

# Genetikai biomarkerek vizsgálata akut myeloid leukémiában

Doktori értekezés

Dr. Kisariné Kövy Petra

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár, MTA doktora

Tagok: Dr. Kriván Gergely, Ph.D., osztályvezető főorvos  
Dr. Tímár Botond, Ph.D., patológus szakorvos

Budapest  
2021.

## Tartalom

Genetikai biomarkerek vizsgálata akut myeloid leukémiában .....	1
<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Bevezetés .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Akut myeloid leukémia általános jellemzők .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Genetikai háttér .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Citogenetikai háttér .....	10
2.2.2 Molekuláris genetikai háttér .....	11
<b>2.3 Genetikai prognosztikai faktorok .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Mérhető reziduális betegség .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Kezelés .....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Kemoterápiás kezelés .....	23
2.5.2 Allogén HSCT .....	25
2.5.3 HSCT kimenetelét befolyásoló faktorok .....	27
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Módszerek .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Vizsgált betegek .....</b>	<b>30</b>
4.1.1 AML betegcsoport .....	30
4.1.2 HSCT betegcsoport .....	30
<b>4.2 Citogenetikai vizsgálati módszerek .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Molekuláris genetikai módszerek .....</b>	<b>31</b>
4.3.1 DNS és RNS izolálás .....	31
4.3.2 AML diagnózisakor alkalmazott módszerek .....	31
4.3.3 AML MRD követésére alkalmazott módszerek .....	32
4.3.4 <i>TGFB1</i> -1347C>T SNP genotipizálása .....	34
<b>4.4 Statisztikai módszerek .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Genetikai eltérések diagnóziskor akut myeloid leukémiában .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Genetikai markerek relapszuskor .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Prognózis becslés diagnóziskori genetikai eltérések alapján .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4 Prognózis becslés követés során mért genetikai markerek alapján .....</b>	<b>51</b>
5.4.1 Droplet digitális PCR technikák beállítása MRD monitorozásra .....	51
5.4.2 Prognózis becslés <i>NPM1</i> mérhető reziduális betegség alapján .....	55
5.4.3 Prognózis becslés <i>IDH1/2</i> mérhető reziduális betegség alapján .....	60

5.5 Örökletes polimorfizmusok terápiát befolyásoló hatása .....	62
<b>6. Megbeszélés.....</b>	<b>74</b>
6.1 Citogenetikai és molekuláris genetikai markerek gyakorisága, társulásai és stabilitása relapszuskor .....	74
6.2 Citogenetikai és molekuláris genetikai markerek prognosztikai szerepe .....	75
6.3 Mérhető reziduális betegség.....	79
6.4 TGFBI polimorfizmus szerepe HSCT esetén .....	83
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>87</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>88</b>
<b>9. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>90</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>116</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>118</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

2-HG: 2-hydroxyglutarát

AML: akut myeloid leukémia

APE1: apurinic/aprimidinic endonukleáz 1

AraC: citarabin

ASXL1: additional sex combs like 1

ATRA: csupa-transz-retinsav (all-*trans*-retinoic acid)

AZA: 5-azacitidin

BER: bázis excíziós DNS-repair

BiTE: bispecifikus antitest

CBF: core binding faktor

CEBPA: CCAAT/enhancer-binding protein alpha gén

CHIP: clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CMV: cytomegalovírus

CR: teljes remisszió

CSA: cyclosporin

ddPCR: droplet digitális polimeráz lánreakció

DEK-NUP214: DEK proto-onkogén nukleoporin 214kDa

DNMT3A: DNS (citozin-5)-metiltransferáz 3A

DNS: dezoxiribonukleinsav

ELN: Európai Leukémia Net

ESZSZK: Egyesített Szent István Szent László Kórház

EZH2: enhancer of zeste 2

FACS: áramlási citometria

FDA: Food and Drug Administration

FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció

FLAG-IDA: fludarabin-idarubicin

FLT3-ITD: *fms*-like tirozin kináz gén internal tandem duplikáció

FLT3-TKD: *fms*-like tirozin kináz gén tirozin kináz domén mutáció

G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

G-CSF: granulocytá kolóniastimuláló faktor

GvHD: graft-versus-host betegség  
HLA: humán leukocita antigén  
HRM: high resolution melting  
HSCT: hematopoetikus őssejt transzplantációt  
*IDH*: izocitrát dehidrogenáz  
*IDH1*: izocitrát dehidrogenáz 1  
*IDH2*: izocitrát dehidrogenáz 2  
JM-PM: juxtamembrán régiót érintő pontmutáció  
*KDM6A*: lizin-specifikus demetiláz 6A  
KIR: Killer cell immunglobulin-like receptor  
*KIT*: mast/stem cell growth factor receptor  
LoB: háttér mérés (limit of blank)  
LoD: detekciós küszöbérték (limit of detection)  
MAC: myeloablatív kondicionáló kezelés  
MDS: myelodiszpláziás szindróma  
MFC: multiparaméteres áramlási citometria  
MHC: major hisztokompatibilitási komplex  
*MKT2A*: lizin (K)-specifikus metiltranszferáz 2A  
*MLL*: kevert vonalú leukémia (mix lineage leukemia) gén  
MPN: myeloproliferatív neoplázia  
MPS: masszív parallel szekvenálás  
MRD: mérhető reziduális betegség  
MUD: HLA-identikus idegen donor  
NGS: új generációs szekvenálás (next generation sequencing)  
NK: normál kariotípus  
*NPM1*: nukleofoszmin 1  
*NRAS*: NRAS proto-onkogén  
NRM: nem relapsushoz köthető halálozás (non-relapse mortality)  
OS: összesített túlélés (overall survival)  
PCR: polimeráz láncreakció  
PTD: részleges tandem duplikáció (partial tandem duplication)  
q-PCR: kvantitatív PCR

R132 (C/H/S/P/G/L): 132-es arginin aminosav cserével járó mutáció  
(cisztein/hisztidin/szerin/prolin/glicin/leucin)

R140Q: 140-es arginin glutamin cserével járó mutáció

R172K: 172-es arginin lizin cserével járó mutáció

RARA: retinsav receptor a

RIC: csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés

RNS: ribonukleinsav

*RUNX1*: Runt-related transzkripciós faktor 1

*RXR*: retinoid X receptor

*SF3B1*: splicing factor 3b subunit 1

SIR: sirolimus

SNP: egyponyos nukleotid polimorfizmus (single nucleotid polimorphism)

*SRSF2*: serine arginine-rich splicing factor 2

*STAG2*: cohesin subunit SA-2

TAC: tacrolimus

TA-TMA: transzplantációhoz köthető trombotikus mikroangiopátia

*TET2*: Ten-eleven-translocation-2

*TGFBI*: transzformáló növekedési faktor béta1

*U2AF1*: U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

VAF: variáns allél frekvencia

WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

*ZRSR2*: Zinc finger (CCCH type) RNA-binding motif and serine/arginine rich 2

## 2. Bevezetés

### *2.1 Akut myeloid leukémia általános jellemzők*

Az akut myeloid leukémia (AML) a myeloid hematopoetikus őssejt klonális megbetegedése. Heveny betegség, melyet a myeloid sejtek differenciációjának gátlása és proliferációjának fokozódása jellemez. Az esetek jelentős része de novo alakul ki, míg mintegy egyharmada másodlagos AML. A szekunder AML két-harmada más myeloid betegség transzformációja során alakul ki [ennek megközelítőleg 50%-a myelodiszplázia (MDS) talaján, míg 27%-a myeloproliferatív neopláziából (MPN)], az egy-harmada pedig terápiához kapcsoltn. Hajlamosító tényezők lehetnek vegyszerek (benzol, aromás szénhidrogének, egyes festékek), illetve sugárzás, kemoterápia. Gyakrabban fordul elő Down-szindrómás betegekben. [1]

Az AML fő jellemzője az éretlen myeloid őssejtek (blasztok) felhalmozódása a csontvelőben és a perifériás vérben. Mivel a kóros sejtek kiszorítják a normális vércépző sejteket a csontvelőből, a tünetek legtöbbször a csontvelő-elégtelenség jelei (anémia miatt fáradtság, gyengeség, trombocitopenia miatt vérzés, és neutropenia miatt súlyos fertőzések); ritkábban a blaszt sejtek különböző szerveket is infiltrálhatnak (pl. íny, bőr, központi idegrendszer).

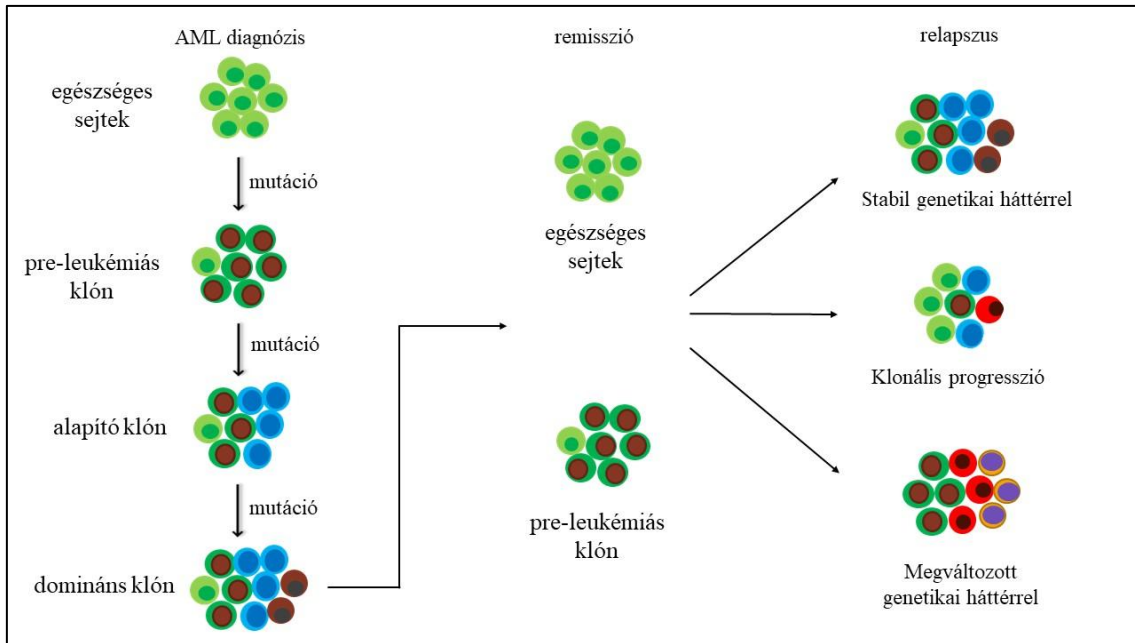
Az AML diagnózisának igazolásához a csontvelőben/ perifériás vérmintában 20% feletti myeloblaszt arány (áramlási citometriával történő meghatározás) szükséges, azonban egyes visszatérő AML-re jellemző genetikai eltérések esetén alacsonyabb blaszt arány is elégséges. Az AML-re jellemző az anémia és trombocitopenia, az abszolút neutrofilszám pedig a fehérvérsejtszámtól függően alacsony vagy normál lehet. [2, 3]

### *2.2 Genetikai háttér*

Az AML igen heterogén genetikai háttérű malignitás, amelyeket citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekkel mutathatunk ki. Az AML kialakulásának egy régebbi kettős találat elmélete szerint a betegség megjelenéséhez legalább két mutáció egyidejű jelenléte szükséges, melyek közül az egyik mutáció a proliferációt serkenti, a másik differenciációt blokkolja. Az elmélet szerint mindegy, hogy melyik genetikai eltérés alakul ki először, a lényeg, hogy mindkét mutáció típusnak jelen kell lennie a klónban. [4] A jelenleg is elfogadott nézet szerint az AML kialakulása más malignus

betegségekhez hasonlóan többlépcsős patogenezisű, amelyhez több mutáció egymást követő kialakulása szükséges. Jelen ismereteink szerint az AML a többi malignus betegséghez viszonyítva, a gyerekkori tumorokhoz hasonlóan viszonylag alacsony számú mutáció következménye, feltételezhetően a csontvelő védett elhelyezkedésének következtében. [5] Egy AML átlagosan 13 génmutáció következtében alakul ki, amelyek közül átlagosan 5 mutáció található olyan génekben, amely AML-ben visszatérően érintett. [6] Először általában az ún. pre-leukémiás mutáció(k) jelen(nek) meg a csontvelői őssejtekben, amelyek jelenléte még önmagukban nem vezetnek az AML kialakulásához. [7] A pre-leukémiás mutációk előfordulhatnak más myeloid malignitásokban, pl. MDS-ben vagy MPN-ben; de jelen lehetnek akár tünetmentes egyénekben is (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP). A pre-leukémiás mutációk egyik jellemzője a magas variáns allél frekvencia (VAF) diagnóziskor. A kezelést követően a pre-leukémiás mutációk perzisztálhatnak remisszióban, amely nem feltétlenül jelenti minden esetben a leukémia közelgő relapszusát. Az epigenetikai változásokat eredményező mutációk gyakran pre-leukémiás jellegűek. Az AML ún. alapító mutációi felelősek az AML kialakulásáért. Ezek a mutációk gyakran transzkripciós faktorokat érintenek, amelyek a myeloid differenciációért felelősek. Jellemzőik, hogy a különböző alapító mutációk nem fordulnak elő egy beteg esetében együttesen, így az AML genetikai klasszifikációjának az alapjául szolgálnak. Az alapító mutációk mennyisége (VAF) összefüggést mutat a leukémiás tumor tömeggel. Az alapító mutáció kialakulását egy vagy több domináns klón mutáció megjelenése követheti (1. ábra). A domináns klón mutációk jellemzően a jelátviteli útvonalak aktiválódásához és következményes sejtproliferációhoz vezetnek. Gyakran a leukémia kisebb szubklónjában vannak jelen. Relapszuskor gyakran megfigyelhető, hogy a pre-leukémiás és alapító mutációk ismételten megjelennek, míg a domináns klón mutációk eltűnnek, esetleg más típusuk jelenik meg.





1.ábra. AML kialakulásának többlépcsős patogenezeise David Grimwade és mtsai, *Blood*, 2016;127(1):29-41 alapján

Az AML kialakulása során az egyén egészséges csontvelői őssejtjében mutáció következik be, ezáltal egy pre-leukémiás klón alakul ki. További mutáció következtében egy alapító klón jön létre, majd egy újabb mutáció hatására végezetül egy domináns klón alakul ki. Az AML klinikai képe több mutáció együttes hatására alakul ki, diagnóziskor gyakran több mutáció jelenléte igazolható. Ha a kemoterápiás kezelés hatására a beteg remisszióba kerül, előfordulhat, hogy (i) minden ismert mutáció eltűnik a csontvelői sejtekből vagy (ii) a pre-leukémiás klón továbbra is fennmarad. Relapszus esetén az AML beteg különböző genetikai háttérrel rendelkezhet. A betegség lehet (iii) stabil genetikai háttérű, vagyis a diagnóziskor észlelt mutációk jelentkeznek relapszusban is, (iv) klonális progresszió léphet fel, új mutáció is kialakul relapszusban a diagnóziskor azonosított mutációk mellett, vagy (v) megváltozott genetikai háttér jön létre, ebben az esetben a diagnóziskor jelen lévő alapító és domináns klón mutációk egyike sincs jelen relapszusban, helyettük teljesen új mutációk figyelhetők meg.

### 2.2.1 Citogenetikai háttér

Az AML betegek mintegy 50%-ában található kromoszóma eltérés. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2016-os besorolása szerint a következő citogenetikai eltérések az "AML visszatérő genetikai eltérésekkel" csoportot képviselik. Mindegyik felsorolt citogenetikai eltérés külön WHO kategóriát képez, alapító, azaz primer genetikai eltérés, amelyek egymással nem társulnak.

1. AML t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* (runt-related transzkripciós faktor 1) fúziós génnel – jellemző társuló szekunder citogenetikai eltérései: del(9q), -X/-Y kromoszóma. Fiatalabb betegekre jellemző, gyakorisága 1-5%.
2. AML inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* fúziós génnel – jellemzően akut myelomonocitás leukémia abnormális eozinofiliával morfológiával társul. Gyakori szekunder citogenetikai eltérései: del(7q), 8-as kromoszóma triszómia, 21-es kromoszóma triszómia, illetve 22-es kromoszóma triszómia. A 22-es kromoszóma triszómiája különösen specifikus inv(16)-ra. Gyakorisága 5-8%, fiatalabb betegekből fordul elő.
3. AML t(15;17)(q24.1;q21.2); *PML-RARA* fúziós génnel – akut promyelocitás leukémia morfológiai képpel. Gyakori szekunder genetikai eltérése a 8-as kromoszóma triszómiája. Főként középkorú betegekre jellemző, 5-8% a gyakorisága. [2]
4. AML t(9;11)(p21.3;q23.3) *MLLT3-KMT2A* fúziós génnel – Felnőtt AML-ben a leggyakoribb 11q23/KMT2A átrendeződések 4-24%-ban fordulnak elő: t(11;19)(q23;p13.3)/ *KMT2A-MLLT1* (MLL-ENL), t(10;11)(p12;q23)/ *KMT2A-MLLT10* (MLL-AF10), t(6;11)(q27;q23)/ *KMT2A-MLLT4* (MLL-AF6), t(11;19)(q23;p13.1)/ *KMT2A-ELL* (MLL-ELL), t(9;11)(p22;q23)/ *KMT2A-MLLT3* (MLL-AF9). [8] Gyerekekre jellemzőbb 9-12%, felnőttekben 2% az előfordulása.
5. AML t(6;9)(p23;q34.1) *DEK-NUP214* – Gyermek és felnőttek egyaránt érintettek, 0,7-1,8% a gyakorisága.
6. AML inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2) *GATA2 MECOM* – gyakran társul más citogenetikai eltérésekkel: pl. del(5q), 7-es kromoszóma monoszómiája. Főleg felnőttekre jellemző, 1-2%-ban fordul elő.
7. AML t(1;22)(p13.3;q13.3) *RBM15-MKLI* – akut megakarioblasztos leukémia morfológiai képpel jár. A primer citogenetikai eltérés mellett szekunder eltérés nem

azonosítható. Újszülöttek és hároméves kor alatti kisgyermekesek esetén gyakoribb. Gyakorisága 1-2%, női predominancia jellemzi. Intenzív kemoterápiára jól reagál.

8. AML inv(9;22)(q34.1;q11.2) *BCR-ABL1* – primer eltérés, szekunder eltérésként 7-es kromoszóma monoszómia, illetve 8-as kromoszóma triszómia figyelhető meg. Felnőttekre jellemző, gyakorisága <1%. [2]

Az "AML myelodiszpláziához kapcsolt változásokkal" alcsoport szinonímája az MDS-t követő AML vagy AML többvonalas diszpláziával. Az AML-es betegek 24-35%-át jellemzi, főként idősebb betegek esetében fordul elő. A csoport jellemző kiegyensúlyozatlan citogenetikai eltérései: 7-es kromoszóma eltérése vagy del(7q), del(5q) vagy t(5q), 17q izokromoszóma vagy t(17p), del(11q), del(12p) vagy t(12p), illetve idic(X)(q13), valamint kiegyensúlyozott eltérései: t(11;16)(q23.3;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(5;12)(q32;p13.2), t(5;7)(q32;q11.2), t(5;17)(q32;p13.2), t(5;10)(q32;q21), t(3;5)(q25.3;q35.1).

A terápiához kapcsolt myeloid neopláziák (t-MN) esetében a betegek 90%-ánál azonosítható citogenetikai eltérés. A betegek 70%-ában kiegyensúlyozatlan kromoszóma eltérések [például del(5q), -7, del(7q), del(17p); komplex kariotípus eltérések] figyelhetőek meg. Ezeknél a kromoszóma eltéréseknél jellemző, hogy gyakran hosszú látenciaperiódus és myelodiszpláziás előzmény után alakulnak t-AML formába; valamint gyakori az alkilálószer és a radioterápia alkalmazása. Az esetek 20-30%-ában kiegyensúlyozott transzlokációk mutathatóak ki [például t(11q23), t(8;21)(q22;q22.1); t(3;21)(q26.2;q22.1) t(15;17)(q24.1;q21.1) és inv(16)(p13.1q22)]. Ezek megjelenésére a terápiát követő rövid látencia periódus jellemző, valamint a korábbi topoizomeráz II inhibitor kezelés. [2]

### 2.2.2 Molekuláris genetikai háttér

A The Cancer Genome Atlas Research Network (Rák Genom Atlasz Kutatási Hálózat) 2013-ban megjelent tanulmányában 200 AML-es beteg genomját vizsgálta, 50 beteg esetén teljes genom, míg 150 betegnél teljes exom szekvenálást végeztek. A tanulmányból kiderült, hogy a mutációkat hordozó fehérjék funkciójuk alapján több csoportba sorolhatóak: myeloid transzkripciós faktorok, szignáltranszdukciós faktorok, nukleofoszmin 1 (*NPM1*), DNS metilációt szabályozók, hisztonmodifikációt

szabályozók, kohezin komplex, splicesome komplex, illetve tumor szupresszor fehérjék. [6]

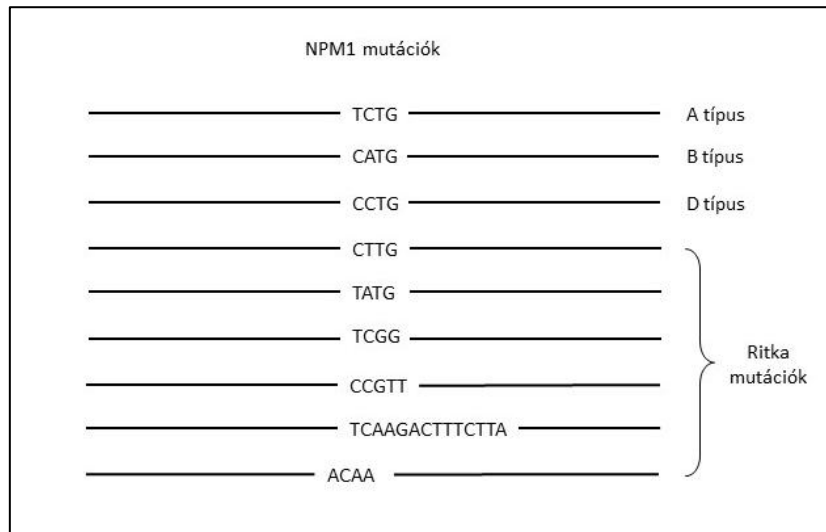
A transzkripciós faktorok a felnőtt AML betegek kb. 20-25%-ában mutálódnak, az AML alapító mutációi. [9] Ezek közé tartoznak például: *RUNX1* fúziói és mutációi, *CBFB* fúziója, *RARA* fúziói, *CEBPA* és *GATA2* gének mutációi. A core binding faktor (CBF) egy transzkripciós faktor, mely  $\alpha$  és  $\beta$  alegységekből áll. Az alfa alegységet a DNS kötésért felelős domént tartalmazza (RUNT domén) három gén kódolhatja, ebből a *RUNX1* játszik szerepet a myeloid hematopoesisben. A *RUNX1* génnek számos frameshift és missense mutációja ismert, melyek az AML betegek kb. 10-15%-ában vannak jelen. [10] A béta alegység (CBFB) az  $\alpha$  alegységet stabilizálja, transzkripciós koaktivátorokat köt, amelyek hiszton acetiltransferázokat kötnek. A retinsav receptor  $\alpha$  (*RARA*) a 17-es kromoszómán található. Leggyakrabban a 15-ös kromoszómán található promyelocita leukémia génnel (*PML*) kiegyensúlyozott transzlokációban figyelhető meg. A *CEBPA* intron nélküli gén, mely a neutrofil granulocyták differenciációjában játszik szerepet. Az N-terminális régióban főként frameshift mutációk fordulnak elő, míg a C-terminális régióban in-frame mutációk. Főként AML M1 és M2-ben, éretlen morfológiában fordul elő 7-15%-ban. Emberben mutációja esetén az érett neutrofil és eosinophil granulocyták hiányoznak. AML-ben külön WHO kategóriának akkor tekinthető, ha a gén mindkét allélja érintett (biallélikus mutáció), általában az egyik mutáció a C-terminális, a másik pedig az N-terminális régiót érinti. A *GATA2* mutáció az AML betegek mintegy 5%-ában van jelen. [11]

