e328-e346.
39. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, Blade J, Richardson P, Orłowski R, Siegel D, Jagannath S, Facon T, Avet-Loiseau H, Lonial S, Palumbo A, Zonder J, Ludwig H, Vesole D, Sezer O, Munshi NC, San Miguel J, International Myeloma Workshop Consensus P. (2011) Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*, 117(18): 4691-4695.

40. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, Ludwig H, Gahrton G, Beksac M, Crowley J, Belch A, Boccadaro M, Cavo M, Turesson I, Joshua D, Vesole D, Kyle R, Alexanian R, Tricot G, Attal M, Merlini G, Powles R, Richardson P, Shimizu K, Tosi P, Morgan G, Rajkumar SV, International Myeloma Working G. (2006) International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20(9): 1467-1473.
41. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, Munshi N, Palumbo A, Miguel JS, Sonneveld P, Cavo M, Usmani S, Durie BG, Avet-Loiseau H, International Myeloma Working G. (2014) IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*, 28(2): 269-277.
42. Pawlyn C, Davies FE. (2019) Toward personalized treatment in multiple myeloma based on molecular characteristics. *Blood*, 133(7): 660-675.
43. Ooi MG, de Mel S, Chng WJ. (2016) Risk Stratification in Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*, 11(2): 137-147.
44. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR, Xiao Y, Xu H, Epstein J, Anaissie E, Krishna SG, Cottler-Fox M, Hollmig K, Mohiuddin A, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Sawyer J, Alsayed Y, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B. (2007) A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*, 109(6): 2276-2284.
45. Decaux O, Lode L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jezequel P, Attal M, Harousseau JL, Moreau P, Bataille R, Campion L, Avet-Loiseau H, Minvielle S, Intergroupe Francophone du M. (2008) Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol*, 26(29): 4798-4805.
46. van Beers EH, van Vliet MH, Kuiper R, de Best L, Anderson KC, Chari A, Jagannath S, Jakubowiak A, Kumar SK, Levy JB, Auclair D, Lonial S, Reece D, Richardson P, Siegel DS, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Zimmerman TM, Fonseca R. (2017) Prognostic Validation of SKY92 and Its Combination

- With ISS in an Independent Cohort of Patients With Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 17(9): 555-562.
47. Coiffier B, Li W, Henitz ED, Karkera JD, Favis R, Gaffney D, Shapiro A, Theocharous P, Elsayed YA, van de Velde H, Schaffer ME, Osmanov EA, Hong X, Scheliga A, Mayer J, Offner F, Rule S, Teixeira A, Romejko-Jarosinska J, de Vos S, Crump M, Shpilberg O, Zinzani PL, Cakana A, Esseltine DL, Mulligan G, Ricci D. (2013) Prespecified candidate biomarkers identify follicular lymphoma patients who achieved longer progression-free survival with bortezomib-rituximab versus rituximab. *Clin Cancer Res*, 19(9): 2551-2561.
  48. Lichter DI, Danaee H, Pickard MD, Tayber O, Sintchak M, Shi H, Richardson PG, Cavenagh J, Blade J, Facon T, Niesvizky R, Alsina M, Dalton W, Sonneveld P, Lonial S, van de Velde H, Ricci D, Esseltine DL, Trepicchio WL, Mulligan G, Anderson KC. (2012) Sequence analysis of beta-subunit genes of the 20S proteasome in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib or dexamethasone. *Blood*, 120(23): 4513-4516.
  49. (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063): 1299-1320.
  50. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011): 931-945.
  51. Manolio TA, Collins FS. (2009) The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annu Rev Med*, 60: 443-456.
  52. Vangsted A, Klausen TW, Vogel U. (2012) Genetic variations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 88(1): 8-30.
  53. Mitchell JS, Li N, Weinhold N, Forsti A, Ali M, van Duin M, Thorleifsson G, Johnson DC, Chen B, Halvarsson BM, Gudbjartsson DF, Kuiper R, Stephens OW, Bertsch U, Broderick P, Campo C, Einsele H, Gregory WA, Gullberg U, Henrion M, Hillengass J, Hoffmann P, Jackson GH, Johnsson E, Joud M, Kristinsson SY, Lenhoff S, Lenive O, Mellqvist UH, Migliorini G, Nahi H, Nelander S, Nickel J, Nothen MM, Rafnar T, Ross FM, da Silva Filho MI, Swaminathan B, Thomsen H, Turesson I, Vangsted A, Vogel U, Waage A, Walker BA, Wihlborg AK, Broyl A, Davies FE, Thorsteinsdottir U, Langer C, Hansson M, Kaiser M, Sonneveld P, Stefansson K, Morgan GJ, Goldschmidt H, Hemminki K, Nilsson B, Houlston RS. (2016) Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nat Commun*, 7: 12050.