A szignáltranszdukciós faktorok az AML esetek mintegy kétharmadában játszanak szerepet. [12] Ezek a mutációk általában a domináns klónban vannak jelen, az AML kialakulásának utolsó lépcsőénél figyelhetőek meg, nem képeznek külön WHO entitást. [2] A jelátviteli útvonalak konstitutív aktiválódása miatt a szignáltranszdukciós faktorok mutációi következményes proliferációs előnyt biztosítanak az AML sejtklónnak. Az *fms*-szerű tirozin kináz 3 gén (*FLT3*) mutációk gyakoribbak fiatal felnőtt betegek, normál kariotípussal (NK) rendelkezők esetén, illetve magasabb fehérvérsejtszámmal és blaszt %-kal társulnak. [13] Az *FLT3* fontos szerepet játszik az őssejtek proliferációjában és differenciációjában; genetikai eltérései aktiváló mutációk, mely proliferációs előnyt eredményeznek. [4] A *FLT3* génnek három mutáció típusa ismert: a juxtamembrán régiót érintő internal tandem duplikáció (ITD), tirozin kináz domént (TKD) érintő pontmutáció,

illetve a juxtamembrán régiót érintő pontmutáció (JM-PM). [14] Az *FLT3*-ITD mutáció esetén hárommal osztható számú nukleotid épül be a juxtamembrán régióba, így az olvasási keret nem tolódik el, funkcióképes fehérje íródhat át a mutáns génről. Az *FLT3*-ITD az egyik leggyakoribb genetikai eltérés, a felnőtt AML kb. 20-30%-ban, [15-17] a gyermekkori AML 5-15%-ában van jelen. [18, 19] Az *FLT3*-TKD mutációk esetében az aminosavcserével járó pontmutációk leggyakrabban a 835. és a 836. aszparaginsav, illetve izoleucin aminosavakat érintik. Az AML betegek mintegy 7%-ban figyelhetőek meg. Az *FLT3* mutációk kialakulása az AML patogenezisében késői események, amelyet számos tanulmány alátámaszt: (i) az *FLT3* mutációk egészséges idős korúakban nincsenek jelen; [20, 21] (ii) nem figyelhetőek meg a betegek perifériás vér mintájában hónapokkal, évekkel az AML diagnózisa előtt [22, 23]; (iii) az *FLT3* mutációk ritkán, kb. 3%-ban fordulnak elő MPN akcerelált vagy blasztos fázisában [24] és <5%-ban MDS-ben; [25, 26] (iv) pre-leukémiás hematopoetikus őssejtekben nincsenek jelen; [27] (v) 85%-os stabilitással rendelkezik, gyakran eltűnik vagy új mutációként jelenik meg relapszusban. AML-ben a rat szarkóma (*RAS*) onkogén család tagjai közül az *NRAS* mutációk 7-25%-ban, míg a *KRAS* 3-5%-ban van jelen. [28, 29] AML-ben a mast/stem cell growth factor receptor (*KIT*) génben a 8-as (juxtamembrán régió) és a 17-es (2. katalitikus doménban D816V) exonok mutálódhatnak. [9]

A *NPM1* génmutáció az AML három leggyakoribb mutációjának egyike. Az *NPM1* sejtciklust szabályozó multifunkcionális fehérje, az 5q35 kromoszóma régióban helyezkedik el és 12 exonból áll. Nukleinsav kötő, hisztonkötő és oligomerizációs doménnal rendelkezik, és az N-terminális végével képez kapcsolatot más fehérjékkel. Molekuláris dajkafehérje, a preriboszómális részecskék aggregációját gátolja a nukleoluszban. Szerepet játszik a centroszóma duplikációban, illetve az alternate-reading-frame protein (ARF)-p53 tumor szupresszor út regulátora. [30] Ingázik a sejtmag és a citoplazma között. [30, 31] A normális szerkezetű *NPM1* fehérje főként a sejtmagban helyezkedik el. [31] Az *NPM1* mutációi minden esetben a gén legutolsó 12-es exonját érintik (leggyakrabban 4 nukleotid beszűródás) és a mutációk következtében a C-terminális végen frameshift alakul ki. Az *NPM1* mutációk 75-80%-a ún. A-típusú 4 nukleotid duplikáció (c.860\_863dupTCTG, p.Trp288CysfsTer12). Az A-, B- és D-típusú mutációk (B- és D- típus esetén 4 bázispár inzerció ugyanebben a pozícióban) az összes

mutáció 90%-át teszik ki, a maradék 10% ritka (nem csak ezt a 4 bázispárt érinthetik, 2. ábra). [28]



2.ábra. *NPM1* mutáció típusok Ivey és mtsai, NEJM, (2016) alapján

Az olvasási kereteltolódással járó *NPM1* mutációk nem befolyásolják az *NPM1* fehérje szintézist, de a kóros szerkezetű *NPM1* fehérje a citoplazmában lokalizálódik. A chaperon-szerepet játszó *NPM1* kóros citoplazmatikus lokalizációja számos további fehérje kóros lokalizációját és funkcióvesztését eredményezi: (i) a myeloid differenciációért felelős PU.1 transzkripciós faktor nem jut be a sejtmagba, (ii) az apurinic/apyrimidinic endonukleáz 1 (APE1), emlősökben a bázis excíziós DNS-repair (BER) kulcsenzime sem jut be elegendő mennyiségben a sejtmagba; (iii) a citoplazmatikus mutáns *NPM1* kaszpáz 6 és kaszpáz 8 gátló hatású, ezáltal az apoptózis károsul; (iv) a citoplazmatikus mutáns *NPM1* F-box and WD repeat-containing protein 7  $\gamma$  (Fbw7 $\gamma$ )-t köt, ezáltal károsítja az E3 ubiquitin-protein ligáz komplexet, és a c-Myc ubiquitinációt és proteozómális degradációt. [31] Az *NPM1* gén mutációja a leggyakoribb genetikai eltérés AML-ben (főként NK esetében, közel 50%-ban), alapító mutáció, mely külön entitást képez a WHO 2016-os osztályozása szerint. [2, 32] Számos bizonyíték azt mutatja, hogy az *NPM1* mutációk közvetlenül felelősek az akut leukémiás transzformációért, ezért leukémia alapító mutációknak tekinthetők: (i) az *NPM1* mutáció hematológiai betegséggel nem rendelkező emberekben, még idősekben sincs jelen [20,

21, 33]; (ii) *NPM1* mutációk nem mutathatók ki AML-es betegeknél hónapokkal vagy évekkel az AML megnyilvánulása előtt [22, 23]; (iii) Az *NPM1* mutációk meglehetősen ritkán (kb. 2-3%) fordulnak elő pre-leukémiás myeloid malignus daganatokban, például myelodiszpláziás szindrómában (MDS) vagy myelodiszpláziás/ myeloproliferatív neoplazmában (MDS/MPN), amelyeket elsősorban az AML-re való progresszió jellemez [34]; (iv) Az *NPM1* mutációk nincsenek jelen pre-leukémiás hematopoetikus őssejtekben. [27, 35] (v) További bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az *NPM1* mutációk leukémiát inicializáló tulajdonságokkal rendelkeznek az, hogy relapszusban az *NPM1* mutáció ismételt megjelenési aránya magas, melyet számos klinikai megfigyelés során 86-100%-ig bizonyítottak. [36-45]

A DNS metiláció a DNS kémiai módosulását jelenti, metil csoportok hozzáadódása (addíciója) DNS-t alkotó bázisokhoz (főleg a guaninban és a citozinban gazdag szekvenciákhoz). A DNS bizonyos bázisai általában metilált formájukban találhatóak mind a prokariótákban, mind az eukariótákban. A DNS metilációt szabályozók fehérjék közé tartozik a DNS (citozin-5)-metiltransferáz 3A (*DNMT3A*), izocitrát dehidrogenáz 1 és 2 (*IDH1* és *IDH2*), Ten-eleven-translocation-2 (*TET2*) valamint az Enhancer of zeste 2 (*EZH2*). A *DNMT3A* gén mutációi a de novo AML kb. 20-30%-ában van jelen, ezáltal az AML három leggyakoribb mutációjának egyike a korábban tárgyalt *FLT3* és *NPM1* gének mellett. [9] Az enzim egy metil csoportot rak a citozinra (epigenetikai jelenség). A citozin-metiláció a transzkripcionálisan nem aktív gének szabályozó régióira jellemző, ebből következik, hogy a DNS-metiláció valószínűsíthetően gátolja a transzkripciót. A *DNMT3A* mutációi lehetnek: missense, nonsense, frameshift, in frame, a leggyakoribb a 882. arginin (R882) missense mutációja, amely egy mutációs forrópontot képvisel. A gén érintettsége NK-AML-re jellemző, és gyakrabban idősebb betegeknél figyelhető meg. A *TET2* a DNS demetiláció iniciális lépéseiben játszik fontos szerepet: a DNS 5-metilcitozin nukleotidjainak 5-hidroximetilcitozin átalakulását katalizálja. [46, 47] Inaktiváló mutációi szintén NK-AML-re jellemzőek, az esetek 10-20%-ában, illetve intermediér citogenetikával figyelhető meg. [9] A *TET2* inaktiváció összességében DNS hipermetilációt eredményez és a myeloid transzkripció faktorok átírása is gátlódik, aminek eredményeként a hematopoetikus őssejtek differenciációja blokkolódik. [48, 49]

Az IDH1 és IDH2 enzimek a citrátkör izocitrát  $\alpha$ -ketoglutarát átalakulását katalizálják. Aktiváló, funkció nyéréssel járó mutációik,  $\alpha$ -ketoglutarát mellett 2-hydroxy glutarát onkometabolitot is képeznek, [50] amely gátolja a TET2-t. IDH1 vagy IDH2 és TET2 gének mutációi ugyanazon beteg esetében együtt nagyon ritkán fordulnak elő, mert ugyanaz a hatásmechanizmusuk. [51, 52] Az IDH1 és az IDH2 gének a 2q34 és 15q26 kromoszómán találhatóak meg, az IDH1 fehérje a citoszolban, míg az IDH2 fehérje a mitokondriumban. [53, 54] Az IDH1 mutáció AML-ben 7-14%-ban, az IDH2 mutáció 8-19%-ban figyelhető meg. [12, 55] Mutált IDH1 esetében a 132-es pozícióban leggyakrabban arginin-cisztein (R132C) vagy arginin-hisztidin (R132H) csere jön létre, ritkább esetekben szerin, prolin, glicin vagy leucin helyettesíti az arginint. [12, 55, 56] Az IDH2 mutáció két különböző pozícióban is létrejöhet, a 140-es pozícióban arginin-glutamin (R140Q) csere, míg a 172-es pozícióban arginin-lizin (R172K) csere következik be. [57] Az IDH1 és IDH2 mutációk szolid tumorokban és hematológiai betegségekben egyaránt megtalálhatóak, hematológiai betegségek közül főként NK-AML-ben, illetve NPM1 mutált esetekben, (kivéve az IDH2-R172K, mely nem társul NPM1 mutációval).

Az irodalomban ellentmondások vannak arra vonatkozóan, hogy az IDH1 és IDH2 mutációk pre-leukémiás vagy AML alapító mutációk. Számos tanulmány szerint az epigenetikai módosításokért felelős IDH1/2 mutációk pre-leukémiás mutációk is lehetnek (i) az IDH2 R140 mutációk nagyon ritkán előfordultak idős, hematológiai malignitásban nem szenvedő egyéneknél (IDH2 R140Q/W: 0,014%, 4/29562 személy). [20] (ii) Az IDH1 és IDH2 mutációk évekkal az AML diagnózisa előtt detektálhatók premalignus, nagy kockázatú génmutációként (8%; n=15/188; három IDH1 R132C/H/G és 12 IDH2 R140 pozitív személy, átlagban 7 évvel az AML diagnózisa előtt). [23] (iii) Az IDH1 és IDH2 mutációk szintén ritkán fordulnak elő pre-leukémiás myeloid malignus betegségekben, krónikus fázisú MPN-ben 0,8-4%, MDS-ben 4-14%, de blasztos transzformációban gyakorisága 20-25% -ra is nő. [58-61] (iv) IDH1 és IDH2 mutációk detektálhatók pre-leukémiás hematopoetikus őssejtekben. [27, 35] A variáns allél frekvencia (VAF) értékek összehasonlítása arra utalt, hogy az IDH1 és IDH2 mutációk nagyobb valószínűséggel alakulnak ki az NPM1 mutációk előtt. [12] Az IDH1/2 mutációk (különösen az IDH2 R140Q) remisszióban való jelenlétét az irodalomban az AML esetek 7-39%-ában figyelték meg. [62-65] Ez a jelenség IDH1/2 mutációk esetében, nem olyan gyakori, mint a DNMT3A, TET2, additional sex combs like 1 (ASXL1) (DTA)



génmutációk esetében, ahol az arány 51-82% között változik. [66-69] (v) Relapszusban az *IDH1/2* mutációk viszonylag magas stabilitást mutattak (a publikációkban 86-88%), hasonlóan az *NPM1* mutációhoz. [37]

A hisztonmodifikáció, metiláció, mely reverzibilis poszttranszlációs módosítás a lizin amino-csoporton történik, funkciója transzkripció aktiválás. Az *ASXL1* a hisztonmetiláció (epigenetikai jelenség) regulációjában játszik szerepet. Az AML patogenezisében főként funkció vesztéssel járó mutációit azonosították a de novo AML kb. 5-10%-ban, a szekunder AML kb. 19-50%-ában. [70] Minden mutáció a 12-es exonon található és mind heterozigóta, akár nonsense, akár frameshift és a C-terminális régiót érintik. [71] Az *ASXL1* mutáció összefügg az idős életkorral, a férfinnemmel, 8-as kromoszóma triszómiával, valamint 11-es kromoszóma eltérésekkel. [72] Hasonló funkciójú gének: *EZH2* és lysine demethylase 6A (*KDM6A*). Az lizin (K)-specifikus Metiltranszferáz 2A gén (*KMT2A*, régebbi elnevezéssel kevert vonalú leukémia *MLL*) egy DNS kötő fehérjét kódol. Két nagy átrendeződése figyelhető meg leukémiában, az *MLL* fúzió és a részleges tandem duplikáció (partial tandem duplication, PTD). Az *MLL* fúzió transzlokációk eredménye, míg a PTD intragénikus mutáció. *KMT2A* gén átrendeződések a de novo AML-ek kb. 3%-ában, a t-AML 10%-ban figyelhetőek meg. [12, 73] A transzlokációk közül több aktiválhatja a leukemogén folyamatot a hisztonmetilezés változásaival. Az *MLL/PTD* incidenciája AML-ben 5-6%; főként NK és 11 triszómiával rendelkező AML betegeknél fordul elő.

A kohezin komplex egy multiprotein komplex, mely a testvérkromatid kohéziót biztosítja, mely a replikáció során összeragasztja az utód DNS-molekulákat egészen az anafázis kezdetéig. A kohezin komplex háromtagú struktúr proteínből álló gyűrű (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*), amely a *STAG1* vagy *STAG2* fehérjékhez kötődve látja el a feladatát. Feltételezhető, hogy a szomatikus kohezin mutációk transzkripciós diszregulációhoz vezetnek, a DNS hurok formáció befolyásolásával. A DNS-hurok formálásával (topológiailag asszociált domének, TADs), amelyeket a CCCTC-kötő factor (CTCF) köt, egy magasabb rendű kromatin struktúra stabilizálódik. [74] A kohezin komplex regulálja a gyulladáshoz kapcsolódó gének expresszióját a hematopoetikus progenitorokban és myeloid sejtekben. Kohezin mutáció pozitív AML-ben a gyulladáshoz és interferon jelátviteli útvonalak alulreguláltak. Kohezin komplex mutációk korai események az AML patogenezisében, önmagukban nem elegendők az AML

kialakulásához. A kohezin komplex génjein hotspot mutáció nincs, 70% missense és 17% frameshift mutációk figyelhető meg. [75] Myeloid betegségekben kb. 12%-ban van jelen, MPN-ben kevesebb, MDS-ben és AML-ben magasabb arányban figyelhetőek meg. [75]

A spliceosome komplex géneken [splicing factor 3b subunit 1 (*SF3B1*), serine arginine-rich splicing factor 2 (*SRSF2*), U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (*U2AF1*), Zinc finger (CCCH type) RNA-binding motif and serine/arginine rich 2 (*ZRSR2*)] missense mutációk mutathatók ki, amelyek a mutált fehérjékben strukturális integritást és megváltozott funkciót eredményeznek. A spliceosome mutációk mindig heterozigóták és egyes gének mutációi kölcsönösen kizárják egymást, mivel egy normál allél jelenléte szükséges a sejt túléléséhez. Általában funkcióvesztéses mutációk nem jellemzőek, a mutációk nem inaktiválják a spliceosome-t, hanem a splicing preferenciákat változtatják meg. [76] A korai mutációk MDS-ben, MDS ring sideroblast (MDS-RS) csoportban a spliceosoma *SF3B1* mutáció az esetek 80-90%-ban van jelen. MDS-AML-re jellemzőek és remisszióban gyakran perzisztálnak. [76] Az AML esetében kb. 10%-ban vannak jelen.

A tumor szupresszor gének közé tartozik pl. a *TP53*, mely a de novo AML-ben ritka, míg a terápiához köthető vagy MDS-ből transzformálódott AML-ben kb. 15%-ban van jelen. [77, 78] A *TP53* vagy más néven p53 a genom őrzőjének is nevezik, mivel egy sejtciklus szabályozó fehérjét kódol. Nevét a molekulatömegéről kapta. Az emberi daganatok több mint fele mutáns *TP53* gént tartalmaz. Ha a *TP53* gén megsérül, a tumorok visszaszorítása jelentős kárt szenved. A *TP53* expressziójának visszaállítása gyors tumorzsugorodáshoz vezet.

### ***2.3 Genetikai prognosztikai faktorok***

Az AML betegek prognózisát számos tényező befolyásolja, mint a beteg életkora, társbetegségei, általános állapota, illetve citogenetikai és molekuláris genetikai eltérései. [79, 80] Az European LeukemiaNet (ELN) 2017 prognózis besorolása szerint genetikai abnormalitásokat három rizikó kategóriára osztották: kedvező, intermediér és kedvezőtlen.

Az ELN2017 besorolás szerint kedvező prognosztikai kategóriába tartoznak:

- t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

- inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
- mutált *NPM1 FLT3-ITD* mutáció nélkül (*FLT3-ITD<sup>neg</sup>*) vagy alacsony allél aránnyal (*FLT3-ITD<sup>low</sup>*: mutáns/vad allél arány <0,5 vagy mutáns/összes allél arány <0,33)
- biallélikus *CEBPA* mutáció

Kedvezőtlen kategóriába tartoznak:

- t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
- t(v;11q23.3); *KMT2A* átrendeződés, kivéve t(9;11)(p21.3;q23.3);
- t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
- inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM(EV11)*
- -5 vagy del(5q); -7; -17/abn(17p)
- komplex kariotípus, monoszómális kariotípus
- vad típusú *NPM1* magas *FLT3-ITD* allél aránnyal (*FLT3-ITD<sup>high</sup>*: mutáns/vad allél arány  $\geq 0,5$  vagy mutáns/összes allél arány  $\geq 0,33$ )
- mutált *RUNX1*
- mutált *ASXL1*
- mutált TP53

Intermedier kategóriába tartoznak az előző két kategóriába be nem sorolt genetikai eltérések

- mutált *NPM1 FLT3-ITD<sup>high</sup>* mutációval
- vad típusú *NPM1 FLT3-ITD<sup>neg</sup>* vagy *FLT3-ITD<sup>low</sup>* mutációval (kedvezőtlen kockázatú genetikai eltérések nélkül)
- t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
- olyan citogenetikai abnormalitások, amelyek sem a kedvező, sem a kedvezőtlen kategóriába nem kerültek besorolásra

Prognózisát tekintve az ELN2017 alapján kedvező besorolásba tartozó genetikai eltérések jelentősen jobb kimenetellel társulnak, az 5 éves túlélés a kedvező csoportban

kb. 60%, míg az intermedierekbe tartozók esetén ez 30-40% és a kedvezőtlen genetikai markerekkel rendelkező betegek esetében 5-10%-ra csökken. [80-83] A kedvező prognosztikai kategóriát képviselő *RUNX1-RUNX1T1* és *CBFB-MYH11* fúziós génekkel társulva a *KIT* mutáció kedvezőtlen prognózisú, magasabb relapszus arányt és kedvezőtlen túlélést eredményez. [84, 85] Bár az *NPM1* mutáció jelenlétét alapvetően kedvező rizikó besorolásúnak tartják, a kedvező prognózist az *FLT3-ITD* leronthatja. [86, 87] Legújabb rizikóbesorolások szerint az *FLT3-ITD*<sup>high</sup> rossz prognózissal társul. az *NPM1* mutáció státuszától függetlenül. [88] *DNMT3A* esetében az irodalomban ellentmondó adatok találhatóak a túléléssel kapcsolatban, bár tanulmányok szerint szerepe van a relapszus kialakulásában és a kezelés során kialakuló rezisztenciában is. [89]

#### **2.4 Mérfető reziduális betegség**

A minimális vagy újabb elnevezése szerint mérhető reziduális betegség (MRD) monitorozása fontos szerepet tölt be az AML betegek követésében. A morfológiailag remisszióban levő AML betegek esetében a leukémiás sejtek száma  $1:10^{-2}$ - $1:10^{-6}$  tartományban önálló, diagnózis után megítélhető prognosztikai indikátor. Az MRD vizsgálatok célja (i) objektív módszertani háttér biztosítása a mély remissziós státusz igazolására; (ii) prognosztikai és konszolidációs terápiás döntések elősegítése; (iii) relapszusok előre jelzése, korai beavatkozási lehetőség biztosítása; (iv) hematopoetikus őssejt-transzplantáció (HSCT) monitorizálás, illetve (v) gyógyszerkipróbálás és bevezetés felgyorsítása.

Az optimális MRD követésnek számos fontos pillére van, ilyen a megfelelő markerválasztás, az alkalmazott módszer, a módszer érzékenysége, a minta típusa és a vizsgálat időpontja. A jó MRD markernek korrelálni kell a leukémiás tumor tömegével (a betegség megjelenésekor jelen van, remisszióban eltűnik és relapszuskor újból megjelenik), stabilnak kell lennie (relapszuskor nem tűnik el), érzékenynek kell lennie (0,1% alatt detektálhatónak) és technikailag könnyen és gyorsan vizsgálhatónak. MRD markerként nem használhatóak az örökletes és a pre-leukémiás genetikai variánsok. Marker választásnál mindig ki kell zárni az örökletes variáns lehetőségét (pl. *CEBPA*, *RUNX1*, bőr biopszia, hajhagyma, szájnyálkahártya mintákból). Az örökletes genetikai variánsokra jellemző, hogy a csökkenő blaszt szám mellett és remisszióban a genetikai

variáns VAF értéke nem változik. A pre-leukémiás mutációk esetében is a VAF perzisztálhat teljes remisszióban, illetve vannak olyan gének, amelyek gyakran előfordulnak öregedő populációban hematológiai betegség jelenléte nélkül is (pl. *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, vagyis DTA gének mutációi). Az örökletes és a pre-leukémiás eltéréseket csak allogén hematopoetikus őssejt-transzplantáció esetén érdemes monitorozni. Vannak olyan AML genetikai eltérések, amelyek a domináns klónban vannak jelen, nem stabilak, esetükben gyakori az allélvesztés, illetve relapszusban az újonnan való megjelenés (pl. *FLT3*). Ezek a gének önmagukban nem alkalmazhatóak MRD markerként, csak kombinációban egy stabil markerrel együtt. [90]

Optimális MRD markerek azok a genetikai elérések, amelyek az AML alapító klón kialakulásáért felelősek: *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* és *RUNX1-RUNX1T1* fúziós gének és az *NPM1* génmutációk, melyek jelentős stabilitással rendelkeznek. [87, 90]

Jelenleg az AML MRD követésre négy módszer alkalmas, a multiparametrikus áramlási citometria (MFC), a kvantitatív PCR (q-PCR), a droplet digitális PCR (ddPCR) és az új generációs szekvenálás (NGS). [91] Az MFC a hematológia egyik fontos diagnosztikai és MRD követési vizsgálata, mely a sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas. Segítségével kevert sejtpopulációkban az egyes sejtípusok külön mérhetőek, analizálhatóak és szeparálhatóak fenotípusuk vagy funkcionális állapotuk szerint. Működési elve a hidrodinamikus fókuszáláson alapul, biztosítja a sejtek köpenyfolyadék áramában és a megfelelő áramlási kamrában egyesével történő elhaladását a fényforrás előtt. Eredményként a pozitív sejtek százalékos arányát adják meg a dot plot képek alapján és/vagy a fluoreszcencia intenzitás hisztogram analízis alapján. Nem nagy mintaigényű, viszonylag könnyen kivitelezhető és pár órán belül információt nyújt a mintában jelen lévő/jelen nem lévő sejtpopulációról, illetve a fenotípusról és markerekről. Jól alkalmazható, diagnózis (10 000 sejtet vizsgálnak), remisszió (MRD követés során 300 000 sejtet vizsgálnak) és relapszus időpontokban is. [90, 92]

A q-PCR régóta alkalmazott technika transzlokációk esetén. A q-PCR a PCR folyamatában ciklusonként folyamatosan méri a fluoreszcens jelet, a PCR során keletkező termék időben monitorozására, mennyiségi mérésére alkalmas módszer. A módszer előnye, hogy adatokat gyűjt az amplifikáció kezdetétől a végéig, az amplifikálás és detektálás egy lépésben valósul meg, sokkal érzékenyebb, kevesebb templatot igényel

és a felbontóképessége jobb. Megbízható, de standardizációs görbére, kontroll génre, valamint pozitív kontrollra és legalább vízkontrollra van szükség hozzá. [91] Időigényesebb vizsgálat, mint az MFC, mert a mintából először RNS-t kell izolálni, majd cDNS-t átírni. MRD követésre a *PML-RARA*, *CBFB-MYH11* és *RUNX1-RUNX1T1* transzlokációk [93-96] és az *NPM1* alkalmasak. [28] Irodalmi adatok alapján több, mint 30 tanulmányban végeztek *NPM1* q-PCR vizsgálatot. Többnyire RNS-ből átírt cDNS mintából végezték, de néhány tanulmányban DNS mintát használtak. [97] MRD követésére végzett q-PCR analízisek duplikátumban vagy triplikátumban történnek.

A ddPCR a digitális PCR elvégzésére szolgáló módszer, amely víz-olaj emulzió csepp technológián alapul. A mintát 20 000 csepre frakcionálják, és a templát molekula amplifikációja minden cseppben külön megtörténik. A ddPCR technológia a legtöbb standard TaqMan szonda-alapú vizsgálathoz hasonló reagenseket és munkafolyamatokat használ. A technika kulcsfontosságú eleme a masszív mintafelosztás. A PCR reakció után minden csepp elemzése vagy leolvasása megtörténik annak érdekében, hogy meghatározzák a PCR-pozitív cseppek frakcióját az eredeti mintában. A kapott adatok elemzése szoftver segítségével, Poisson statisztikákkal történik, annak érdekében, hogy meghatározhassuk a cél DNS templátkoncentrációt az eredeti mintában. A módszer nagy előnye a q-PCR technikához képest, hogy nem igényel standardizációs görbét, plazmid sort, sem párhuzamos méréseket, abszolút kvantifikáción alapul, alacsony mintamennyiség esetén megbízhatóbb, gátlószere nem érzékeny, magas a szenzitivitása és specificitása. [98, 99] A ddPCR pontos és precíz, akár 1,2x-es különbséget is detektál. Érzékenysége párhuzamos mérésekkel növelhető.

Az NGS technológia lényege a masszív parallel szekvenálás (MPS), ennek eredményeképpen egyszerre több minta vizsgálható és nagy áteresztőképességű. A módszernek számos formája létezik, amelyek különböző lépésekben térnek el egymástól, de végeredményben nagy mennyiségű adatot állítanak elő. Az NGS-nek fontos szerepe van az AML diagnózisakor a molekuláris háttér feltérképezésében, főként a citogenetikailag normál kariotípusú AML-ben; [100] MRD-ben történő alkalmazására jelenleg még fejlesztések történnek.

Az MRD vizsgálathoz alvadásgátolt csontvelő vagy perifériás vér alkalmas. Csontvelőből 5-10 ml szükséges, amennyiben egyidejűleg több vizsgálatra is minta küldés történik az első szívásnak kell MRD monitorozásra mennie. Perifériás vérből 20

ml szükséges, de ha a fehérvérsejt szám alacsony ( $<1000/\mu\text{l}$ ), akkor még több mintára van szükség.

A jelenlegi nemzetközi ajánlás szerint MRD vizsgálatra mintát küldeni a 2. ciklus indukciós kezelés után, a 2. ciklus konszolidációs kezelés után, illetve a kezelés végén javasolt. Amennyiben allogén HSCT-ra kerül a beteg, abban az esetben kemoterápia után, de  $<4$  héttel a kondicionáló kezelés előtt szükséges az MRD vizsgálat. Az ajánlás szerint az első 2 évben minden 3. hónapban csontvelőből és perifériás vérből is el kell végezni a vizsgálatot. Ha valamilyen oknál fogva a csontvelő mintavétel nem megoldható, akkor 4-6 hetente szükséges a perifériás vérből az MRD vizsgálat. [90] A 2. év után a relapszus esélyének figyelembevételével egyéni elbírálás alatt történik a mintaküldés MRD vizsgálatra.

A molekuláris MRD az AML relapszus és összesített túlélés független rizikófaktora. A hagyományos rizikófaktoroktól (pl. életkor), a diagnóziskor történt genetikai prognosztikától és az MFC MRD-től független. Az AML molekuláris MRD jelenleg az AML betegek mindennapi monitorozásába kell beépülnie, több marker egyidejű szűrése, követése az elvárás.

## **2.5 Kezelés**

### **2.5.1 Kemoterápiás kezelés**

Az AML kezelésében az első jelentős előrelépés 1973-ban történt, ekkor jelent meg az ún. „7+3” terápiás protokollról szóló közlemény. [101] Mára az AML standard indukciós kezelésévé vált a „7+3”, 7 napig  $100\text{-}200\text{ mg/m}^2$  citarabin (AraC) és 3 napig  $60\text{ mg/m}^2$  tartó daunorubicin infúzió. Az indukciós kezelés hatására a fiatal betegek 60-80%-ban, az idősek 40-60%-ban érhető el teljes remisszió. [82, 102, 103] A mindennapi gyakorlatban daunorubicin helyett idarubicint vagy mitoxantront is használnak. Számos tanulmány foglalkozott az optimális daunorubicin dózis meghatározásával ( $45\text{ mg/m}^2$ -től  $90\text{ mg/m}^2$ -ig). [104-107] Sokkal jobb eredményeket nem értek el magas dózisú daunorubicin alkalmazásával, így a jelenlegi ajánlás szerint az a fontos, hogy daunorubicin szint nem lehet kevesebb, mint  $60\text{ mg/m}^2$ . Hasonlóan az alkalmazott citarabin dózis vizsgálatára is folytak tanulmányok. [108, 109] A tanulmányok szerint, indukciós terápiában a citarabin dózis, nem haladhatja meg az  $1000\text{ mg/m}^2$  mennyiséget.

[110] Amennyiben a beteg az első indukciós kezelés hatására nem kerül CR-be akár második indukciós (reindukciós) kezelés is adható.

Az AML kezelésében a posztremissziós vagy más néven konszolidációs kezelés létfontosságú. Azok a betegek, akik az indukciós kezelést követően CR-be kerülnek posztremissziós terápiában részesülnek, mely nagy dózisu 1000-1500 mg/m<sup>2</sup> vagy 2000-3000 mg/m<sup>2</sup> citarabin, illetve allogén hematopoetikus őssejt transzplantáció (allo-HSCT). Tanulmányok szerint, azonban a 3000 mg/m<sup>2</sup> citarabin nem hatásosabb, mint az 1000-1500 mg/m<sup>2</sup> mennyiség. [108, 111] Az irodalmi adatok szerint a nagy dózisu citarabin alkalmazásában, inkább a ciklus száma a fontos, ami a tanulmányok többségében 2-4 ciklus.

Idős vagy társbetegségekkel rendelkező betegek nem alkalmasak intenzív kemoterápiára. Ezen betegek, főként idősek esetében kis dózisu citarabin (LDAC) terápiát alkalmaznak 10 napig. LDAC alkalmazásával 15-25%-ban érnek el CR-t. [112] Az idős betegek esetében hipometiláló ágenseket, [113, 114] mint az 5-azacitidin (AZA), decitabin vagy guadecitabin terápiát is használják. Egy tanulmány szerint a LDAC-nal szemben a decitabin alkalmazása esetén a medián túlélés magasabb volt. [114] Kísérőbetegségekkel rendelkező egyének esetében tüneti per os hidroxürea kezelést adhatnak.

A betegek kórlefolása során hatalmas problémát jelent a primer refrakter betegek és a relapszus kezelése, amelyeknek jelenleg nincs standard terápiája. A már eleve intenzív indukciós és posztremissziós terápiában részesülő betegek esetében a relapszus kezelésére nagy dózisu citotoxikus mentő kezelést adnak, mely az esetek jelentős részében FLAG-IDA: Fludarabin- Idarubicin- nagy dózisu citarabin- granulocytakolóniastimuláló faktor (G-CSF) vagy MEC mitoxantron-etopozid-közepes dózisu AraC. A FLAG-IDA kezeléssel 46-63%-ban érhető el CR, míg a MEC-vel 18-63%-ban. [115] Második CR elérése esetén allo-HSCT is alkalmazható. Azon betegek esetében, akik nem alkalmasak intenzív mentő terápiára a kezelési lehetőségek limitáltak. LDAC kezeléssel a relapszus utáni túlélés mindössze 5-6 hónap, [116] azacitidin és decitabin alkalmazásával a medián túlélés 6-9 hónap idős relabált vagy refrakter AML betegek esetében. [117-119]

Molekuláris genetikai eltérések kezelésére léteznek mutáció specifikus célzott terápiák. Első és második generációs *FLT3* inhibitorok segítségével kezelik az *FLT3*



mutáció pozitív betegeket. Első generációs inhibitorok a midostaurin, lestaurtinib, sunitinib, sorafenib és tandutinib. Ezek még nem *FLT3*-specifikusak, más tirozin kinázokat is gátolnak. A második generációs inhibitorok, mint a quizartinib, crenolanib vagy gilteritinib, már hatékonyabbak és specifikusabbak, kevesebb toxicitással. *FLT3*-ITD mutáció pozitív betegek kezelése során felmerülhet az *FLT3* inhibitorokkal szembeni rezisztencia, melynek hátterében szekunder *FLT3* TKD mutáció állhat. [120] A crenolanib in vitro kísérletekben *FLT3* D835 mutációra is hatékony volt. [121] Az *IDH1/2* mutációk kezelésére néhány tanulmány szerint a hypometiláló szerek is alkalmasak lehetnek, [122, 123] de ellentmondó adatok szerepelnek az irodalomban. [124] Léteznek olyan kis molekulájú inhibitorok, melyek csökkentik az  $\alpha$ -ketoglutarát 2-hydroxyglutarát átalakulást az enzim aktív részéhez kötődve. [125] Az enasidenib és ivosidenib a Food and Drug Administration (FDA) által elfogadott *IDH2* (enasidenib) és *IDH1* (ivosidenib) gátlószerek. [126, 127] Az *IDH1* és *IDH2* mutációk esetében is kialakulhat rezisztencia az inhibitorokkal szemben pl. *IDH1*-*IDH2* izotípusváltás miatt. [128-130] A Bcl-2-inhibitorok közé tartozó venetoclax is kedvező eredményeket mutatott *IDH* pozitív AML betegek körében. A *DNMT3A*, *IDH* és *TET2* mutációk általában idős korban jelennek meg a decitabin és azacitidin jobb válaszadási rátát biztosít ezeknek a betegeknek, illetve az olyan betegeknek, akiknek nem adható intenzív kemoterápia. A legrégebben alkalmazott célzott kezelés a *PML-RARA* esetében az all-transz-retinsav (ATRA). Ebben az esetben is kialakulhat rezisztencia, ezért napjainkban már antraciklint és ATRA-t használnak indukciós kezelésként. Relabált illetve refrakter *PML-RARA* betegek kezelésében arzén-trioxidot (ATO) alkalmaznak.

Napjainkban már az antitestek és immunterápiák is felvetődnek lehetséges kezelési módnak. AML-ben új terápiás lehetőségként monoklonális antitestek (mint a CD33, CD44, stb.), bispecifikus antitest (BiTE) és kiméra antigén- receptor expresszáló T-sejtek (CAR T) jelentek meg.

### 2.5.2 Allogén HSCT

Az allo-HSCT az AML leggyakoribb posztremissziós kezelési módszere. Kedvező prognosztikai besorolással rendelkező betegek esetében a HSCT nem indokolt az első CR-ben. [131-133] Olyan betegeknél indokolt, akik szekunder AML-ben

szenvednek, intermedier vagy kedvezőtlen genetikai prognosztikai faktorokkal rendelkeznek, illetve akiknél MRD pozitivitás figyelhető meg. [87, 132, 134]

A transzplantáció során a beteg, recipiens hematopoetikus őssejteket kap egy donortól. A donornak lehetőség szerint humán leukocita antigén (HLA) identikusnak kell lennie a recipienssel. Amennyiben rendelkezésre áll identikus testvérdonor, abban az esetben a testvérdonor az elsőként választandó. Ha azonban nem áll rendelkezésre, akkor nemzetközi regiszterben HLA-identikus idegen donort (matched unrelated donor: MUD) keresnek. Az utóbbi években, úgynevezett haplo donorokat is választanak, ebben az esetben 50%-os a HLA egyezés (donor lehet: apa, anya, testvér, gyermek).

A humán leukocita antigén (HLA) rendszer vagy más néven major histocompatibility complex (MHC) a 6-os kromoszómán helyezkedik el. Az MHC molekulák funkciója az immunológiai értelemben vett saját vagy nem-saját fehérjék részleges lebontásakor keletkező peptidek megkötése és T-sejteknek történő bemutatása, antigénprezentálása. Transzplantáció során allogén válaszként az eltérő MHC allélokat hordozó, más emberből származó sejtek nagymértékű immunológiai választ váltanak ki, illetve keresztreagálnak antigénspecifikus T sejt receptorokkal. Emberben a fő szövet-összeférhetőségi antigéneket HLA gének kódolják. Az MHCI-be tartozik a HLA-A, -B és -C, az MHCII-be a HLA-DP, -DQ valamint -DR. A donor kiválasztását segíti az úgynevezett Killer cell immunglobulin-like receptor (KIR) vizsgálat, mely allélspecifikus multiplex polimeráz láncreakcióval történik és a természetes ölő sejtek (natural killer, NK) felszínén véletlenszerűen expresszálandó fehérjéket vizsgálja.

Az őssejtgyűjtés a donortól (csontvelő vagy aferesis módszerrel gyűjtött perifériás vér) általában a recipiens kezeléssel párhuzamosan, a kondicionáló kezelés befejezése után a 0. napon történik. A kondicionáló kezelés lehet myeloablatív (MAC), amelyet főként akut hematológiai betegségek, fiatalabb vagy jó általános állapotban lévő betegek körében alkalmaznak, ellentétes esetekben a csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés (RIC) választandó. A transzplantáció során a donor őssejtjeit bejuttatják a recipiens keringésébe, majd a beteg további kezelést kap a fertőzések kivédésére, a kilökődés megelőzésére.

### 2.5.3 HSCT kimenetelét befolyásoló faktorok

A HSCT kimenetelét több klinikai (pl. betegség típusa, stádiuma, társbetegségek, életkor stb.) és genetikai (pl. HLA) faktorok befolyásolják. Számos szövődménye van, mint a szervkilökődés, relapszus, szervkárosodás, fertőzések, autoimmunitás, akut és krónikus Graft-versus-Host Betegség (GvHD), melyek mind hozzájárulnak a transzplantációval összefüggő jelentős halálozáshoz. [135-137] A GvHD a HSCT során bejuttatott immunkompetens sejtek (T-limfociták) a gazdaszervezet ellen irányuló reakciója, melyet főként a magas HLA-expressziójú szöveteket, mint a bőr, nyálkahártya és epeúti hámsejteket érintik. A GvHD-nek 4 fokozata van, a legsúlyosabb a grade III és IV már gyakran végzetes kimenetelű lehet. Az immunmediált szövődmények kialakulása és súlyossága a recipiens és a donor immunogenetikai háttérétől függ. [138-140]

A citokinek fontos szerepet játszanak a transzplantáció utáni immunválaszban. A gyulladástkeltő és a gyulladáscsökkentő citokinek egyensúlya meghatározhatja az allo-HSCT utáni szövődmények következményeit. A transzformáló növekedési faktor B1 (TGFB1) az immunrendszer pleiotróp szabályozó citokinje, amely különböző módon befolyásolja a különféle limfocita sejtek proliferációját, differenciálódását, migrációját és túlélését, beleértve a CD4 + és CD8 + T-sejteket, a CD25 + szabályozó T-sejteket vagy a B-sejteket. Főként T sejtek és vérlemezkék szekretálják, de epitél, endotél és kötőszöveti sejtek is. A TGFB1 szabályozó hatással van a veleszületett és a szerzett immunrendszerre is. Egerekben a TGFB1-hiány szabályozatlan celluláris és humorális immunitáshoz és autoantitest-képződéshez vezet, amely progresszív gyulladásként nyilvánul meg. [141] Egyes tanulmányok szerint post-HSCT korai fázisában a magasabb TGFB1 szintnek védő hatása van az akut GVHD (aGvHD) kialakulása ellen. [142-145] A későbbi fázisokban azonban a magasabb TGFB1 a fibroplasia és a hegesedés, a krónikus GvHD (cGvHD) szövet-specifikus megnyilvánulásaihoz kapcsolódik. A TGFB1 szabályozó hatása a klinikai helyzettől, a többi immunsejtekkel való kölcsönhatásuktól és a többi citokin koncentrációjától függ. [146-149]

A *TGFB1* génje a 19q13.1-q13.3 kromoszóma régióban található. Az irodalomban a *TGFB1* génnek számos egy pontos nukleotid polimorfizmusát (SNP) írták le. Az 5' szabályozó és a szignálpeptid régiókban elhelyezkedő variánsok felelősek a citokin szekréciójának és a plazmaszintjének egyének közötti eltéréseiért. Számos tanulmány vizsgálta a funkcionális *TGFB1* polimorfizmusok (pl. c.29T>C, p.Leu10Pro; c.75G>C,

p.Ala74Pro) hatását a HSCT kimenetelére, azonban az eredmények ellentmondásosak voltak. [146, 150-154] A probléma megoldásának okáért a kaukázusi populációban a *TGFB1* promoter haplotípus szerkezetének feltérképezését végezték el. A tanulmány szerint a p001 haplotípus korrelált a csökkent túléléssel és a megnövekedett transzplantációhoz köthető halálalással MUD transzplantáció esetén, ha a variáns jelen volt a recipiensben. [150] Ez a haplotípus szoros összefüggést mutatott a -1347C>T variánssal. A -1347T variáns homozigóta hordozói, amelyeket a tanulmányban vizsgáltak, egészséges egyéneknél megnövekedett *TGFB1* transzkripciót és magasabb plazmaszintet mutatnak. [150, 155, 156]

### 3. Célkitűzések

Munkánk során az akut myeloid leukémia genetikai biomarkereinek vizsgálatát tűztük ki célul.

- 1.) A Dél-pesti Centrumkórház - Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet (régi nevén Egyesített Szent István, Szent László Kórház, ESZSZK) Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályán 2001. január és 2020. december között diagnosztizált és kezelt felnőtt AML betegek adatbázisának kibővítése és folytatása.
- 2.) Az AML betegek diagnóziskor jelen lévő mutációinak (*FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*) gyakoriságának, azok egymással való társulásainak, relapszusban mutatott stabilitásuknak vagy esetlegesen újbóli megjelenésüknek vizsgálata.
- 3.) Érzékeny ddPCR módszer beállítása *NPM1* mutáció esetén DNS és RNS alapú vizsgálatokra egyaránt, illetve *IDH1/2* mutáció tekintetében DNS alapú vizsgálatra.
- 4.) Az *NPM1* mutáció típusának meghatározása MRD monitorozásra kuratíván kezelt, remisszióba került, diagnóziskor *NPM1* mutáció pozitív AML betegek esetében, az indukciós kezelést követően (DNS és RNS mintákból egyaránt, amennyiben elérhető volt), illetve HSCT előtt (DNS mintákból).
- 5.) *IDH1/2* mutációk MRD monitorozása kuratíván kezelt, remisszióba került, diagnóziskor *IDH1* vagy *IDH2* mutáció pozitív AML betegek esetében, az indukciós kezelést követően és HSCT előtt DNS alapú módszer segítségével.
- 6.) 2007. januártól - 2013. decemberéig a fent említett intézetben, illetve osztályon allogén HSCT-vel kezelt recipiensek és donorok *TGFBI* -1347C>T genotípusának meghatározása, ezáltal az összesített túlélés és a nem relapszushoz köthető halálozás (NRM) elővetítése.
- 7.) A *TGFBI* -1347C>T genotípus szerepének vizsgálata a szövődmények összefüggésében.

## 4. Módszerek

### 4.1 Vizsgált betegek

#### 4.1.1 AML betegcsoport

A kutatásban a Dél-pesti Centrumkórház - Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályán 2001. január és 2020. december között diagnosztizált és kezelt 916 felnőtt AML beteg vett részt. A betegek 49%-a (n=449) férfi, 51%-a (n=467) nő, a medián életkor az AML diagnózisakor 54 év (tartomány: 16-94 év). Munkacsoportunk egy már korábbi közleményében ismertette a 2001-2009 között diagnosztizált és kezelt betegek adatait [157], illetve egy másik közleményben a 2010-2018 közötti betegek adatait [158]. MRD követés 116 *NPM1* mutációval rendelkező és 62 *IDH1* vagy *IDH2* mutáció pozitív és beteg esetében történt. Az *FLT3*-ITD alacsony (*FLT3*-ITD<sup>low</sup>) és magas (*FLT3*-ITD<sup>high</sup>) allélarány elkülönítése, a morfológiai leukémia mentes állapot (MLFS), az összesített túlélés (OS) és a relapszus mentes túlélés (RFS) definícióit az ELN 2017 ajánlásai írták le. [87] Mivel a komplett remisszió (CR) és az inkomplett remisszió (CR<sub>1</sub>) ELN2017 meghatározása [87] szerinti adatok nem álltak rendelkezésünkre, tanulmányunkban remissziónak az MLFS-t tekintettük. Az adatok gyűjtése és analízise retrospektív módon történt.

#### 4.1.2 HSCT betegcsoport

A *TGFBI* genotípust 409, 2007. január és 2013. december között allogén HSCT-vel kezelt betegen vizsgáltuk. A HSCT a fent említett intézetben és osztályon történt. A betegek 56%-a (n=231) férfi és 44%-a (n=178) nő. A transzplantációkor az átlag életkor 43 év (tartomány:19-73 év) volt. A HSCT-vel kezelt betegek különböző malignus hematológiai betegségekben szenvedtek, de jelentős részük, 38%-uk (n=155) AML beteg volt. Az OS a HSCT napjától a bármilyen okból bekövetkező halálig vagy az utolsó nyomon követésig számoltuk. A betegek átlagos követése 48,8 hónap volt. A relapszust versengő kockázatnak tekintettük a NRM-t. A gombás és bakteriális fertőzések előfordulását a HSCT első 30 napjában és a halál előtt 30 nappal vizsgáltuk. A GvHD (akut és krónikus), a cytomegalovírus (CMV), az infekció/reaktiváció, relapszus és a transzplantációhoz köthető trombotikus mikroangiopátia (TA-TMA) a már leírtaknak

megfelelően került meghatározásra.[159, 160] Az adatok gyűjtése és analízise retrospektív módon történt.