54. Ziv E, Dean E, Hu D, Martino A, Serie D, Curtin K, Campa D, Aftab B, Bracci P, Buda G, Zhao Y, Caswell-Jin J, Diasio R, Dumontet C, Dudzinski M, Fejerman L, Greenberg A, Huntsman S, Jamroziak K, Jurczynski A, Kumar S, Atanackovic D, Glenn M, Cannon-Albright LA, Jones B, Lee A, Marques H, Martin T, Martinez-Lopez J, Rajkumar V, Sainz J, Vangsted AJ, Watek M, Wolf J, Slager S, Camp NJ, Canzian F, Vachon C. (2015) Genome-wide association study identifies variants at 16p13 associated with survival in multiple myeloma patients. *Nat Commun*, 6: 7539.
55. Sedjaï F, Acquaviva C, Chevrier V, Chauvin JP, Coppin E, Aouane A, Coulier F, Tolun A, Pierres M, Birnbaum D, Rosnet O. (2010) Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J Cell Sci*, 123(Pt 14): 2391-2401.
56. Feng S, Song Y, Shen M, Xie S, Li W, Lu Y, Yang Y, Ou G, Zhou J, Wang F, Liu W, Yan X, Liang X, Zhou T. (2017) Microtubule-binding protein FOR20 promotes microtubule depolymerization and cell migration. *Cell Discov*, 3: 17032.
57. Jakobsen L, Vanselow K, Skogs M, Toyoda Y, Lundberg E, Poser I, Falkenby LG, Bennetzen M, Westendorf J, Nigg EA, Uhlen M, Hyman AA, Andersen JS. (2011) Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods. *EMBO J*, 30(8): 1520-1535.
58. Satir P, Christensen ST. (2008) Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol*, 129(6): 687-693.
59. Aubusson-Fleury A, Lemullois M, de Loubresse NG, Laligne C, Cohen J, Rosnet O, Jerka-Dziadosz M, Beisson J, Koll F. (2012) The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J Cell Sci*, 125(Pt 18): 4395-4404.
60. Mirvis M, Stearns T, James Nelson W. (2018) Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochem J*, 475(14): 2329-2353.
61. Shen M, Cai Y, Yang Y, Yan X, Liu X, Zhou T. (2013) Centrosomal protein FOR20 is essential for S-phase progression by recruiting Plk1 to centrosomes. *Cell Res*, 23(11): 1284-1295.
62. Mandal R, Strebhardt K. (2013) Plk1: unexpected roles in DNA replication. *Cell Res*, 23(11): 1251-1253.



63. Chng WJ, Fonseca R. (2009) Centrosomes and myeloma; aneuploidy and proliferation. *Environ Mol Mutagen*, 50(8): 697-707.
64. Kryukova E, Kryukov F, Hajek R. (2016) Centrosome amplification and clonal evolution in multiple myeloma: Short review. *Crit Rev Oncol Hematol*, 98: 116-121.
65. Maxwell CA, Keats JJ, Belch AR, Pilarski LM, Reiman T. (2005) Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. *Cancer Res*, 65(3): 850-860.
66. Chng WJ, Ahmann GJ, Henderson K, Santana-Davila R, Greipp PR, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Kumar S, Rajkumar SV, Lust JA, Kyle RA, Zeldenrust SR, Hayman SR, Fonseca R. (2006) Clinical implication of centrosome amplification in plasma cell neoplasm. *Blood*, 107(9): 3669-3675.
67. Chng WJ, Braggio E, Mulligan G, Bryant B, Remstein E, Valdez R, Dogan A, Fonseca R. (2008) The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood*, 111(3): 1603-1609.
68. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2): 104-115.
69. Grice GL, Nathan JA. (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*, 73(18): 3497-3506.
70. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. (2017) Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*, 429(22): 3500-3524.
71. Wu F, Niu Z, Zhou B, Li P, Qian F. (2019) PSMB1 Negatively Regulates the Innate Antiviral Immunity by Facilitating Degradation of IKK-epsilon. *Viruses*, 11(2).
72. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. (2017) The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*, 36(4): 561-584.
73. Manasanch EE, Korde N, Zingone A, Tajeja N, Fernandez de Larrea C, Bhutani M, Wu P, Roschewski M, Landgren O. (2014) The proteasome: mechanisms of biology and markers of activity and response to treatment in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 55(8): 1707-1714.
74. Richardson PG, Badros AZ, Jagannath S, Tarantolo S, Wolf JL, Albitar M, Berman D, Messina M, Anderson KC. (2010) Tanespimycin with bortezomib:

- activity in relapsed/refractory patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 150(4): 428-437.
75. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571): 68-74.
  76. Varga G, Mikala G, Kiss KP, Kosóczy É, Szabó E, Meggyesi N, Balassa K, Kövy P, Tegze B, Szombath G, Tordai A, Andrikovics H, Homolya L, Masszi T. (2017) Proteasome Subunit Beta Type 1 P11A Polymorphism Is a New Prognostic Marker in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 17(11): 734-742.
  77. Erickson SW, Stephens OW, Chavan SS, Epstein J, Barlogie B, Heuck CJ, Vangsted AJ. (2016) A common genetic variant in 19q13.3 is associated with outcome of multiple myeloma patients treated with Total Therapy 2 and 3. *Br J Haematol*, 174(6): 991-993.
  78. Johnson DC, Weinhold N, Mitchell JS, Chen B, Kaiser M, Begum DB, Hillengass J, Bertsch U, Gregory WA, Cairns D, Jackson GH, Forsti A, Nickel J, Hoffmann P, Noethen MM, Stephens OW, Barlogie B, Davis FE, Hemminki K, Goldschmidt H, Houlston RS, Morgan GJ. (2016) Genome-wide association study identifies variation at 6q25.1 associated with survival in multiple myeloma. *Nat Commun*, 7: 10290.
  79. Ali M, Lemonakis K, Wihlborg AK, Veskovski L, Turesson I, Mellqvist UH, Gullberg U, Hansson M, Nilsson B. (2019) Sequence variation at the MTHFD1L-AKAP12 and FOPNL loci does not influence multiple myeloma survival in Sweden. *Blood Cancer J*, 9(8): 57.
  80. Song B, Liu XS, Liu X. (2012) Polo-like kinase 1 (Plk1): an Unexpected Player in DNA Replication. *Cell Div*, 7: 3.
  81. Kasahara K, Kawakami Y, Kiyono T, Yonemura S, Kawamura Y, Era S, Matsuzaki F, Goshima N, Inagaki M. (2014) Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. *Nat Commun*, 5: 5081.
  82. Didier C, Merdes A, Gairin JE, Jabrane-Ferrat N. (2008) Inhibition of proteasome activity impairs centrosome-dependent microtubule nucleation and organization. *Mol Biol Cell*, 19(3): 1220-1229.

83. Wigley WC, Fabunmi RP, Marino CR, Muallem S, deMartino G. (1999) Dynamic Association of Proteasomal Machinery with the Centrosome.
84. Kimura H, Miki Y, Nakanishi A. (2014) Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. *Cell Cycle*, 13(12): 1928-1937.
85. Dementyeva E, Kryukov F, Kubiczkova L, Nemeč P, Sevcikova S, Ihnatova I, Jarkovsky J, Minarik J, Stefanikova Z, Kuglik P, Hajek R. (2013) Clinical implication of centrosome amplification and expression of centrosomal functional genes in multiple myeloma. *J Transl Med*, 11: 77.
86. Hideshima T, Anderson KC. (2012) Biologic impact of proteasome inhibition in multiple myeloma cells--from the aspects of preclinical studies. *Semin Hematol*, 49(3): 223-227.
87. Albornoz N, Bustamante H, Soza A, Burgos P. (2019) Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *Int J Mol Sci*, 20(14).
88. Dong H, Chen L, Chen X, Gu H, Gao G, Gao Y, Dong B. (2009) Dysregulation of unfolded protein response partially underlies proapoptotic activity of bortezomib in multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*, 50(6): 974-984.
89. Periyasamy-Thandavan S, Jackson WH, Samaddar JS, Erickson B, Barrett JR, Raney L, Gopal E, Ganapathy V, Hill WD, Bhalla KN, Schoenlein PV. (2010) Bortezomib blocks the catabolic process of autophagy via a cathepsin-dependent mechanism, affects endoplasmic reticulum stress and induces caspase-dependent cell death in antiestrogen-sensitive and resistant ER+ breast cancer cells. *Autophagy*, 6(1): 19-35.
90. Zhu YX, Tiedemann R, Shi CX, Yin H, Schmidt JE, Bruins LA, Keats JJ, Braggio E, Sereduk C, Mousses S, Stewart AK. (2011) RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood*, 117(14): 3847-3857.
91. Barrio S, Stuhmer T, Da-Via M, Barrio-Garcia C, Lehnert N, Besse A, Cuenca I, Garitano-Trojaola A, Fink S, Leich E, Chatterjee M, Driessen C, Martinez-Lopez J, Rosenwald A, Beckmann R, Bargou RC, Braggio E, Stewart AK, Raab MS, Einsele H, Kortum KM. (2019) Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 33(2): 447-456.