## **4.2 Citogenetikai vizsgálati módszerek**

Citogenetikai eredmény 861 AML beteg esetében volt elérhető. A citogenetikai vizsgálat során kromoszóma (kariotípus) elemzés és a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) technika valósult meg a nemzetközi előírásoknak megfelelően Na-Heparinnal alvadásgátolt csontvelő mintából vagy perifériás vérből.

## **4.3 Molekuláris genetikai módszerek**

### 4.3.1 DNS és RNS izolálás

A DNS és RNS izolálás EDTA-val vagy Na-citráttal alvadásgátolt friss csontvelő vagy perifériás vérből történik. A DNS izolálás Puregene Gentra Isolation Kittel (Gentra Puregene Blood Kit, 1000 ml, katalógus szám: 158389), és a MagCore Genomic DNA Whole Blood Kittel (katalógus szám: MGB400-05) történt, a MagCore Nucleid Acid Extractor nevet viselő automata segítségével az előírásoknak megfelelően, majd -20°C-on tárolásra kerültek.

Az RNS izolálás Trizol reagens segítségével történt (Invitrogen, katalógus szám: 15596018), melyet reverz transzkripció követett (High Capacity cDNA RT kit with RNase Inhibitor; Life Technologies, katalógus szám: 4374966 reagens alkalmazásával). A reverz transzkripció PCR programja 25°C 10 percig, ezt követően 37°C 120 percig végül 85°C 5 percig. A reverz transzkripcióhoz átlagosan 1-3 µg RNS-t használtunk és a transzkripciót követően a cDNS-t -20°C-on tároltuk.

### 4.3.2 AML diagnózisakor alkalmazott módszerek

Molekuláris genetikai vizsgálatok közül az AML diagnózisakor *NPM1* (n=916); *FLT3*-ITD (n=916), *FLT3*-TKD (n=910), valamint *IDH1* és *IDH2* vizsgálatok (n=842) történtek. Relapszus esetén a mutációk ismételten meghatározásra kerültek. A *NPM1* [161] és *FLT3*-ITD [162] mutációk vizsgálata fragmens analízissel, kapilláris elektroforézissel valósult meg Beckman Coulter, CEQ 8000 készüléken. A fragmens analízissel a DNS molekula méretének meghatározása válik lehetővé fluoreszcensen

jelölt primerrel végzett PCR-t követően. *FLT3*-TKD mutáció vizsgálata restrikciós fragmens hossz polimorfizmussal történt. A módszer olyan genetikai eltérések (polimorfizmusok vagy mutációk) kimutatására alkalmas, amelyek létrehozhatnak vagy megszüntetnek restrikciós hasítási helye(ke)t. A vizsgálatot végül gélelektroforézis zárja (3%-os agarózgél, 70V feszültség, kb. 55 percig), amikor is méret szerint elkülönülnek egymástól a fragmensek. *IDH1* és *IDH2* mutációkat mintaszámtól függően high resolution melting (HRM) módszerrel [61] vagy multiplex allél-specifikus polimeráz láncreakcióval (AS-PCR) vizsgáltuk. A HRM egy fluoreszcencia alapú módszer, mely gyors mutáció szűrésre alkalmas, mely LightCycler készüléken (LightCycler 480II, Roche Diagnostics) valósul meg. [157] Az AS-PCR-t pontmutációk kimutatására alkalmazzák, melyet gélelektroforézissel tesznek láthatóvá. *IDH1* mutáció pozitív esetében Sanger szekvenálást végeztünk. A Sanger szekvenálás a klasszikus lánctermináció elvén alapul, mely által a DNS bázissorrendjének a meghatározása valósul meg.

#### 4.3.3 AML MRD követésére alkalmazott módszerek

A ddPCR segítségével az *NPM1* és *IDH1* vagy *IDH2* mutációval rendelkező betegek követése valósult meg. A követés alatt az indukciós terápia utáni 30-60 nap [*NPM1* n=116, *IDH1* vagy *IDH2* n=62, mindkét mutációra (dupla) pozitív n=33 AML beteg], HSCT előtti 1-30 nap (*NPM1* n=38, *IDH1* vagy *IDH2* n=22, dupla pozitív 10 beteg) értendő, amennyiben DNS minta elérhető volt. *NPM1* mutáció pozitív betegek esetében RNS minták diagnózis és MRD követése is megvalósult 39 esetben.

Az *NPM1* mutáció ddPCR módszerrel történő detektálásához használt primerek és próbák szekvenciáját a 1. táblázat tartalmazza. [163-165] Az *NPM1* A típusra (c.860\_863dupTCTG, p.Trp288CysfsTer12) specifikus reverz primert Gorello és mtsai. írta le. [164, 166] A Mencia-Trinchant és munkatársai [165] által leírt degenerált reverz primert (N típusú), olyan mutációk detektálására alkalmaztuk, amelyek ugyanabban a pozícióban történő különböző nukleotid inzerciók voltak (c.860\_863dupNNNN, p.Trp288CysfsTer12, ebben a vizsgálatban *NPM1* N típusú mutációnak nevezzük). A vizsgálatok során referencia géneket használtunk, RNS módszer esetén az *ABL1* gént [167], DNS módszer esetén a *GAPDH*-t [168]. Az összeméréshez Supermix for Probes



(no dUTP) (Bio-Rad) reagenst alkalmaztunk, minden primer 900 nM-os, minden próba 250 nM-os és minden reakcióba 100 ng DNS vagy 240 ng RNS került.

1. táblázat. Az *NPM1* ddPCR-ben használt primerek és próbák

Megnevezés	DNS/RNS	Oligonukleotid szekvenciák	Ref
Forward primer	DNS	5'-GTGTTGTGGTTCCTTAACCACAT-3'	[163]
Próba	DNS	5'FAM-TTTTCCAGGCTATTCAAGAT-MGB 3'	[163]
Reverz primer A típus	DNS/RNS	5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3'	[164]
Reversz primer N típus	DNS/RNS	5'-CTTCCTCCACTGCNNNNCAGA-3'	[165]
Forward primer	RNS	5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3'	[164]
Próba	RNS	5'FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB 3'	[164]

Az *IDH1* és *IDH2* mutációk mérése csak DNS mintából valósult meg Bio-Rad assay-k segítségével (*IDH1* R132C ID: dHsaMDV2010053, R132H ID: dHsaMDV2010055 and *IDH2* R140Q ID: dHsaMDV2010057, R172K ID: dHsaMDV2010059). A ddPCR reakciók 95°C-on 10 percig történő denaturációval indultak, ezt követte 40 cikluson keresztül 94°C-on 30 másodpercig denaturáció, 55°C-on DNS esetén és 60°C-on RNS esetén 60 másodpercig anelláció, mindezt egy 98°C-on 10 percig tartó enzim deaktiváció zárta, végül egy éjszakán át 6°C-on állt a reakció a C1000 Touch™ Thermal Cycler (BioRad) készülékben.

A ddPCR mérések abban az esetben voltak elfogadhatóak, ha a totál droplet szám > 15.000, az üres dropletok száma > 100 feltételeket teljesítették. Az MRD követés során a minták mérése duplikátumban valósult meg, hogy a 4,5-log szenzitivitást elérjük (minimum 32.000 referencia gén kópia) [169]. A háttér [limit of blank, LoB =  $\text{átlag}^{\text{negatív minták}} + 1.645 \times \text{standard deviáció (SD)}$ ] és a detekciós határ (limit of detection, LoD =  $\text{átlag}^{\text{negatív minták}} + 3.3 \times \text{SD}$ ) meghatározása 20-35 egészséges és/vagy az adott mutációra negatív AML beteg mintájából történt [63, 170].

A 2,5%-nál alacsonyabb variáns allélfrakció (VAF) 5%-nál alacsonyabb (pre) leukémiás sejtnek felel meg; a remisszió során a perzisztáló pre-leukémiás klónnal rendelkező minták 2,5% feletti VAF értéket mutattak.

#### 4.3.4 *TGFBI* -1347C>T SNP genotipizálása

A *TGFBI* -1347C>T (a korábbi publikációkban -509C>T néven említett, rs1800469) genotípust olvadási görbe analízissel vizsgáltuk LightCycler 480II készülék segítségével. A reakciót 20 µL ösztérfogatban végeztük, mely 2x-es MyTaq mixet (Gyártó: BioLine, katalógus szám: BLI25042), 0.3 µM LCF primert, 1 µM LCR primert, 0.5 µM anchort, 0.5 µM sensort (2. táblázat) és 25 ng DNS-t tartalmazott. A reakció kezdeti denaturációval kezdődött 95°C-on 3 percig, 70 denaturálási ciklus 95°C-on 30 másodpercig, anelláció 52°C-on 40 másodpercig, elongáció 72°C-on 60 másodpercig tartott, amelyet olvadási görbe analízis követett 40-től 80°C-ig (folyamatos detektálás: 0,03 C/s).

2. táblázat. A *TGFBI* -1347C>T genotipizálásra alkalmazott primerek és hibridizációs próbák

Megnevezés	Oligonukleotid szekvenciák
LCF primer	5'-CAT GGG AGG TGC TCA GTA AA-3'
LCR primer	5'-GGC TGG GAA ACA AGG TAG-3'
Anchor	5'-Cyanine-CCT GTT GCC CCC TCC TCC CA -3'- Phosphate
Sensor	5'-ACC CTT CCA TCC CTC AGG T-3'-Fluorescein

#### 4.4 Statisztikai módszerek

A kategorikus változókat Chi-négyzet próbával és Fischer-egzakt próbájával, míg a folytonos változókat Mann-Whitney illetve Kruskal-Wallis tesztekkel elemeztük mindkét vizsgálatunk során. Az univariancia analízisben a Kaplan-Meier módszert alkalmaztuk az OS, RFS kiszámítására log-rank statisztikákkal [87]. Az OS-t a diagnózis, az RFS-t a remisszió időpontjától számítottuk. A transzplantáció előtti és a transzplantáció utáni MRD monitorozáshoz, illetve a *TGFBI* SNP vizsgálatokor a túlélések összehasonlítását a HSCT időpontjától kezdve végeztük. Az időintervallum az esemény bekövetkeztéig (halál/relapszus) vagy az utolsó megfigyelés napjáig tartott. Multivariancia analízis Cox-regressziós modell segítségével történt. A hazard ratiót (HR) és a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallumot (CI) számoltuk ki, illetve interakció elemzést is végeztünk. A szövődmények kumulatív incidenciáját Fine-Gray teszttel

becsültük, a számítás során a halál kompetitív rizikót képviselt. Minden esetben a 0,05 alatti P értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket SPSS Statistics 22 verzióval (Armonk, NY) és a kumulatív incidencia kiszámítását EZR [171] programmal végeztük.

## 5. Eredmények

### 5.1 Genetikai eltérések diagnóziskor akut myeloid leukémiában

A 2001. január és 2020. decembere között diagnosztizált és kezelt 916 felnőtt AML-ben szenvedő beteg 81%-a (n=746) részesült kuratív terápiában, amelyből 521 beteg (70%) kapott standard „7+3” (daunorubicin + AraC) kezelést. A kuratív indukciós kezelést követően aplázia vagy nem meghatározható okok miatt 95 beteg (13%) esetében következett be halál és 524 esetben (70%) értek el remissziót. A remisszióban lévő betegek közel felénél, 46%-nál (n=243) következett be relapszus. A kuratív terápiában részesült betegek 3%-ban (n=20) autológ-HSCT-t és 26%-ánál allo-HSCT-t hajtottak végre (melyből 66 esetben HLA-azonos testvér, 86 esetben MUD és 24 esetben haploidentikus volt a donor). Az intenzív terápia ellenére 2020. decemberére a betegek 71%-a (n=529) meghalt és 29% (n=217) él. (3. táblázat)

3.táblázat. A 916 AML beteg citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői

	AML betegek	%
<b>Összesen</b>	916	
Férfi/Nő	449/467	49%/51%
Medián életkor diagnóziskor (év)	54	16-94
Citogenetika (elérhető)	861/916	94%
Citogenetika kedvező csoport	136/861	16%
Citogenetika normál kariotípus	375/861	44%
Citogenetika egyéb intermedier	132/861	15%
Citogenetika kedvezőtlen csoport	218/861	25%
<i>IDH1</i> R132C/R132H/egyéb	27/30/11 (842)	3/4/1
<i>IDH2</i> R140Q/R172K	76/18 (842)	9/2
<i>FLT3</i> -ITD pozitív	216/916	24%
ITD low	122	56%
ITD high	94	44%
<i>FLT3</i> -TKD pozitív	70 (910)	8%
<i>NPM1</i> pozitív	253	28%
<i>NPM1</i> A típus	194 (200)	97%
<i>NPM1</i> N típus		
<i>NPM1</i> non-N	6 (200)	3%
<i>NPM1</i> mutáció típus nem elérhető*	53	
Indukciós kezelés (kuratív/palliatív)	746/170	81%/19%
Kuratív (DNR&AraC/egyéb)	521/225	70%/30%
Aplázia vagy nem meghatározható okok miatt bekövetkezett halál	95/746	13%

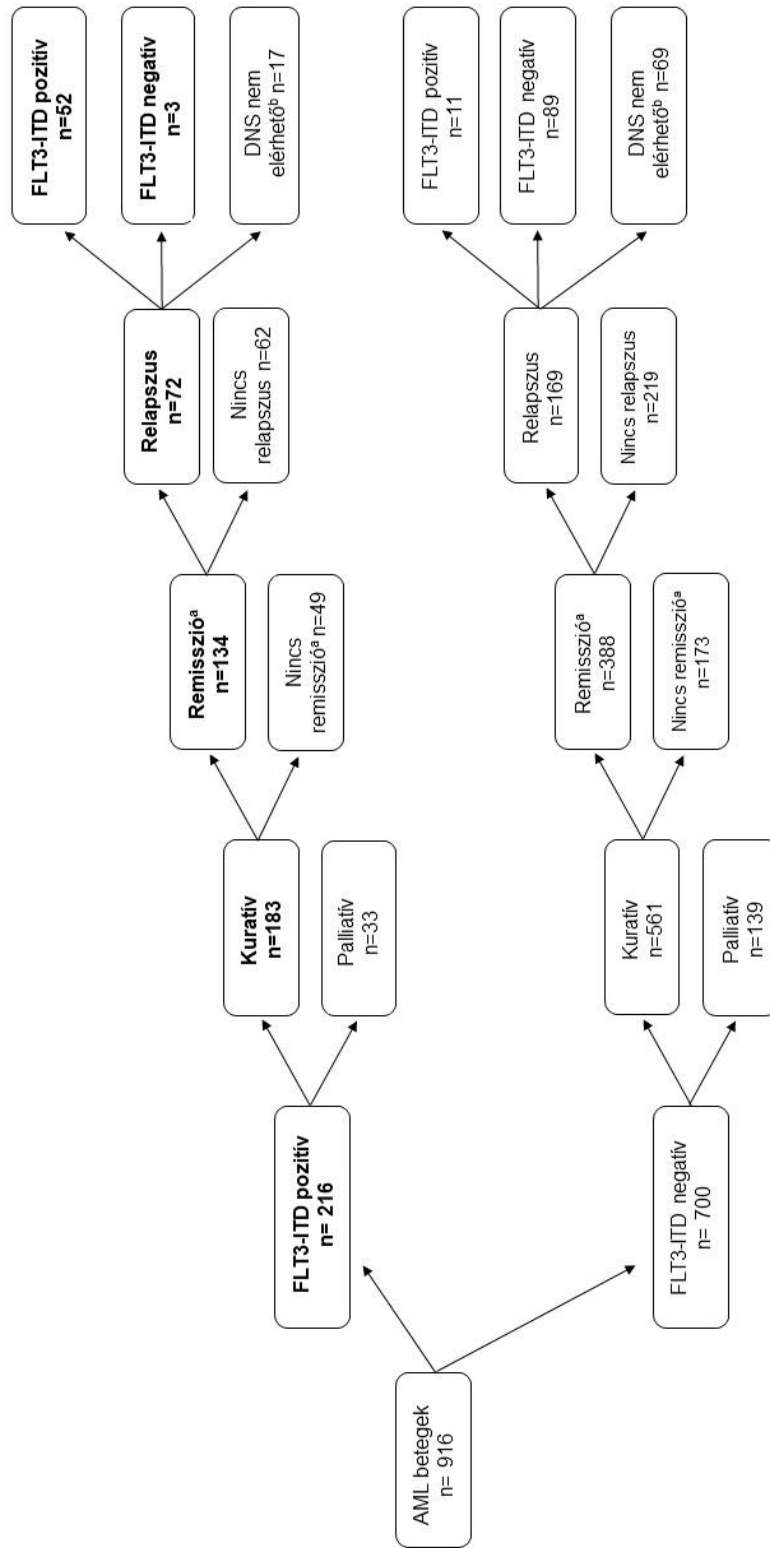
Remisszió (MLFS)	524/746	70%
Relapszus	243/524	46%
H SCT	176/746	26%

Rövidítések: DNR&AraC: standard daunorubicin & citarabin kezelés; *FLT3-ITD*: *fms*-szerű tirozin kináz internal tandem duplikáció, *FLT3-TKD*: *fms*-szerű tirozin kináz tirozin kináz domén, H SCT: hematopoetikus őssejt transzplantáció, *IDH*: izocitrát dehidrogenáz, MLFS: morfológiai leukémia mentes állapot, *FLT3-ITD* és/vagy *NPM1* mutáció nem elérhető\*: palliatív kezelésben részesülő vagy hiányzó DNS-mintákkal rendelkező betegeket nem értékeltük tovább az *FLT3-ITD* szempontjából és/vagy *NPM1* mutáció típus szempontjából

Genetikai háttérüket tekintve 861 AML betegnek (94%) volt citogenetikai eredménye. Az ELN ajánlás szerint kedvező citogenetikai csoportba 136 (16%) beteg került, intermedier besorolásba 507 (59%), melyből 375 (74%, 375/507) beteg normál kariotípussal rendelkezett és 218 beteg (25%) a kedvezőtlen rizikócsoportba tartozott.

Molekuláris genetikai markerek közül a betegek 28%-a (n=253) *NPM1*, 24%-a (n=216) *FLT3-ITD* pozitivitással rendelkezett, 8%-a (n=70, 70/910) *FLT3-TKD*, 8%-a (n=68, 68/842) *IDH1* és 11%-a (n=94, 94/842) *IDH2* mutációra mutatott pozitivitást. Az *IDH1* mutációk megoszlása a következőképpen alakult: 39% (n=27) R132C, 46% (n=30) R132H, 15% (n=11) R132G/L/S/P; míg az *IDH2* esetében 81% (n=76) R140Q, 19% (n=18) R172K volt. Az AML betegek klinikai jellemzőit az 3-5. ábrák, 4-6. táblázatok mutatják be.

3.ábra. Az FLT3-ITD pozitív és negatív betegek klinikai jellemzői



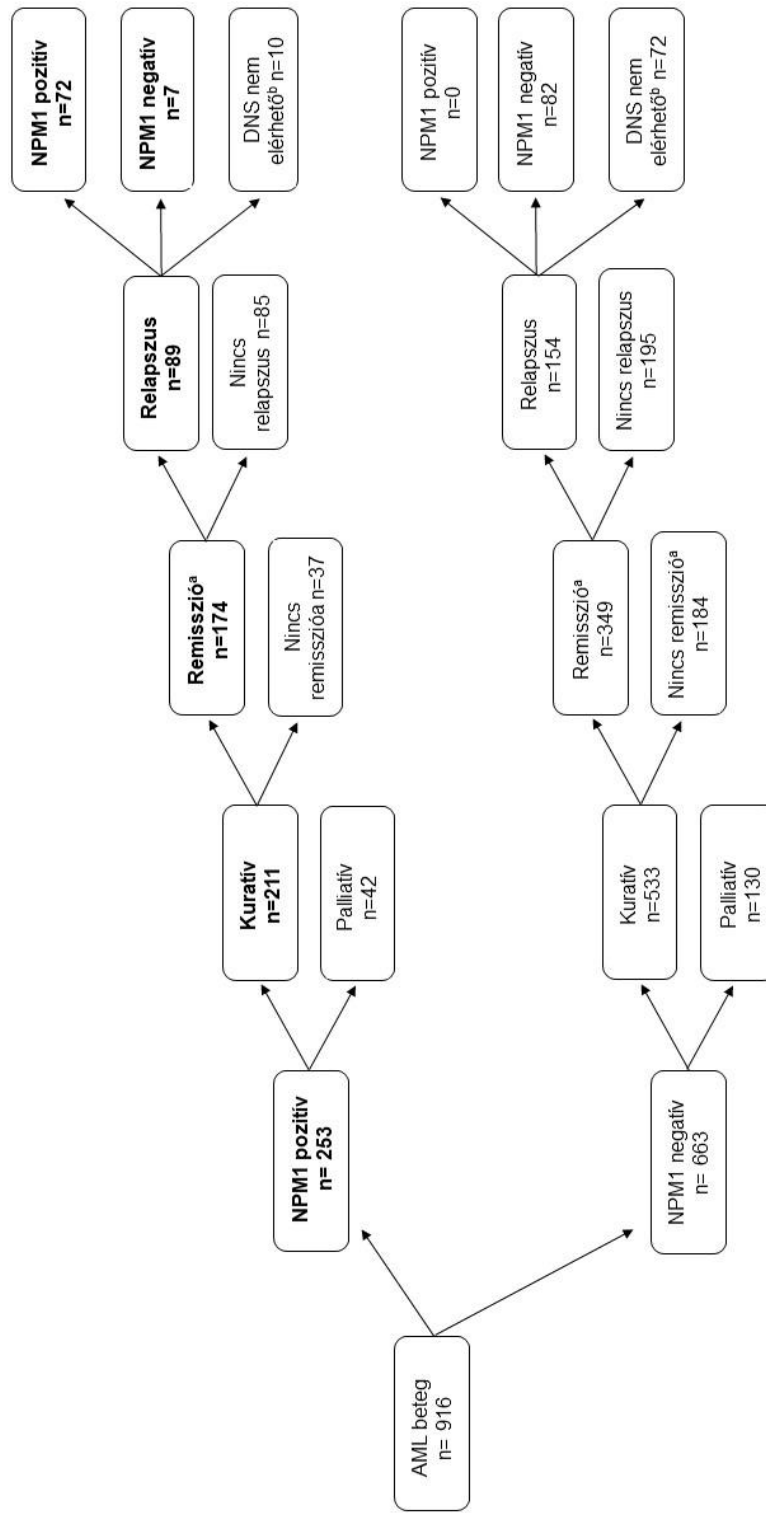
<sup>a</sup>Remissziót morfológiai leukémiamentes állapotként (MLFS) definiáltuk indukció után

<sup>b</sup>DNS nem áll rendelkezésre relapszuskor

4.táblázat. Az *FLT3*-ITD és *FLT3*-TKD pozitív AML betegek citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői

	<b><i>FLT3</i>-ITD</b>	<b>%</b>	<b><i>FLT3</i>-TKD</b>	<b>%</b>
<b>Összesen</b>	216		70	100%
<i>FLT3</i> -ITD pozitív	216	100%	15/70	21%
ITD low	122/216	56%	13/15	87%
ITD high	94/216	44%	2/15	13%
<i>FLT3</i> -TKD pozitív	15/200	8%	70	100%
Férfi/Nő	87/129	40%/60%	36/34	51%/49%
Medián életkor diagnóziskor (év)	51	(tartomány: 19-83)	48	(tartomány: 19-77)
Citogenetika (elérhető)	200/216	93%	66/70	94%
Citogenetika kedvező csoport	23/200	11%	13/66	20%
Citogenetika normál kariótípus	131/200	66%	36/66	54%
Citogenetika egyéb intermedier	28/200	14%	10/66	15%
Citogenetika kedvezőtlen csoport	18/200	9%	7/66	11%
<i>NPM1</i> mutáció típus nem elérhető	54/36/26 (916)	6%/4%/3%	17/9/7 (916)	2%/1%/1%
<i>IDH1</i> R132H/R132C/egyéb	6/5/3 (842)	0,7%/0,6%/0,4%	5/2/2 (842)	0,6%/0,2%/0,2%
<i>IDH2</i> R140Q/R172K	16/0 (842)	2%/0%	4/0 (842)	0,5%/0%
Indukciós kezelés (kuratív/palliatív)	183/33	85%/15%	62/8	89%/11%
Kuratív (DNR&AraC/egyéb)	130/53	71%/29%	48/14	77%/23%
Aplazia vagy nem meghatározható okok miatt bekövetkezett halál	18/183	10%	12/62	19%
Remisszió (MLFS)	134/183	73%	47/62	76%
Relapszus	72/134	54%	18/47	38%
HSCT	46/183	25%	20/62	32%

Rövidítések: DNR&AraC: standard daunorubicin & citarabin kezelés; *FLT3*-ITD: *fms*-szerű tirozin kináz internal tandem duplikáció, *FLT3*-TKD: *fms*-szerű tirozin kináz tirozin kináz domén, HSCT: hematopoetikus őssejt transzplantáció, *IDH*: izocitrát dehidrogenáz, MLFS: morfológiai leukémia mentes állapot, *NPM1* mutáció nem elérhető\*: palliatív kezelésben részesülő vagy hiányzó DNS-mintákkal rendelkező betegeket nem értékeltük tovább az *NPM1* mutáció típus szempontjából

4.ábra. Az *NPM1* pozitív és negatív betegek klinikai jellemzői

<sup>a</sup>Remissziót morfológiai leukémia mentes állapotként (MLFS) definiáltuk indukció után

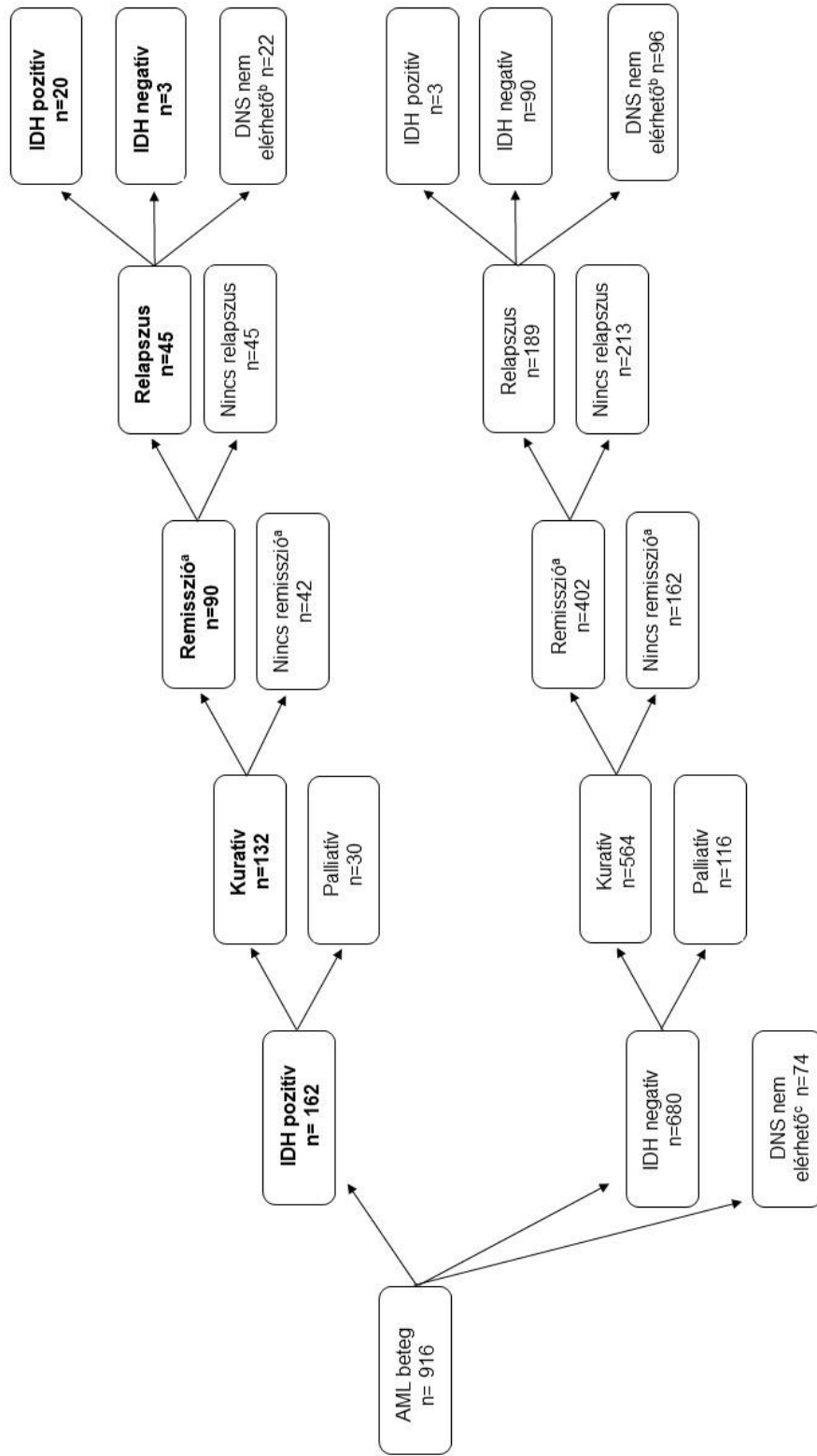
<sup>b</sup>DNS nem áll rendelkezésre a relapszus időpontjában



5. táblázat. Az *NPM1* pozitív AML betegek citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői

	<i>NPM1</i> pozitív	%	<i>NPM1</i> pozitív MRD követett	%
<b>Összesen</b>	253		116	
<i>NPM1</i> A típus	194/200	97%	90/116	77.6%
<i>NPM1</i> N típus			26/116	22.4%
<i>NPM1</i> non-N	6/200	3%	0	0%
<i>NPM1</i> mutáció típus nem elérhető*	53		0	0%
<i>NPM1</i> detektálható relapszusban	72/79	91%	42/45	93%
Férfi/Nő	104/149	41%/59%	51/65	44%/56%
Medián életkor diagnóziskor (év)	53	(tartomány: 19-85)	48	(tartomány: 19-75)
Citogenetika (elérhető)	226/253	89%	107/116	92%
Citogenetika kedvező csoport	0/226	0%	0/107	0%
Citogenetika normál kariótípus	192/226	85%	94/107	88%
Citogenetika egyéb intermedier	25/226	11%	10/107	9%
Citogenetika kedvezőtlen csoport	9/226	4%	3/107	3%
<i>IDH1</i> R132H/R132C/egyéb	27/4/6 (240)	11%/2%/3%	11/3/0	9%/3%/0%
<i>IDH2</i> R140Q/R172K	37/0 (235)	16%/0%	19/0	16%/0%
<i>FLT3</i> -ITD pozitív	114/250	46%	64/116	55%
ITD low	62/114	54%	39/64	61%
ITD high	52/114	46%	25/64	39%
<i>FLT3</i> -TKD pozitív	33/243	16%	15/113	13%
Indukciós kezelés (kuratív/palliatív)	211/42	83%/17%	116/0	100%/0%
Kuratív (DNR&AraC/egyéb)	168/43	80%/20%	96/20	83%/17%
Aplazia vagy nem meghatározható okok miatt bekövetkezett halál	28/211	13%	0	0%
Remisszió (MLFS)	174/211	82%	116	100%
Relapszus	89/174	51%	58/116	50%
HSCT	49/211	23%	38/116	33%

Rövidítések: DNR&AraC: standard daunorubicin & citarabin kezelés; *FLT3-ITD*: *fms*-szerű tirozin kináz internal tandem duplikáció, *FLT3-TKD*: *fms*-szerű tirozin kináz tirozin kináz domén mutáció, HSCT: hematopoetikus őssejt transzplantáció, *IDH*: izocitrát dehidrogenáz, MLFS: morfológiai leukémia mentes állapot, MRD: mérhető reziduális betegség, *NPM1* mutáció nem elérhető\*: palliatív kezelésben részesülő vagy hiányzó DNS-mintákkal rendelkező betegeket nem értékeltük tovább az *NPM1* mutáció típus szempontjából

5. ábra. Az *IDH1* és *IDH2* pozitív és negatív betegek klinikai jellemzői

<sup>a</sup>Remissziót morfológiai leukémiamentes állapotként (MLFS) definiáltuk indukció után

<sup>b</sup>DNS nem áll rendelkezésre relapszuskor

<sup>c</sup>DNS a diagnózis során nem áll rendelkezésre az *IDH1/2* vizsgálatához

6.táblázat. Az *IDH1/2* pozitív AML betegek citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői

	<b><i>IDH1/2</i> pozitív</b>	<b>%</b>	<b><i>IDH1/2</i> pozitív MRD követett</b>	<b>%</b>
<b>Összesen</b>	162		62	
<i>IDH1/IDH2</i>	68/94	42%/58%	24/38	39%/61%
<i>IDH1</i>				
R132C/132H/egyéb	27/30/11	39%/46%/15%	10/14/0	42%/58%/0%
<i>IDH2</i> R140Q/172K	76/18	81%/19%	33/5	87%/13%
Férfi/Nő	69/93	43%/57%	23/39	37%/63%
Medián életkor diagnóziskor (év)	57	(tartomány: 24-94)	49	(tartomány: 24-76)
Citogenetika (elérhető)	149/162	92%	59/62	95%
Citogenetika kedvező csoport	6/149	4%	1/59	2%
Citogenetika normál kariótípus	89/149	60%	39/59	66%
Citogenetika egyéb intermedier	39/149	26%	15/59	25%
Citogenetika kedvezőtlen csoport	15/149	10%	4/59	7%
<i>NPM1</i> A típus	46/162	28%	28/62	45%
<i>NPM1</i> N típus	27/162	17%	5/62	8%
<i>NPM1</i> non-N	1/162	1%	0/62	0%
<i>FLT3</i> -ITD pozitív	32/162	20%	15/62	24%
ITD low	24/32	75%	10/15	67%
ITD high	8/32	25%	5/15	33%
<i>FLT3</i> -TKD pozitív	13/160	8%	8/62	13%
Indukciós kezelés (kuratív/palliatív)	132/30	81%/19%	62/0	100%/0%
Kuratív (DNR&AraC/egyéb)	106/26	80%/20%	52/10	84%/16%
Aplazia vagy nem meghatározható okok miatt bekövetkezett halál	32/132	24%	0	0%
Remisszió (MLFS)	90/132	68%	62	100%
Relapszus	45/90	50%	31/62	50%
HSCT	32/132	24%	22/62	35%

Rövidítések: DNR&AraC: standard daunorubicin & citarabin kezelés; *FLT3-ITD*: *fms*-szerű tirozin kináz internal tandem duplikáció, *FLT3-TKD*: *fms*-szerű tirozin kináz tirozin kináz domén, HSCT: hematopoetikus őssejt transzplantáció, *IDH*: izocitrát dehidrogenáz, MLFS: morfológiai leukémia mentes állapot, MRD: mérhető reziduális betegség, *NPM1*

mutáció nem elérhető\*: palliatív kezelésben részesülő vagy hiányzó DNS-mintákkal rendelkező betegeket nem értékeltük tovább az *NPM1* mutáció típus szempontjából

Megfigyeltük, hogy 74 olyan beteg volt a csoportban, akik egyaránt *NPM1* és *IDH1/2* mutáció pozitívak. A 74 beteg 50%-a (37/74) volt *IDH2* R140Q pozitív, míg az *IDH1* mutációk közül főként az *IDH1* R132H társult *NPM1* mutációval (36%, 27/37). Az *IDH2* R140Q mutáció nagyobb részt *NPM1A*-típussal társult (68%, 25/37), az *IDH1* R132H azonos arányban társult *NPM1* A- és N- típusú mutációval [48-48% (13-13/27) és 2% (1/27), olyan *NPM1* mutáció, mely A- és N-primerekkel nem mutatható ki].

## 5.2 Genetikai markerek relapszuskor

A kuratíván kezelt 524 remisszióban lévő AML beteg közül 243 betegnél alakult ki relapszus. Citogenetikai eredmény 105 diagnózis-relapszus pár esetén volt elérhető. A betegek 34%-a (n=36) diagnóziskor és relapszuskor is normál kariotípussal rendelkezett, további 34%-nak a relapszuskori citogenetikája megegyezett a diagnóziskorival (de nem NK), míg 32%-nak (n=33) a relapszuskor megváltozott a kariotípusa. Regresszió 6 esetben alakult ki, progresszió 21 betegnél és 6 esetben változás lépett fel a diagnóziskori citogenetikához képest. A diagnózis-relapszus párok összehasonlításakor a citogenetika az esetek 68%-ában bizonyult stabilnak, míg az esetek 20%-ban (n=21) progresszió lépett fel relapszuskor.

*FLT3*-ITD vizsgálat 155 diagnózis-relapszus pár esetén történt. A betegek több, mint fele 57%-a (n=89) diagnóziskor és relapszuskor is negatív volt *FLT3*-ITD mutáció tekintetében és 34%-ban (n=52) az említett mindkét időpontban mutáció pozitív volt. Az *FLT3*-ITD vizsgálat tekintetében a betegek 91%-os stabilitást mutatnak és mindössze 9%-ban (n=14) történt változás (3 esetben relapszuskor már nem volt megfigyelhető *FLT3*-ITD pozitívítás, azonban 11 beteg esetében csak relapszusban jelent meg a mutáció). A diagnózis és a relapszus között eltelt idő szignifikánsan hosszabb volt azokban az esetekben, amikor az *FLT3*-ITD már nem volt kimutatható a relapszusnál, összehasonlítva a perzisztáló *FLT3*-ITD mutációval járó esetekkel [medián 70,4 hónap (tartomány: 22,4-181,1 hónap) versus 11,17 hónap (tartomány: 3,7 - 175,1 hónap); p =0,04].

*FLT3*-TKD diagnózis-relapszus pár 130 esetben volt elérhető. A betegek 90%-a (n=117) diagnóziskor és relapszuskor sem rendelkezett a mutációval és 3%-a (n=4) volt *FLT3*-TKD mutáció pozitív mindkét időpontban. A betegek 93%-os stabilitással rendelkeztek *FLT3*-TKD mutáció esetén, és 7%-ban (n=9) nem egyezett a diagnózis és relapszus során vizsgált *FLT3*-TKD mutáció eredménye (8 esetben relapszuskor eltűnt az *FLT3*-TKD mutáció és csupán 1 esetben jelent meg újonnan relapszuskor). A diagnózis és a relapszus között eltelt idő szignifikánsan hosszabb volt azokban az esetekben, amikor az *FLT3*-TKD nem volt kimutatható a relapszusnál, összehasonlítva a perzisztáló *FLT3*-TKD mutációval járó esetekkel [medián 47,3 hónap (tartomány: 13,4-168,2 hónap) versus 12,18 hónap (tartomány: 5,7 - 20,0 hónap) illetve  $p = 0,043$ ].

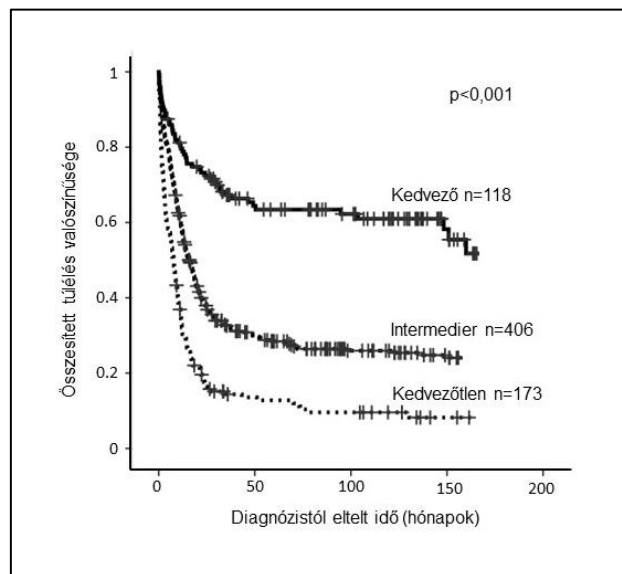
*NPM1* mutáció vizsgálat 161 diagnózis-relapszus pár esetén történt meg. A betegek 53%-a (n=82) diagnóziskor negatív volt és relapszus során sem változott, és 42% (n=72) pozitív volt mindkét időpontban. Az *NPM1* mutációstátusz 95%-os stabilitást mutatott, az esetek 5%-ában (n=7) az *NPM1* mutáció eltűnt relapszuskor. A diagnózis és a relapszus között eltelt idő nem volt szignifikánsan hosszabb azokban az esetekben, amikor az *NPM1* nem volt kimutatható a relapszusnál, összehasonlítva a perzisztáló *NPM1* mutációval járó esetekkel [medián 7,1 hónap (tartomány: 0,1-172,2 hónap) versus 6,6 hónap (tartomány: 2,2 - 152,9 hónap) illetve  $p = 0,46$ ]. *NPM1* mutáció az egyetlen olyan a munkacsoportunk által vizsgált markerek közül, amelyik relapszusban nem jelentkezett új mutációként, a 82 diagnóziskor *NPM1* mutáció negatív beteg egyike sem vált pozitívvá.

*IDH1/2* stabilitást 116 diagnózis-relapszus páron tudtuk vizsgálni. A betegek jelentős része, 78%-a (n=90) diagnózis és relapszus időpillanatában is *IDH1/2* negatív volt és 17%-a (n=20, 9 *IDH1* és 11 *IDH2*) volt pozitív. Az *IDH1/2* mutációk 95%-ban stabilnak bizonyult, 5%-ban (n=6) figyelhető meg különbség (*IDH1*: 1 betegnél eltűnt a mutáció relapszuskor, 1 betegnél újonnan jelent meg; *IDH2*: 2 betegnél eltűnt és 2 betegnél újonnan jelent meg). A diagnózistól a relapszusig eltelt idő nem bizonyult szignifikánsan hosszabbnak azokban az esetekben, amikor az *IDH1/2* nem volt kimutatható a relapszusnál, összehasonlítva azokkal az esetekkel, amelyeknél a relapszus idején tartós *IDH1/2* mutáció volt jelen [medián 7,4 hónap (tartomány: 2,2 - 11,4 hónap), szemben a 8,6 hónap (tartomány): 0,83-57,2 hónap),  $p = 0,65$ ]. A 93 diagnóziskor *IDH1/2* negatív betegben megfigyelhető, hogy 3 esetben (*IDH1* R132H: n=1; *IDH2* R140Q: n=2)

az *IDH1/2* mutációk csak relapszusnál jelentek meg. Ezen betegek diagnóziskori mintáját egy szenzitívebb ddPCR módszerrel újra mértük, és a VAF (0-0,23%) érték minden esetben a HRM és/vagy az allélspecifikus PCR kimutatási határa alatt volt.

### 5.3 Prognózis becslés diagnóziskori genetikai eltérések alapján

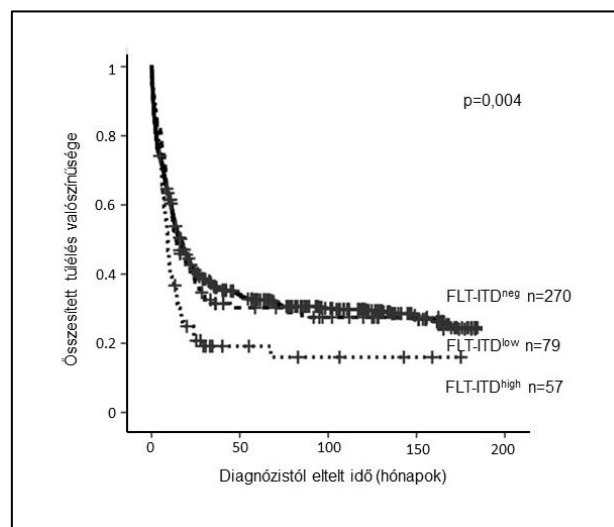
A kuratív terápiában részesülő AML betegek 24-hónapos túlélését vizsgáltuk citogenetikai eredményeik, illetve diagnóziskori *FLT3-ITD*, *NPM1*, valamint *IDH1* és *IDH2* tekintetében. A citogenetikai eredmények alapján a betegeket (n=707 kuratíván kezelt) az ELN besorolásnak megfelelően kedvező (n=128), intermedier (n=406) és kedvezőtlen (n=173) csoportba soroltuk. A kedvező és az intermedier csoportoknak hosszabb volt a 24-hónapos túlélése: a kedvező csoportban  $73,2 \pm 3,9\%$ , az intermedier csoportban  $38,4 \pm 2,4\%$ , míg a kedvezőtlenben  $17,1 \pm 2,9\%$ ,  $p < 0,001$ , mely az 6.ábrán látható.



6.ábra. A kuratíván kezelt AML betegek összesített túlélése az ELN2017 citogenetikai besorolás alapján

A molekuláris genetikai markerek közül diagnóziskor 746 kuratíván kezelt betegnek volt elérhető *FLT3-ITD*, *NPM1*, illetve *IDH1* és *IDH2* eredménye. A betegek 25%-a (n=183) rendelkezett diagnóziskor *FLT3-ITD* mutációval. A 24-hónapos túlélésben trend figyelhető meg,  $41,3 \pm 2,1\%$  az *FLT3-ITD* negatív (n=563) és  $32,2 \pm$

3,5% az *FLT3-ITD* mutáció pozitív (n=183) betegek tekintetében (p=0,051). Az ELN2017 ajánlások szerint a diagnóziskor intermedier citogenetikával (beleértve a NK-t is, n=406) rendelkező *FLT3-ITD* pozitív betegeket *FLT3-ITD*<sup>low</sup> (n=79) és *FLT3-ITD*<sup>high</sup> (n=57) kategóriákra osztottuk. A diagnóziskor *FLT3-ITD*<sup>neg</sup> és *FLT3-ITD*<sup>low</sup> betegek esetében kedvezőbb volt az 24-hónapos OS: *FLT3-ITD*<sup>neg</sup> 42,7 ± 3,0%, *FLT3-ITD*<sup>low</sup> 37,1 ± 5,5% és *FLT3-ITD*<sup>high</sup> 22,0 ± 5,6%, p=0,004 (7.ábra).

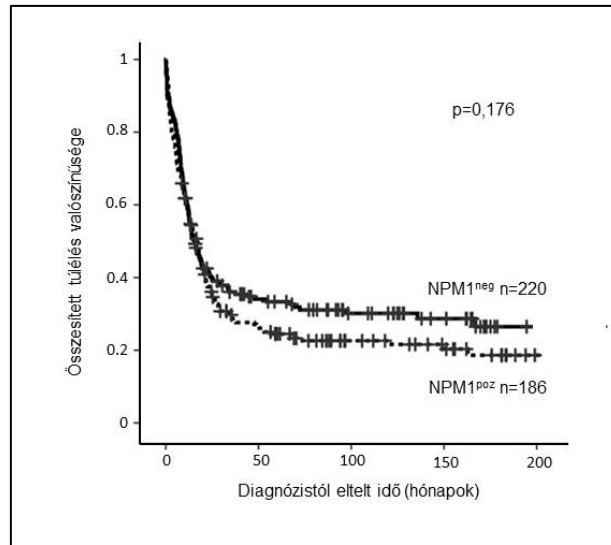


7.ábra. A kuratíván kezelt, intermedier citogenetikával rendelkező AML betegek összesített túlélésének valószínűsége *FLT3-ITD* mutáció szerint

Az *FLT3-ITD* negatív és ITD alacsony pozitív betegek túlélési esélye nagyon hasonlóan alakul (p=0,782) és komoly rizikót az *FLT3-ITD* mutáció magas pozitivitása okoz p=0,007.