92. Levin A, Hari P, Dhakal B. (2018) Novel biomarkers in multiple myeloma. *Transl Res*, 201: 49-59.
93. Le GN, Bones J, Coyne M, Bazou D, Dowling P, O'Gorman P, Larkin AM. (2019) Current and future biomarkers for risk-stratification and treatment personalisation in multiple myeloma. *Mol Omics*, 15(1): 7-20.
94. Bustoros M, Mouhieddine TH, Detappe A, Ghobrial IM. (2017) Established and Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 37: 548-560.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### 9.1 A dolgozat alapjául szolgáló publikációk

- **Kiss KP**, Varga G, Mikala G, Balassa K, Bors A, Kövy P, Meggyesi N, Kozma A, Csacsovszki O, Remenyi P, Valyi-Nagy I, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. The adverse effect of FOPNL genomic variant is reversed by bortezomib-based treatment protocols in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2018 Mar;59(3):710-716.
- 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. Proteasome Subunit Beta Type 1 P11A Polymorphism Is a New Prognostic Marker in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017 Nov;17(11):734-742.

### 9.2 A tézisekhez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk

- Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Szilvasi A, Bors A, **Kiss KP**, Rajczy K, Inotai D, Torbagyi E, Lengyel L, Barta A, Gopcsa L, Tordai A, Masszi T. Sex-specific survival difference in association with HLA-DRB1\*04 following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Hum Immunol*. 2018 Jan;79(1):13-19.
- Krahling T, Balassa K, **Kiss KP**, Bors A, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Remenyi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Co-occurrence of Myeloproliferative Neoplasms and Solid Tumors Is Attributed to a Synergism Between Cytoreductive Therapy and the Common TERT Polymorphism rs2736100. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 Jan;25(1):98-104.
- Balassa K, Krahling T, Remenyi P, Batai A, Bors A, **Kiss KP**, Torbagyi E, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Varga G, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2017 Feb;58(2):391-398.
- Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Bors A, **Kiss KP**, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Reti M, Tordai A, Masszi T. The potential role of HLA-DRB1\*11 in the development and outcome of

haematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Oct;50(10):1321-5.

- Inotai D, Szilvasi A, Benko S, Boros-Major A, Illes Z, Bors A, **Kiss KP**, Rajczy K, Gelle-Hossó A, Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tordai A. HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens*. 2015 Aug;86(2):115-21.
- Tordai A, Bors A, **Kiss KP**, Balassa K, Andrikovics H, Batai A, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Torbagyi E, Lengyel L, Barta A, Remenyi P, Masszi T. Donor KIR2DS1 reduces the risk of transplant related mortality in HLA-C2 positive young recipients with hematological malignancies treated by myeloablative conditioning. *PLoS One*. 2019 Jun 25;14(6): e0218945.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Andrikovics Hajnalkának. Tanácsai, iránymutatásai mind a doktori disszertáció, mind a munkám során nagyon hasznosnak és előre mutatóknak bizonyultak. Köszönöm neki a kellően kritikus témavezetést és hogy mindig nyitottan hallgatta meg a problémáimat, kérdéseimet. Köszönöm a rám áldozott időt és a biztatást, mely előre vitt a nehezebb időszakon is. Fontos kiemelnem továbbá Prof. Dr. Tordai Attila munkám és tanulmányaim során nyújtott minden segítségét, szakmai hozzájárulását. Köszönet illeti Prof. Dr. Masszi Tamást.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Varga Gergelynek és Dr. Mikala Gábornak a munkámban nyújtott értékes segítségéért, konzultációkért.

Köszönet illeti, Dr. Homolya Lászlót és Kosóczki Évát a PSMB1 funkcionális vizsgálattal kapcsolatos laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Szeretném kifejezni hálámat, Dr. Bors Andrásnak a segítőkész szakmai segítségéért, Petró Péternének, Csehné Bánhidi Klárának, Haluska Brigittának, Mezibroczyk Martinának, akik végig segítették laboratóriumi munkámat és hogy jó hangulatú csapatban dolgozhattam. A citogenetikai vizsgálatokat a Dél-pesti Centrumkórház Citogenetikai Laboratóriumában Dr. Ádám Emma és Kozma András végezte, akik az eredmények feldolgozásában is segítségemre voltak.

Köszönöm Dr. Borsy Adrienn Évának a házivédéssel kapcsolatos alapos és értékes munkáját.

A beteg adatok gyűjtését és rendelkezésemre bocsátását a Dél-pesti Centrumkórházban Hematológiai és Össejttranszplantációs Osztályán dolgozóknak köszönhetem.

Köszönettel tartozom, az Országos Vérellátó Szolgálat, Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriumában dolgozónak.

Végül, de nem utolsó sorban a családomat illeti köszönet, főként édesanyámat, aki mindenben támogat engem és mindig hitt bennem.