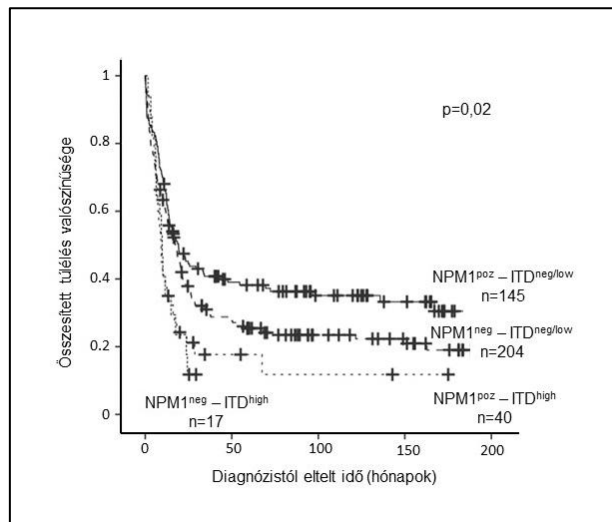
A diagnóziskori *NPM1* mutáció negativitás (n=220), illetve pozitivitás (n=186) tekintetében a 24-hónapos túlélésben különbség nem volt látható az intermedier citogenetikával (n=406) rendelkező betegek esetében (24-hónapos túlélés 40,2 ± 3,6% az *NPM1* negatív és 37,0 ± 3,3% az *NPM1* pozitív betegek esetében, p=0,176, 8.ábra).





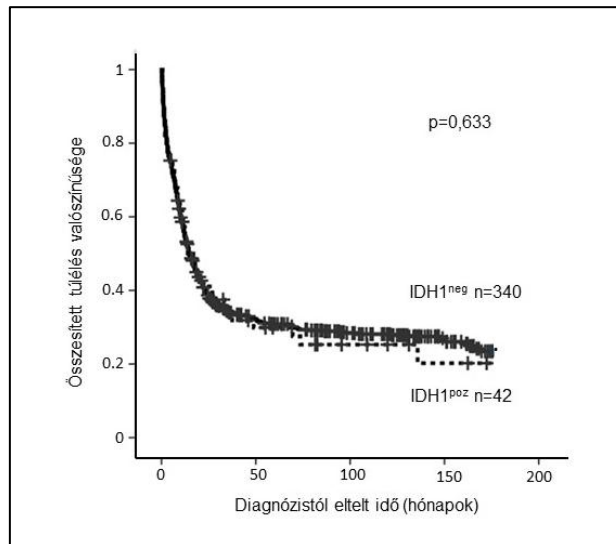
8.ábra. A kuratíván kezelt AML betegek összesített túlélése az *NPM1* mutáció alapján

A 2017-es ELN ajánlásokat figyelembe véve intermedier citogenetikával rendelkező betegek ( $n=406$ ) esetében az *NPM1* és *FLT3*-ITD mutáció társulások szignifikáns különbséget mutatnak a 24-hónapos túlélésben:  $NPM1^{neg}$ -*FLT3*-ITD<sup>neg/low</sup> esetben  $39,0 \pm 3,4$ ;  $NPM1^{neg}$ -*FLT3*-ITD<sup>high</sup>  $17,6 \pm 9,2$ ;  $NPM1^{poz}$ -*FLT3*-ITD<sup>neg/low</sup>  $44,9 \pm 4,2$ , míg  $NPM1^{poz}$ -*FLT3*-ITD<sup>high</sup> csoportban  $21,2 \pm 6,7$ ,  $p=0,02$  (9.ábra).

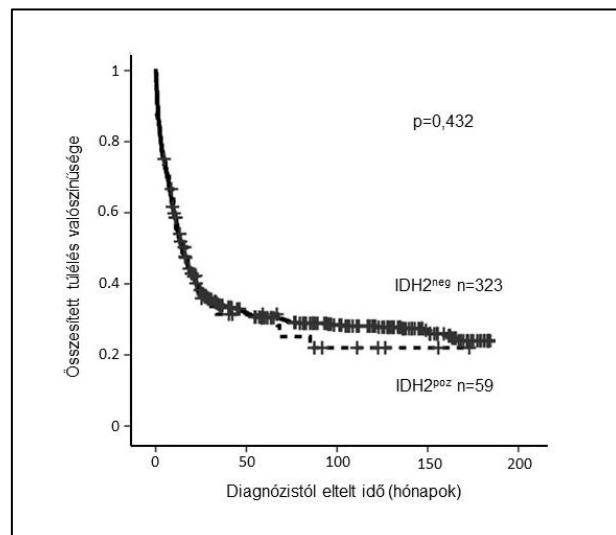


9.ábra. A kuratíván kezelt intermedier, (beleértve a normál kariotípussal rendelkező) AML betegek összesített túlélése az *NPM1* és *FLT3*-ITD mutációk alapján

A kuratíván kezelt, intermedier citogenetikai besorolásba tartozó betegek (n=382) diagnóziskori *IDH1* és *IDH2* eredményeiben a 24-hónapos túlélésben eltérése nem volt megfigyelhető a mutáció negatív (*IDH1*:  $38,2 \pm 2,7\%$ ; *IDH2*:  $37,8 \pm 2,8\%$ ) és pozitív (*IDH1*:  $45,2 \pm 7,7\%$ ; *IDH2*:  $43,8 \pm 6,7\%$ ) csoportok között  $p^1=0,633$  (*IDH1*);  $p^2=0,432$  (*IDH2*) 10.ábra és 11.ábra.



10.ábra. A kuratíván kezelt AML betegek összesített túlélése *IDH1* mutáció szerint

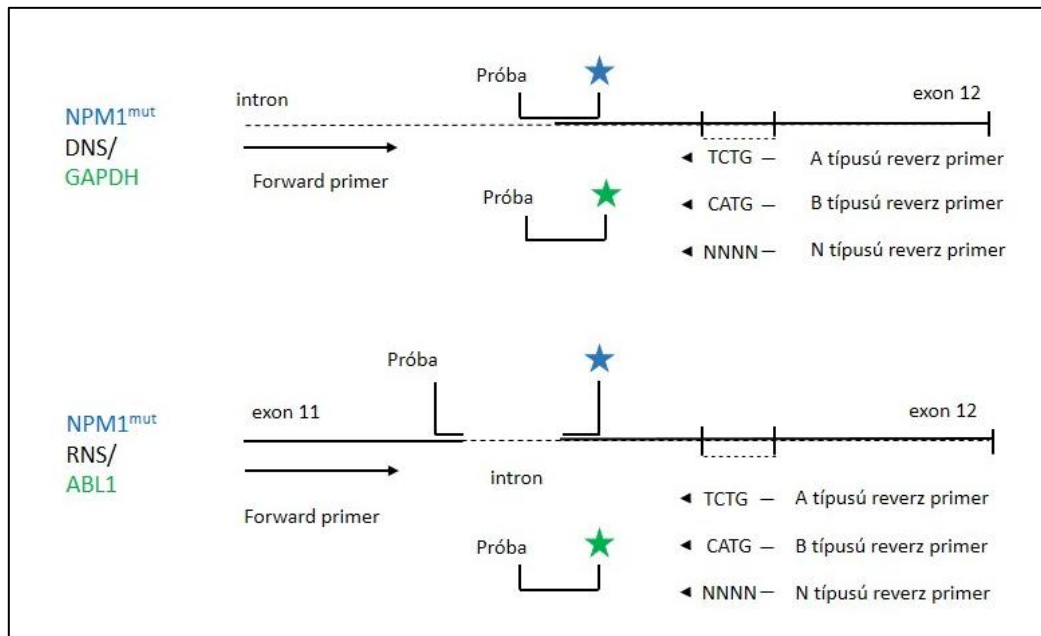


11.ábra. A kuratíván kezelt AML betegek összesített túlélése *IDH2* mutáció szerint

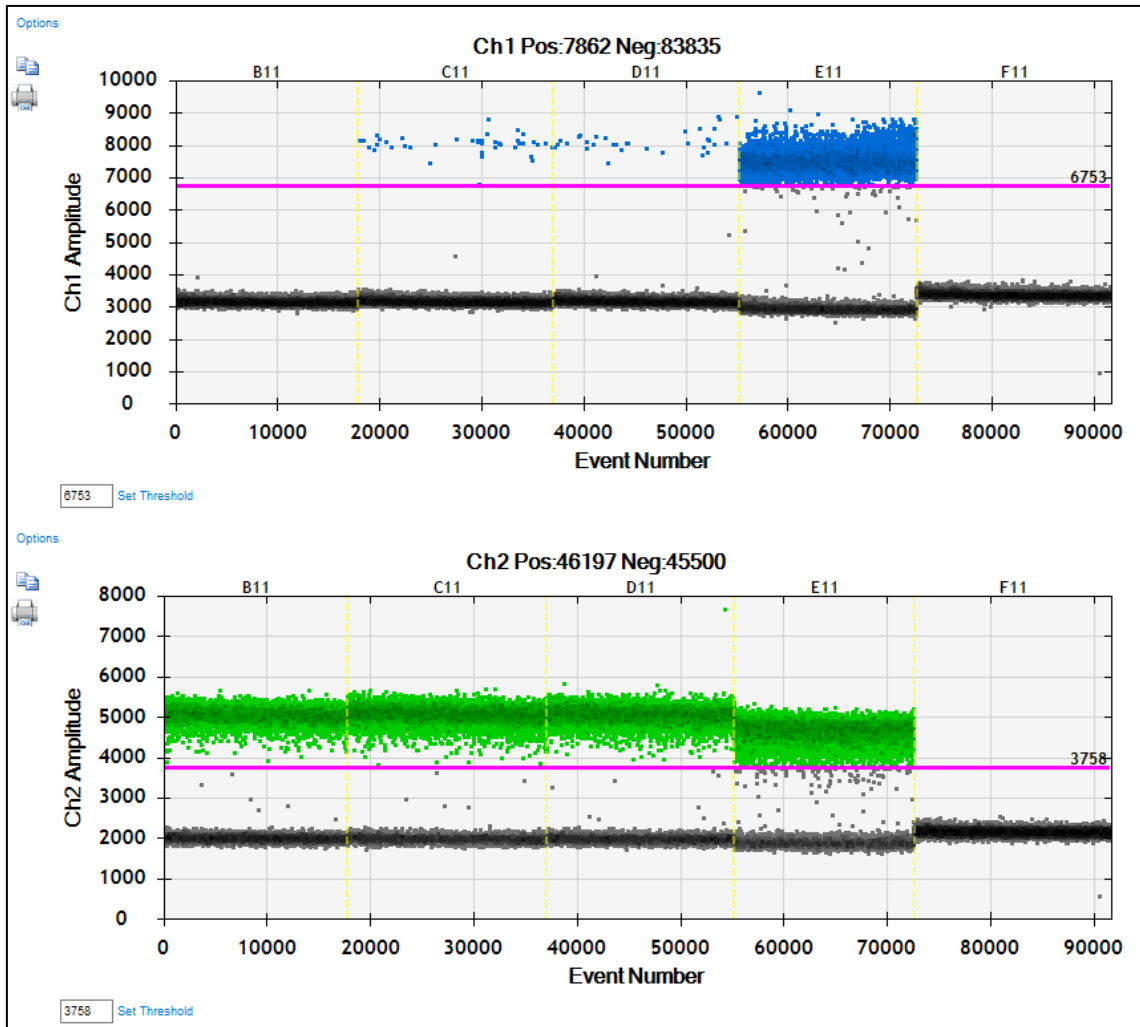
## 5.4 Prognózis becslés követés során mért genetikai markerek alapján

### 5.4.1 Droplet digitális PCR technikák beállítása MRD monitorozásra

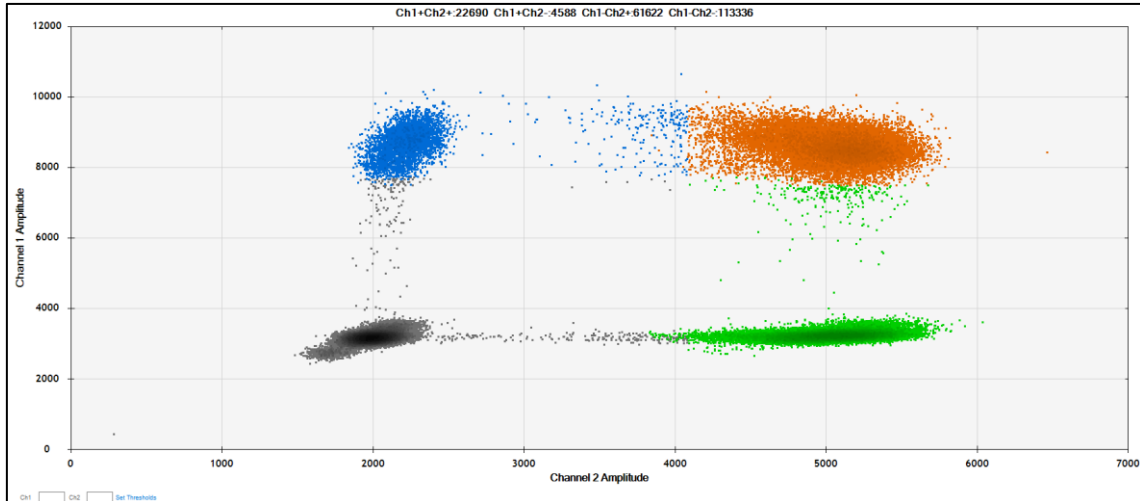
Az *NPM1* és *IDH1/2* mutációk MRD vizsgálatát ddPCR módszer segítségével végeztük. A diagnóziskor kapilláris elektroforézissel *NPM1* pozitívnak detektált betegeket (n=253) retrospektíven *NPM1*-A és -N típusú primerekkel ddPCR módszerrel vizsgáltuk. Az alkalmazott primerek és próbák elhelyezkedését a 12. ábrán kerül bemutatásra. A 253 *NPM1* pozitív betegből 53 esetben nem állt rendelkezésre minta. A 200 vizsgált beteg 97%-a (n=194) *NPM1*-A (típusos ddPCR eredmény 13-14.ábra) vagy -N típusúnak bizonyult, és mindössze a betegek 3%-a (n=6) nem volt kimutatható ddPCR-rel az *NPM1* mutáció N típusú primerrel sem. [165]



12.ábra. A ddPCR-ben használt *NPM1* primerek és próbák sematikus ábrázolása



13.ábra. Típusos ddPCR eredmény A típusú *NPM1* mutáció esetében (1D dot plot) Felső panelen kékkel jelölve (FAM) a *NPM1* pozitív, míg az alsó panelen zölddel (HEX) a referencia gén (*GAPDH*) pozitív dropleték ábrázolódnak. A rózsaszín vonal az amplifikáció pozitív és negatív dropleték elválasztására szolgáló határértéket mutatja. B11 pozíció: *NPM1* mutáció negatív minta (<0.01%), a C11 és D11 pozíció: kis mértékű *NPM1* pozitivitást mutató minták (C11: 0,21%, D11: 0,18%); E11: erősen pozitív minta (47,85%), F11: DNS templát nélküli vízkontroll.

14.ábra. ddPCR *NPM1* mutáció A típus 2D dot plot

A ddPCR módszer alkalmazása során LoB és LoD értékeket határoztunk meg. Az *NPM1*-A típusú primer esetében a ddPCR LoD-értéke alacsonyabb volt, érzékenyebb, mint az N-típusú primer esetében mind DNS, mind RNS beállításokban (7.táblázat).

7.táblázat. Az alkalmazott ddPCR módszerek leírása

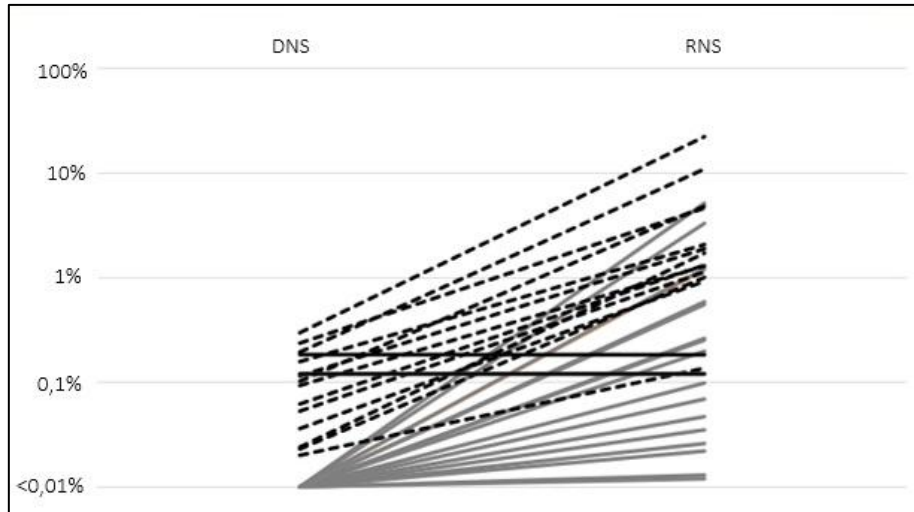
Mutáció	Típus	DNS/RNS	Kontroll minták száma	átlag (%)	tartomány (%)	LOB (%)	LOD (%)
<i>NPM1</i>	A	DNS	38	0,0000	0-0,0042	0,0018	0,0033
<i>NPM1</i>	A	RNS	22	0,0000	0-0,0000	0,0000	0,0000
<i>NPM1</i>	N	DNS	34	0,0005	0-0,0141	0,0091	0,0152
<i>NPM1</i>	N	RNS	22	0,0000	0-0,0120	0,0070	0,0120
<i>IDH1</i>	p.R132C	DNS	27	0,0293	0-0,0693	0,0620	0,0960
<i>IDH1</i>	p.R132H	DNS	27	0,0292	0-0,0967	0,0756	0,1190
<i>IDH2</i>	p.R140Q	DNS	27	0,0427	0-0,0725	0,0789	0,1200
<i>IDH2</i>	p.R172K	DNS	26	0,0142	0-0,1047	0,0655	0,1090

Rövidítések: LoB: limit of blank, LoD: limit of detection

Az *NPM1* mutáns VAF értékeket a DNS-ben és az *NPM1* mutáns expressziós szinteket az RNS-ben MRD negatívnak tekintettük, ha 0,01% alatti (A-típus) vagy 0,05% alatti (N-típus) volt.

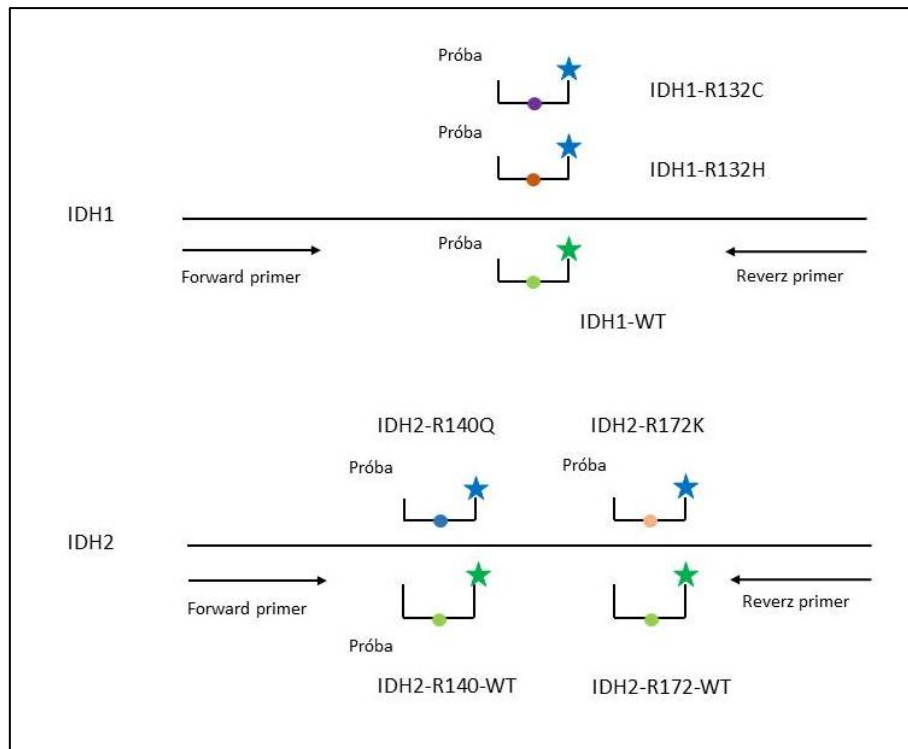
Harminckilenc beteg első indukciós terápiát követően 39 mintáját párhuzamosan vizsgáltuk RNS és DNS alapú *NPM1*<sup>mut</sup> ddPCR módszerekkel. A módszerek érzékenysége magasabbnak bizonyult az RNS mintákon. Az *NPM1*<sup>mut</sup> expressziót mutató

RNS-minták 46%-át (medián: 0,1%; tartomány: 0,01-5,1%) a velük egyező DNS-mintákban negatívnak találtuk (<0,01%). Az RNS-vizsgálat ( $NPM1^{mut}$  expresszió) érzékenyebbnek bizonyult (medián: 1,3-log; tartomány: 0,0-2,78-log) a DNS-vizsgálathoz ( $NPM1^{mut}$  VAF) képest azokban a mintákban, amelyek RNS- és DNS-szintjén egyaránt pozitívak voltak (15.ábra).



15.ábra. A DNS és RNS alapú  $NPM1$  MRD követésének összehasonlítása indukció után. A DNS alapú módszer leírja a mutáns  $NPM1$  variáns allél frekvenciáit ( $NPM1^{mut}/GAPDH$  arány), míg az RNS módszer megmutatta az  $NPM1$  RNS expresszióját ( $NPM1^{mut}/ABL1$ ). Azokat az RNS mintákat, amelyek  $NPM1^{mut}$  expressziót, de negatív variáns allél frekvenciát mutattak, folyamatos szürke vonalakkal jelöljük (18 minta, 46%). Azokat a mintákat, amelyek legalább 0,5 log magasabb RNS expressziós szintet mutattak, mint a DNS szinten detektálható  $NPM1^{mut}$  allél arány fekete szaggatott vonalakkal (19 minta, 49%) jelöljük. Csak két minta (fekete folytonos vonalak, 5%) mutatott egyenértékű  $NPM1^{mut}$  RNS expressziót és DNS allél arányt.

A diagnóziskor HRM-el és allél specifikus PCR-rel  $IDH1/2$  pozitívnak detektált AML betegeket (n=162) retrospektíven ddPCR módszerrel vizsgáltuk (16.ábra). A 162 vizsgált beteg 93%-a (n=151) ddPCR módszerrel detektálható  $IDH1$  R132C/H illetve  $IDH2$  R140Q/R172K variánst hordozott, míg a betegek 7%-át (n=11) nem tudtuk követni ddPCR módszer segítségével ( $IDH1$  R132G/L/S/P variánst hordoztak).



16.ábra. Az *IDH1/2* ddPCR-ben használt primerek és próbák sematikus ábrázolása

Ábraalírás: Az *IDH* mutáció típusok mérése külön történt; minden mérés tartalmazott egy mutációra specifikus reakciót és egy vad típusú (WT) reakciót

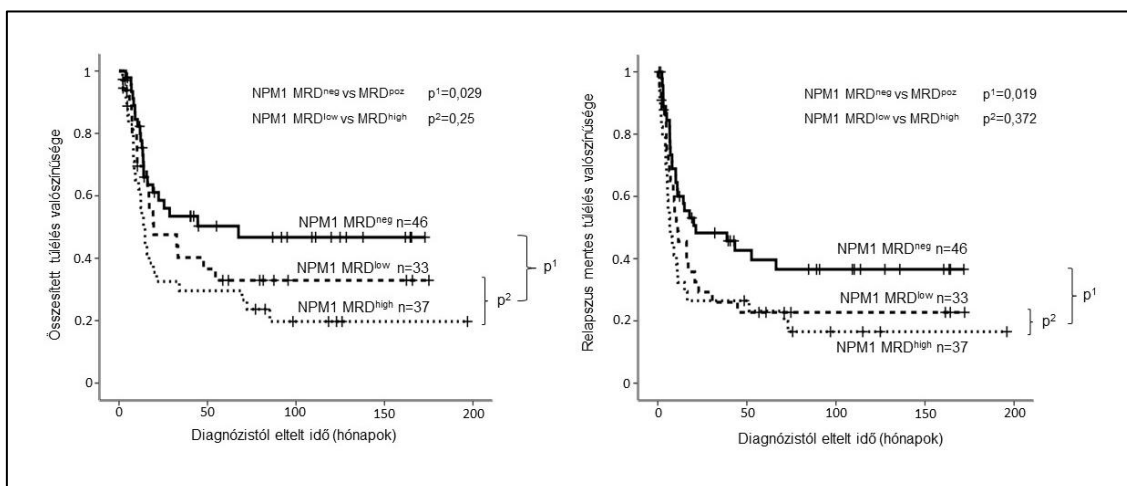
Akárcsak az *NPM1* ddPCR módszer során *IDH1/2* esetében is meghatároztuk a LoB, LoD értékeket. Az *IDH1/2* mutáció kimutatására szolgáló LoB 0,06-0,08%, a LoD pedig 0,09-0,12%, melyet a Táblázat tartalmaz. Az *IDH1/2* formák 0,2% alatti VAF értékét negatívnak tekintettük.

#### 5.4.2 Prognózis becslés *NPM1* mérhető reziduális betegség alapján

A 200 *NPM1* pozitív ddPCR módszerrel vizsgált AML beteg közül 174 került remisszióba (MLFS-t) az indukció után, azonban 5 esetben az MRD monitorozás technikai korlátok miatt nem volt megvalósítható (az *NPM1* mutációt sem A, sem N típusú primerekkel nem tudtuk kimutatni), illetve 53 beteg esetében diagnózist követően már nem volt elérhető további DNS. A 116 kuratíván kezelt *NPM1* pozitív és MRD monitorozott betegek alapvető jellemzőit, mint a nem, életkor diagnóziskor, indukciós terápia, HSCT és kimenetelek (indukciós kezelést követően aplázia vagy nem

meghatározható okok miatt bekövetkezett halál, remisszió, relapszus, citogenetikai és molekuláris genetikai adatok) az Táblázat tartalmazza.

A 116 *NPM1*-A vagy -N mutációval rendelkező betegcsoportban vizsgáltuk az *NPM1* MRD negatív (n=46) és *NPM1* MRD pozitív (n=70) betegek 24-hónapos OS és RFS értékeit, mely során kedvező eredményeket figyeltünk meg *NPM1* MRD negatív betegek esetében (24-hónapos OS: MRD<sup>neg</sup> esetben  $58,5 \pm 7,5\%$ , MRD<sup>poz</sup> esetben  $39,3 \pm 6,2\%$ ,  $p=0,029$ ; a 24-hónapos RFS:  $48,3 \pm 7,5\%$ , szemben  $27,8 \pm 5,6\%$ ,  $p=0,019$ , 18.Ábra). Az MRD pozitív betegeket tovább osztottuk MRD alacsony (MRD<sup>low</sup>, n=33) és MRD magas (MRD<sup>high</sup>, n=37) alcsoportokra. Az *NPM1* MRD<sup>low</sup> és MRD<sup>high</sup> csoportok közötti megkülönböztetés érdekében az OS-hez tartozó HR-eket hat különböző határértékben (0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1% és 2%) hasonlítottuk össze az *NPM1* A és N típus esetén külön-külön és együtt is [172]. Betegcsoportunkban az *NPM1* VAF 0,2%-ot tekintettük az alacsony és a magas alcsoportok megkülönböztetésének határértékéként. A 116 *NPM1*-A és -N összesített csoportban a különbség nem volt megfigyelhető az MRD pozitív csoporton belül (24-hónapos OS:  $47,6 \pm 9,4\%$  az MRD alacsony pozitív, szemben  $32,6 \pm 8,0\%$  az MRD magas pozitív,  $p=0,250$ ; a 24-hónapos RFS:  $29,3 \pm 8,2\%$ , szemben  $26,5 \pm 7,6\%$ ,  $p=0,372$ , 17.ábra).

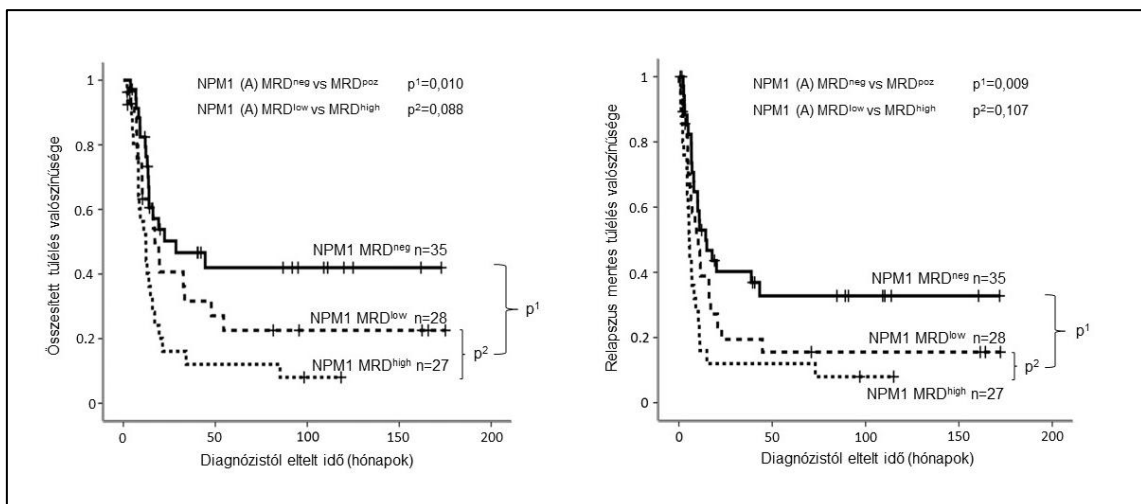


17.ábra. Az összesített túlélés és a relapszus mentes túlélés valószínűsége az *NPM1* MRD szerint indukció után. Mindkét panelen (A: összesített túlélés; B: relapszus mentes túlélés) az *NPM1* MRD<sup>neg</sup> (VAF<0,01-0,05% az *NPM1* mutáció típusától függően) és MRD<sup>poz</sup> (VAF> 0,01-0,05%) alcsoportok eredményeit a hozzájuk tartozó p<sup>1</sup> értékkel



mutatjuk be. Az *NPM1* MRD-pozitív alcsoportot tovább osztottuk MRD<sup>low</sup> (VAF=0,01–0,2%) és MRD<sup>high</sup> (VAF> 0,2%) alcsoportokba, és összehasonlítottuk a p<sup>2</sup> értékekkel.

Az *NPM1* pozitív AML betegek OS és RFS értékeit a 90 *NPM1*-A típusú betegen külön megvizsgáltuk. A 90 *NPM1*-A típusú betegből 35 beteg MRD negatív és 55 MRD pozitív volt. Az *NPM1*-A és -N nagy csoporthoz hasonlóan itt is kedvező eredményeket figyeltünk meg az MRD negatív betegek esetében (24-hónapos OS: 50,2 ± 8,9% MRD<sup>neg</sup>, szemben 27,7 ± 6,5% MRD<sup>poz</sup>, p=0,010; a 24-hónapos RFS: 40,2 ± 8,6%, szemben 15,8 ± 5,1% p=0,009, Ábra). Ebben az esetben is külön választottuk az MRD pozitív betegeket, 28 beteg került az MRD<sup>low</sup> kategóriába (0,01-0,2% közötti *NPM1* mutáns allélterhelés között), és 27 beteg az MRD<sup>high</sup> kategóriába (0,2% felett). Az MRD pozitív beteg két alcsoportja között szignifikáns különbség már nem volt látható (24-hónapos OS: 40,6 ± 10,3% az MRD<sup>low</sup>, szemben 16,1 ± 7,4% az MRD<sup>high</sup> esetén, p=0,088; és 24-hónapos RFS: 19,4 ± 7,8%, szemben 12 ± 6,5%; p=0,107, 18.ábra).



18.ábra. Az összesített túlélés és a relapszus mentes túlélés valószínűsége az *NPM1*-A MRD státusz szerint indukció után

Mindkét panelen (A: összesített túlélés; B: relapszus mentes túlélés) az *NPM1*-A MRD<sup>neg</sup> (VAF<0,01%) és MRD<sup>poz</sup> (VAF>0,01%) alcsoportok kimenetelét mutatjuk be a kapcsolódó p<sup>1</sup> értékkel. Az *NPM1*-A MRD pozitív alcsoportot tovább osztottuk MRD<sup>low</sup> (VAF=0,01–0,2%) és MRD<sup>high</sup> (VAF> 0,2%) alcsoportokra, és p<sup>2</sup> értékkel hasonlítottuk össze.

Többváltozós elemzésben az *NPM1* MRD pozitivitás (A és N típus egyaránt) az első indukciós kezelés után független kockázati tényezőnek bizonyult, az életkor, a diagnóziskor azonosított citogenetika és az *FLT3*-ITD mutáció megléte/hiánya, valamint a fehérvérsejtek (WBC) számától (OS: HR 2,16 95% CI 1,25-3,74, p=0,006; RFS: HR 2,21 95% CI 1,32-3,68, p= 0,002, 8.táblázat).

8.táblázat. Az *NPM1* MRD státusának többváltozós elemzése indukció után

	Összesített túlélés (n=116)		Relapszus mentes túlélés (n=116)	
	Hazard ratio (95% CI)	P	Hazard ratio (95% CI)	P
<b><i>NPM1</i> MRD pozitivitás</b>	2,16 (1,25-3,74)	0,006	2,21 (1,32-3,68)	0,002
Életkor	1,02 (1,00-1,04)	0,019	1,02 (1,00-1,04)	0,053
Citogenetika	1,50 (0,86-2,63)	0,155	1,62 (0,94-2,82)	0,085
<i>FLT3</i> -ITD	1,75 (1,19-2,56)	0,004	1,74 (1,23-2,46)	0,002
WBC >100.000/ $\mu$ L	0,88 (0,50-1,56)	0,656	0,93 (0,54-1,58)	0,775

<sup>a</sup>*NPM1* MRD pozitivitás VAF > 0,01-0,05% a mutáció típusától függően

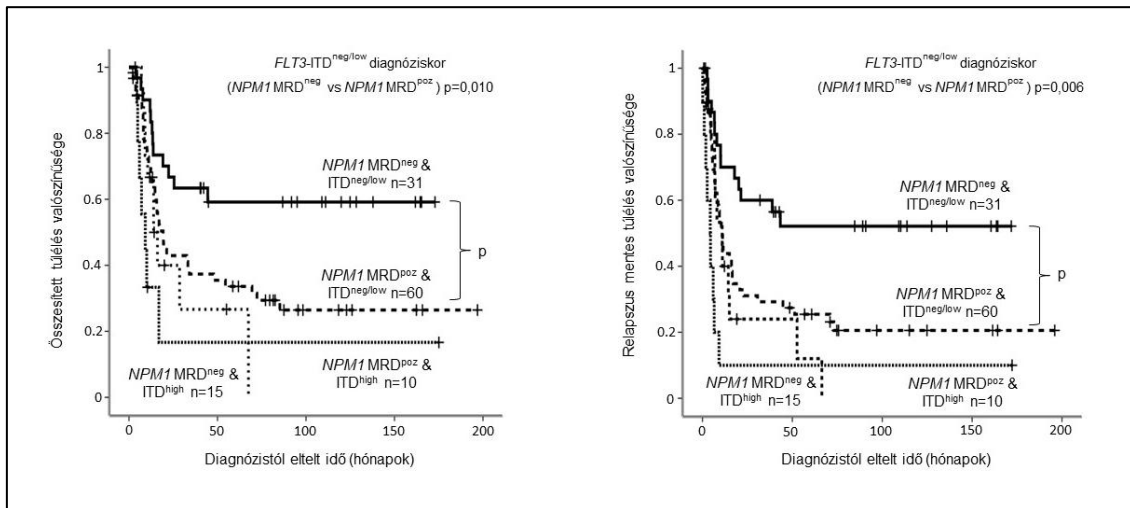
<sup>b</sup>Citogenetika normál kariotípusként (referencia), egyéb intermedier és kedvezőtlen kockázatként kódolva

<sup>c</sup>*FLT3*-ITD három kategóriába kódolva: negatív (referencia), alacsony és magas allélarány

Rövidítések: 95% CI: 95% konfidencia intervallum; *FLT3*-ITD: fms-szerű tirozin-kináz 3 - internal tandem duplikáció; MRD: mérhető reziduális betegség; *NPM1*: nukleofosmin1; WBC: fehérvérsejtszám a diagnózis időpillanatában

Az *NPM1* MRD követés során 39 olyan beteg volt, akinek diagnóziskor és a betegségének követése során egyaránt elérhető DNS és RNS mintája volt. A genomiális DNS-hez hasonlóan két vagy három log-csökkenés volt megfigyelhető a mutáns *NPM1* RNS-expresszióban az indukciós kezelést követően (*NPM1/ABLI*, n=39 beteg) [diagnóziskor: medián 610,8% (tartomány: 124,3-2882,4%), indukció után: 1,0% (tartomány: 0-398%) RNS esetében]. Az alacsony számú RNS minták ellenére is az indukció utáni magas mutáns *NPM1* expresszió korrelált a kedvezőtlen kimenettel (24-hónapos OS mutáns *NPM1* expresszió <1%: 55,2  $\pm$  12,9% versus mutáns *NPM1* expresszió >1%: 20,0  $\pm$  11,9%, p=0,005; és 24-hónapos RFS: 51,6%  $\pm$  12,5%, szemben 12  $\pm$  7,9%; p <0,001).

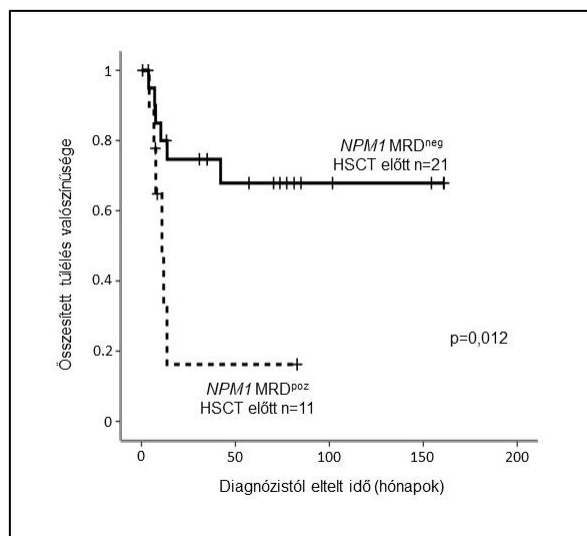
Az *NPM1* MRD jelenléte fontos prognosztikai biomarkernek bizonyult a kedvező *FLT3* ITD<sup>neg/low</sup> státuszú csoportban (*NPM1* MRD<sup>neg</sup> versus MRD<sup>poz</sup> 24-hónapos OS:  $66,7 \pm 8,6\%$  szemben:  $42,9 \pm 6,7\%$ ,  $p=0,010$ ; RFS:  $60 \pm 8,9\%$  versus  $31,1 \pm 6,2\%$ ,  $p=0,006$ ). Az *FLT3*-ITD<sup>high</sup> alcsoportban az *NPM1* MRD nem befolyásolta a túlélést. (19.ábra).



19.ábra. Összesített túlélés és relapszus mentes túlélés az *NPM1* MRD és *FLT3*-ITD allélarány szerint

Az ELN 2017 genetikai kockázati besorolás alapján az *NPM1* pozitív betegeket kedvező (*FLT3*-ITD<sup>neg/low</sup>) és intermedier (*FLT3*-ITD<sup>high</sup>) alcsoportokba sorolták. Mindkét panelen (A: összesített túlélés; B: relapszus mentes túlélés) további alcsoportokat hoztunk létre az *NPM1* MRD szerint az indukció után. Az *NPM1* MRD negativitását VAF <0,01-0,05% -nak határoztuk meg, a mutáció típusától függően.

Az *NPM1* MRD követett AML betegek közül 38 esett át allo-HSCT-n, 27 *NPM1*-A típusú és 11 *NPM1*-N típusú, melyekből 32 minta volt elérhető (24 A típusú és 8 N típusú). Az allo-HSCT előtti *NPM1* MRD negativitás kedvező prognosztikai tényezőnek bizonyult, az OS a HSCT után szignifikánsan hosszabb volt MRD negatív betegek esetén az MRD pozitív betegekhez képest (24-hónapos OS MRD<sup>neg</sup>:  $74,7 \pm 9,8\%$  szemben az MRD<sup>poz</sup>:  $16,2 \pm 14,6\%$ ,  $p=0,012$ , 20.ábra).



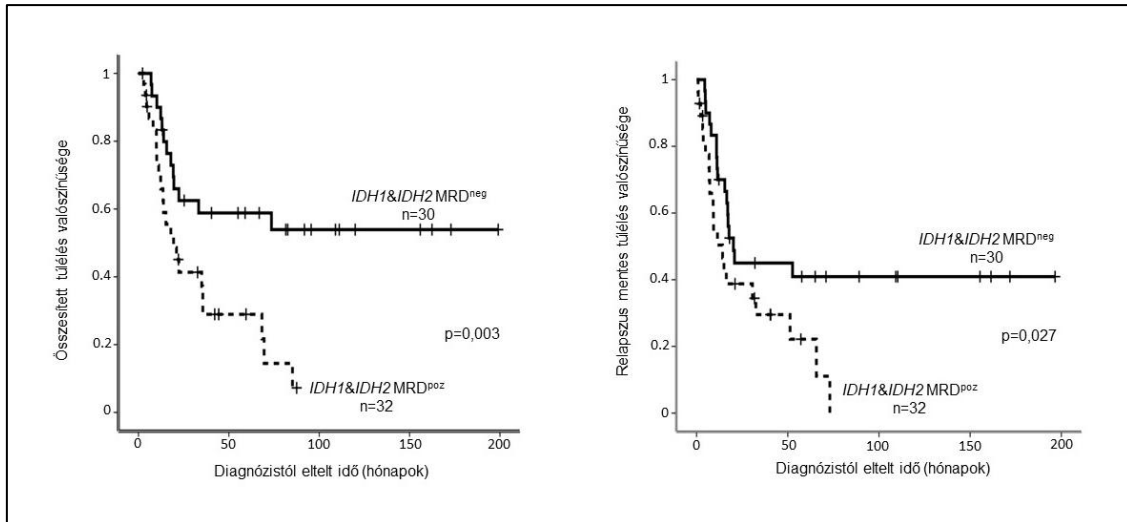
20.ábra. A HSCT előtt mért összesített túlélés az *NPM1* MRD szerint.

A HSCT előtti *NPM1* MRD negativitás VAF <0,01-0,05% érték szerint a mutáció típusától függően.

#### 5.4.3 Prognózis becslés *IDH1/2* mérhető reziduális betegség alapján

A 162 *IDH1/2* pozitív betegből 90 beteg ért el remissziót (MLFS-t) indukció után, 8 esetben az MRD monitorozás technikai korlátok miatt nem volt megvalósítható (*IDH1* R132G/L/S/P variánsok), és 20 beteg esetében diagnózist követően már nem volt elérhető további DNS. Az *IDH1/2* pozitív és MRD monitorozott betegek alapvető jellemzőit az 6.Táblázat tartalmazza.

A 62 *IDH1/2* MRD követett AML beteg OS és RFS értékeit vizsgáltuk. Elemzéseink során az *IDH1/2* MRD negatív betegek (n=30) túlélése kedvezőbb volt, mint az MRD pozitív (n=32) betegeké (24-hónapos OS MRD<sup>neg</sup>:  $62,5 \pm 9,0\%$  szemben MRD<sup>poz</sup>:  $41,3 \pm 9,2\%$ ,  $p = 0,003$ ; 24-hónapos RFS:  $45,0 \pm 9,3\%$ , szemben  $38,8 \pm 9,6\%$ ,  $p = 0,027$ , 21.ábra). Megfigyeltük, hogy remisszióban az *NPM1* mutációval ellentétben (ahol minden beteg VAF értéke 2,5% alá csökkent) *IDH1/2* mutáció VAF értéke 62 esetből 15-ben nem csökkent 2,5% alá (24%, 10 *IDH2* R140Q, 3 *IDH2* R172K, 1 *IDH1* R132H és 1 *IDH1* R132C). Hét eset *NPM1* pozitív is volt (6 *IDH2* R140Q és 1 *IDH1* R132H) a diagnózis felállításakor, de az *NPM1* mutáció ezekben a betegeken is 2,5% alá csökkent. A perzisztáló *IDH1/2* mutációban szenvedő betegek kimenetelét tekintve: 9 beteg relabált és később meghalt, 2 beteg élt HSCT után, 3 beteg teljes remisszióban élt 12 hónapos követés után és 1 beteg nem hematológiai okból kifolyólag meghalt.



21.ábra: Összesített túlélés és relapszus mentes túlélés az *IDH1/2* MRD szerint indukció után. Mindkét panelen (A: összesített túlélés; B: relapszus mentes túlélés) *IDH1/2* MRD negatívként a VAF <0,2%, míg MRD pozitívként a VAF > 0,2% értéket definiáltuk.

Multivariancia elemzésben az *IDH1/2* (variánstól függetlenül) MRD pozitivitás a túlélés független rizikófaktorának bizonyult az életkor, a citogenetikai rizikó kategória, az *FLT3*-ITD, az *NPM1* és a WBC diagnóziskor alapján (OS: HR: 2,81 95% CI: 1,09-7,23, p = 0,032, RFS: HR: 2,80 95% CI: 1,15-6,82, p = 0,023, 9.Táblázat).

9.Táblázat: Az *IDH1/2* MRD státusz többváltozós elemzése indukció után

	Összesített túlélés (n=62)		Relapszus mentes túlélés (n=62)	
	Hazard ratio (95% CI)	P	Hazard ratio (95% CI)	P
<b><i>IDH1/2</i> MRD pozitivitás</b>	2,81 (1,09-7,23)	0,032	2,80 (1,15-6,82)	0,023
Életkor	1,03 (0,99-1,06)	0,126	1,02 (0,99-1,05)	0,256
Citogenetika	1,98 (0,90-4,33)	0,089	2,36 (1,07-5,21)	0,034
<i>FLT3</i> -ITD	1,00 (0,42-2,38)	0,994	1,06 (0,49-2,28)	0,889
<i>NPM1</i>	1,62 (0,57-4,58)	0,364	2,26 (0,82-6,25)	0,115
WBC >100.000/μl	1,17 (0,49-2,78)	0,727	1,04 (0,45-2,43)	0,922

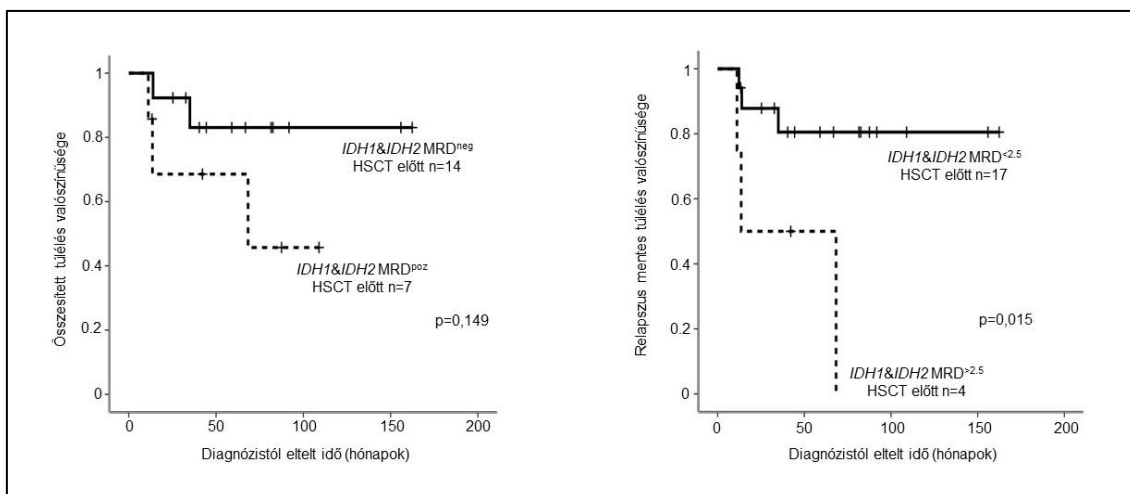
<sup>a</sup>*IDH1/2* MRD pozitivitás VAF > 0,2%

<sup>b</sup>Cytogenetika normál kariotípusként (referencia), egyéb intermedier és kedvezőtlen kockázatként kódolva

<sup>c</sup>*FLT3*-ITD három kategóriába kódolva: vad típusú (referencia), alacsony és magas allélarány

Rövidítések: 95% CI: 95% konfidencia intervallum; *IDH1/2*: izocitrát-dehidrogenáz 1/2; *FLT3*-ITD: fms-szerű tirozin-kináz 3 - internal tandem duplikáció; MRD: mérhető reziduális betegség; *NPM1*: nukleofosmin1; WBC: fehérvérsejtszám a diagnózis időpillanatában

Az *IDH1/2* MRD követett betegekből 22 esett át allo-HSCT-n és 21 esetben (10 *IDH1* és 11 *IDH2*) voltak elérhető pre-HSCT minták. Az allo-HSCT előtti *IDH1/2* MRD negatív (VAF <0,2%) betegek túlélése nem különbözött az MRD pozitív betegektől (24-hónapos OS MRD<sup>neg</sup>:  $92,3 \pm 7,4\%$  szemben az MRD<sup>poz</sup>  $68,6 \pm 18,6\%$ ,  $p = 0,149$ ). A 2,5% alatti *IDH1/2* MRD jelentősen befolyásolta a túlélést (24-hónapos OS: MRD <2,5%  $87,8 \pm 8,1\%$  versus MRD > 2,5%  $50,0 \pm 25,0\%$  allo-HSCT előtt,  $p = 0,015$ , 22.ábra).



22.ábra Az *IDH1/2* MRD összesített túlélésének valószínűsége HSCT előtt

Az A panelen az HSCT előtti *IDH1/2* MRD negativitás VAF <0,2%, a B panelen VAF<2,5%

### 5.5 Örökletes polimorfizmusok terápiát befolyásoló hatása

Vizsgálatunk során az intézményünkben malignus hematológiai betegség miatt HSCT-vel kezelt betegek (n=409), és donoraik *TGFBI* -1347C>T genotípusát vizsgáltuk. A polimorfizmus hatását három modellen vizsgáltuk: a genotípusos (CC vs CT vs TT),

domináns (CC vs CT & TT) és recesszív (CC&CT vs TT) modelleken. A recipiensek DNS-e 38 esetben nem volt elérhető, így a recipiens genotípus gyakoriságot 371 esetben tudtuk vizsgálni [CC: 140 (38%), TC: 185 (50%), TT: 46 (12%)], melyek Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak ( $p=0,206$ ).

A vizsgált csoport jellemzőit az 10. táblázat mutatja be. Közel azonos arányban történt testvér donoros (52%,  $n=210$ ) és idegen donoros (48%,  $n=199$ ) transzplantáció. A HSCT-t megelőző kondicionáló kezelés 64%-ban ( $n=261$ ) MAC volt, míg 36%-ban ( $n=148$ ) RIC. A GVHD prevenció legtöbbször takrolimusz és szirolimusz kombináció (TAC&SIR) (58%;  $n=238$ ), cyclosporin alapú (CSA) kezelést a betegek 23%-a ( $n=95$ ) kapott, míg takrolimusz (TAC) alapú kezelést 19% ( $n=76$ ).

10. táblázat: A HSCT-recipientek jellemzői a recipient *TGFBI* -1347C>T genotípusa szerint.

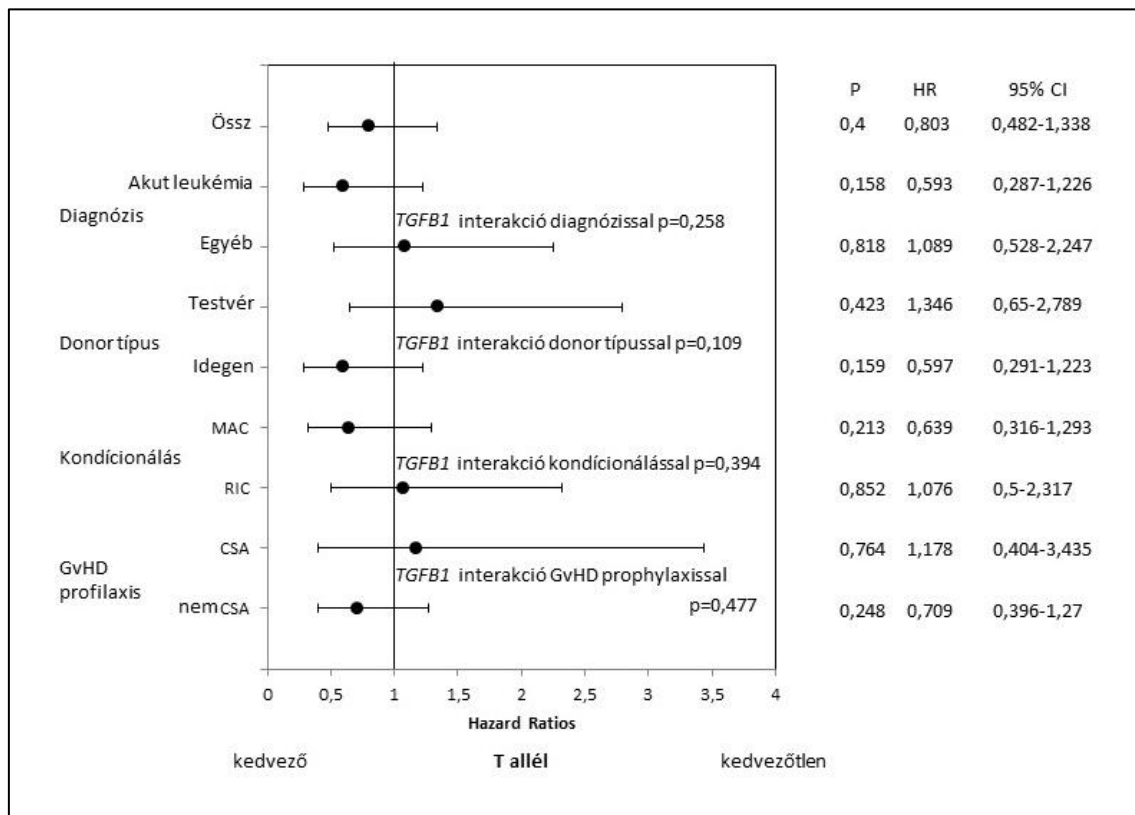
	<b>Össz</b>	<b>%</b>	<b>Rec CC</b>	<b>%</b>	<b>Rec CT</b>	<b>%</b>	<b>Rec TT</b>	<b>%</b>	<b>p</b>
<b>Nem</b>	371	100	140	100%	185	100%	46	100%	0,203
Nő	167	45%	58	41%	83	45%	26	57%	
Férfi	204	55%	82	59%	102	55%	20	43%	
<b>Életkor Tx-kor</b>									
Medián			42,3		42		40,5		0,928
Min-Max			18,9- 66,4		18,6- 73		20,1- 62,2		
<b>Diagnózis</b>	371	100%	140	100%	185	100%	46	100%	0,499
ALL	67	18%	26	19%	35	19%	6	13%	
AML	147	40%	48	34%	80	43%	19	42%	
MDS	28	8%	14	10%	11	6%	3	7%	
CML	20	5%	6	4%	12	6%	2	4%	
MPN	17	5%	9	7%	4	2%	4	9%	
MM	16	4%	8	6%	7	4%	1	2%	
CLL	22	6%	6	4%	14	8%	2	4%	
NHL	39	10%	16	11%	16	9%	7	15%	
HL	15	4%	7	5%	6	3%	2	4%	
<b>Donor</b>	366	100%	139	100%	181	100%	46	100%	0,452
Testvér	197	54%	72	52%	103	57%	22	48%	
Idegen	169	46%	67	48%	78	43%	24	52%	
<b>Kondicionáló kezelés</b>	371	100%	140	100%	185	100%	46	100%	0,392
MAC	241	65%	88	63%	126	68%	27	59%	
RIC	130	35%	52	37%	59	32%	19	41%	
<b>GVHD profilaxis</b>	371	100%	140	100%	185	100%	46	100%	0,345
CSA	83	22%	34	24%	38	20%	11	42%	



PRO	71	19%	33	24%	31	17%	7	15%	
RAP	217	59%	73	52%	116	63%	28	61%	

Rövidítések: ALL: akut limfoid leukémia, AML: akut myeloid leukémia, MDS: myelodiszplastikus szindróma, CML: krónikus myeloid leukémia, MPN: myeloproliferatív neoplazma, MM: myeloma multiplex, CLL: krónikus limfoid leukémia, NHL: non-Hodgkin-limfóma, HL: Hodgkin-limfóma, MAC: myeloablatív kondicionáló kezelés, RIC: csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés, CSA: ciklosporin, TAC: takrolimusz, TAC + SIR: takrolimusz és szirolimusz

A recipiens *TGFB1* -1347C>T genotípusa és a HSCT kimeneteli paraméterei (aGvHD, cGvHD, CMV, TA-TMA) valamint a túlélés (NRM, OS) között nem találtunk összefüggést sem a teljes csoportban (10.táblázat), sem az alcsoportokban (23A.ábra). A myeloablatív alcsoportban a recipiens *TGFB1* -1347C>T genotípus nem befolyásolta az NRM-et [24-hónapos NRM CC: 30,8% (21,4-40,7); TC: 25,4% (18,2-33,3); TT: 25,9% (11,2-43,5),  $p=0,856$ ].



23.ábra. Az összesített túlélés a (A) recipiens vagy (B) donor *TGFBI* -1347C>T genotípus szerint a teljes betegcsoportban és a betegek különböző alcsoportjaiban. A hazard ratiót (HR, fekete körökkel jelölve) 95%-os konfidencia intervallummal (vízszintes vonalak) multivariancia analízissel (Cox-modell) számoltuk az OS és a *TGFBI* genotípusra különböző alcsoportokban. A multivariancia analízis magába foglalta a recipiens életkorát a HSCT időpontjában, a nemét, a diagnózist, a donor típusát, a kondicionáló kezelést és GvHD profilaxist. A *TGFBI* genotípus és a megfelelő alcsoportok közötti interakciós tesztek p-értékei a megfelelő alcsoport neve alá vannak beillesztve. Az interakció statisztikai tesztje szignifikáns volt a donor *TGFBI* genotípus és a kondicionáló kezelés között (vastag betűs karakterrel jelölve az 1B ábrán).

Rövidítések: CI: konfidencia intervallum; HR: veszélyességi arány; MUD: egyeztetett, nem rokon donor, MAC: myeloablatív kondicionáló kezelés, RIC: csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés, GvHD: Graft-versus-Hoszt Betegség, CSA: ciklosporin, nem CSA: nem ciklosporin (takrolimusz, valamint takrolimusz és szirolimusz alcsoport)

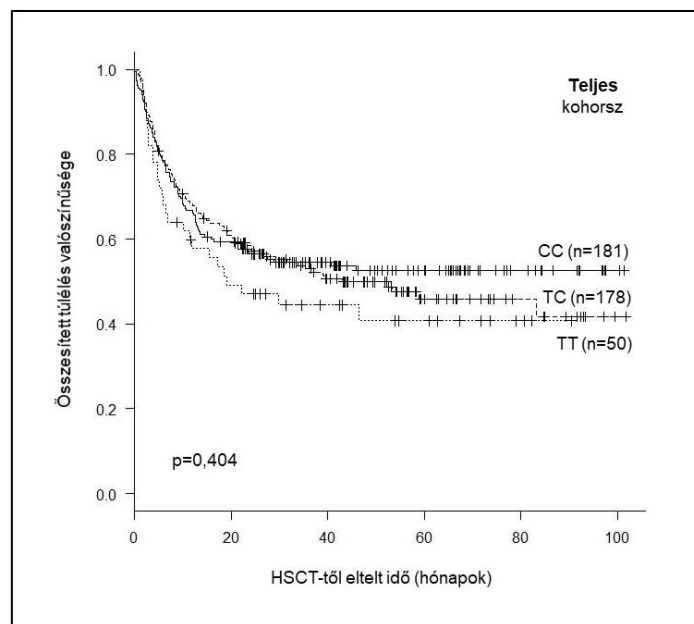
Négyszázkilenc donor esetében tudtuk elvégezni a genotípus vizsgálatot [CC: 181 (44%), TC: 178 (44%), TT: 50 (12%)], amely csoportban a genotípus eloszlás szintén Hardy Weinberg egyensúlyban voltak ( $p=0,543$ ). A donor -1347C>T polimorfizmusa szempontjából a HSCT előtti alapjellemezők, mint a recipiens neme, életkora, diagnózisa (akut leukémia, egyéb), donor típusa (testvér vagy MUD), kondicionáló kezelés intenzitása (MAC vagy RIC), GvHD profilaxis (CSA, TAC, TAC és SIR alapú) nem különbözött (11.táblázat). A donor -1347C>T genotípusa a teljes csoportban a nem befolyásolta a túlélést (60-hónapos OS a donor genotípusok szerint CC:  $52,6\% \pm 3,9\%$ ; TC:  $45,9\% \pm 4,2\%$ ; TT:  $40,7\% \pm 7,5\%$ ;  $p=0,404$ ) (24A.ábra).

11.táblázat: A HSCT-recipiensek alapjellemezői a donor *TGFBI* -1347C>T genotípus szerint.

	Össz	%	Don CC	%	Don CT	%	Don TT	%	p
<b>Nem</b>	409	100%	181	100%	178	100%	50	100%	0,565
Nő	178	44%	84	46%	74	42%	20	40%	
Férfi	231	56%	97	54%	104	58%	30	60%	
<b>Életkor Tx-kor</b>									
Medián			44.1		41.9		35.5		0,054
Min-Max			19,4- 73		18,6- 66,4		21- 66,9		
<b>Diagnózis</b>	409	100%	181	100%	178	100%	50	100%	0,313
ALL	72	18%	31	17%	32	18%	9	18%	
AML	155	38%	66	37%	68	38%	21	42%	
MDS	32	8%	19	10%	10	6%	3	6%	
CML	23	6%	7	4%	15	8%	1	2%	
MPN	19	5%	10	6%	7	4%	2	4%	
MM	25	6%	9	5%	15	8%	1	2%	
CLL	25	6%	9	5%	12	7%	4	8%	
NHL	42	10%	24	13%	13	7%	5	10%	
HL	16	4%	6	3%	6	4%	4	8%	
<b>Donor</b>	404	100%	177	100%	177	100%	50	100%	0,762
Testvér	210	52%	95	54%	91	51%	24	48%	
Idegen	194	48%	82	46%	86	49%	26	52%	
<b>Kondicionáló kezelés</b>	409	100%	181	100%	178	100%	50	100%	0,294
MAC	261	64%	108	60%	120	67%	33	66%	
RIC	148	36%	73	40%	58	33%	17	34%	
<b>GVHD profilaxis</b>	409	100%	181	100%	178	100%	50	100%	0,098
CSA	95	23%	44	24%	44	25%	7	14%	
PRO	76	19%	31	17%	29	16%	16	32%	

RAP	238	58%	106	59%	105	59%	27	54%	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	-----	--

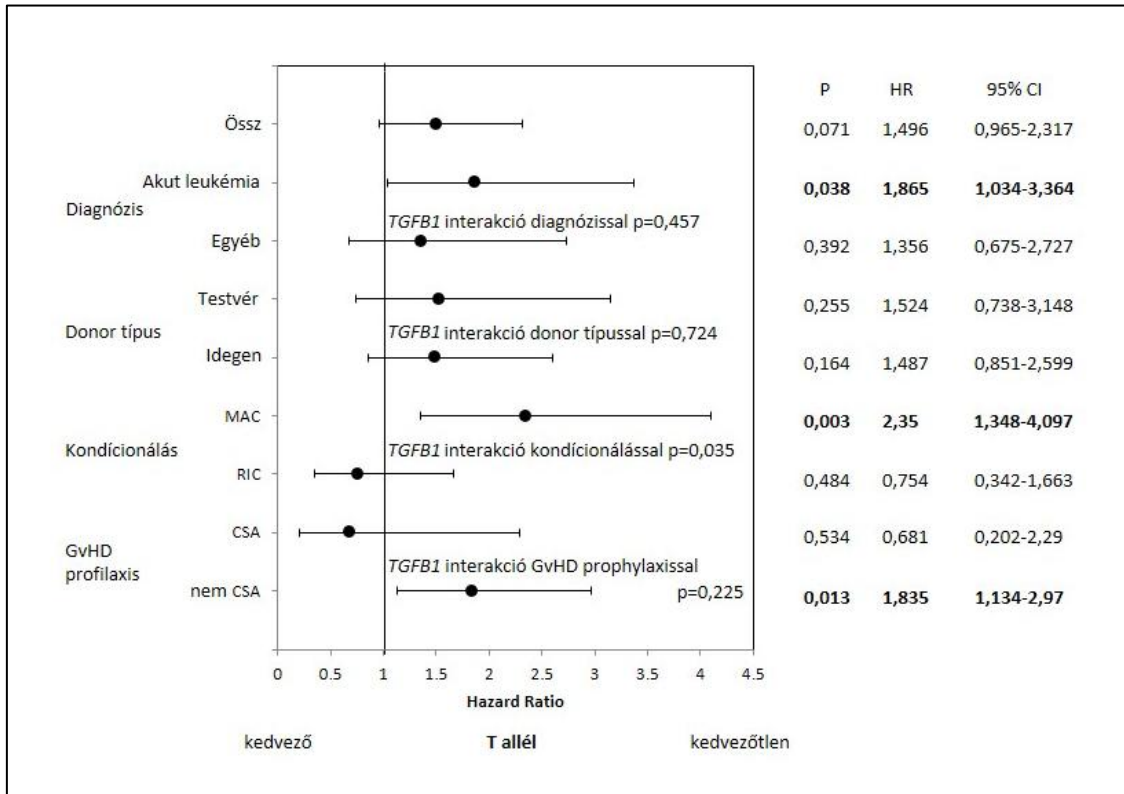
Rövidítések: ALL: akut limfoid leukémia, AML: akut myeloid leukémia, MDS: myelodiszplastikus szindróma, CML: krónikus myeloid leukémia, MPN: myeloproliferatív neoplazma, MM: myeloma multiplex, CLL: krónikus limfoid leukémia, NHL: non-Hodgkin-limfóma, HL: Hodgkin-limfóma, MAC: myeloablatív kondicionáló kezelés, RIC: csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés, CSA: ciklosporin, TAC: takrolimusz, TAC + SIR: takrolimusz és szirolimusz



24.ábra. A donorok *TGFBI* -1347C>T genotípusai alapján az összesített túlélés Kaplan-Meier valószínűsége (A) a teljes HSCT kohorszban; (B) a myeloablatív kondicionálással (MAC) kezelt alcsoportban; (C) csökkentett intenzitású kondicionálással (RIC) kezelt alcsoportban.

A donor *TGFBI* genotípussal való kölcsönhatás szempontjából a diagnózist, a donortípust, a kondicionáló kezelés intenzitását és a GvHD profilaxist teszteltük. Megfigyeltük, hogy multivariancia analízis során a donor genotípusa befolyásolta ugyan az OS-t az akut leukémiában szenvedő betegek alcsoportjában, a MAC kondicionálóval vagy takrolimusz alapú GvHD profilaxissal kezelt alcsoportjában, de az interakció

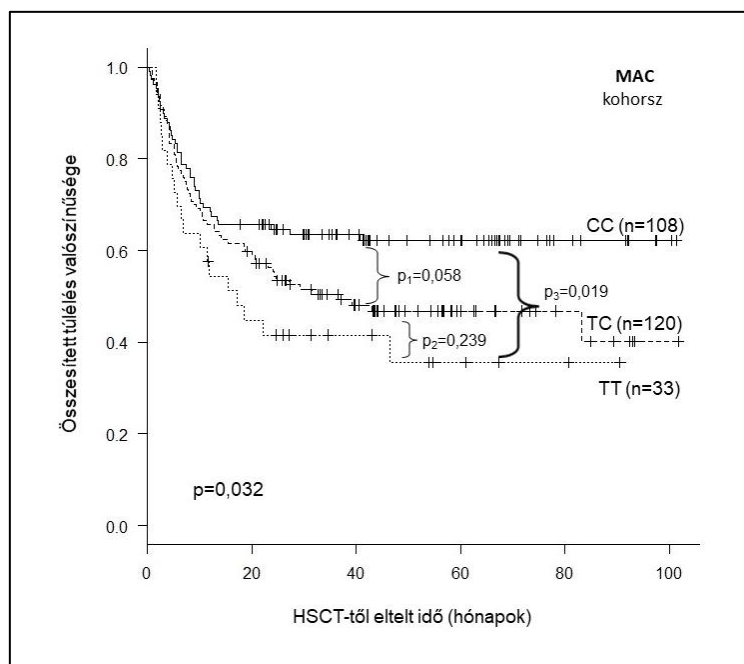
tesztje csak a myeloablatív és a csökkentett intenzitású kondicionáló kezelésben részesültek alcsoportjában tért el ( $p=0,035$ , 23B.ábra).

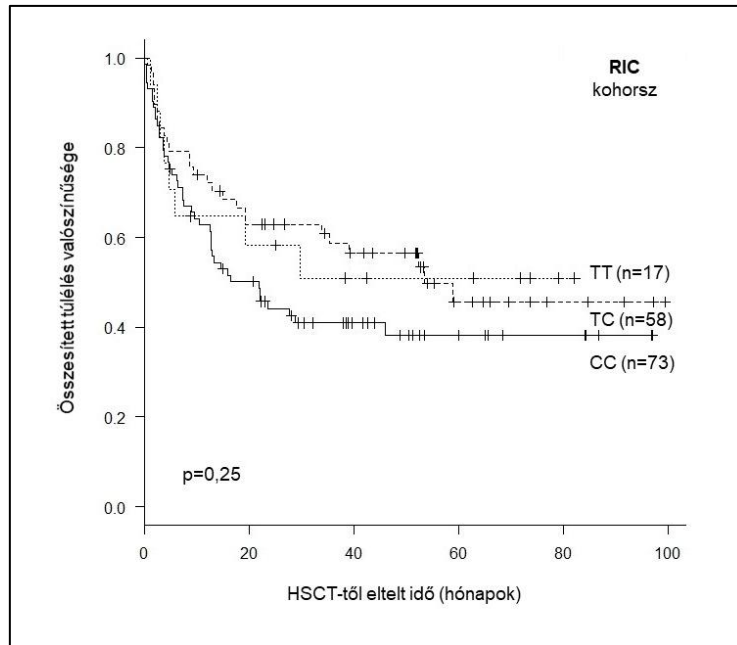


23.Ábra. Az összesített túlélés a (A) recipiens vagy (B) donor *TGFBI* -1347C>T genotípus szerint a teljes betegcsoportban és a betegek különböző alcsoportjaiban. A hazard ratiót (HR, fekete körökkel jelölve) 95%-os konfidencia intervallummal (vízszintes vonalak) multivariancia analízissel (Cox-modell) számoltuk az OS és a *TGFBI* genotípusra különböző alcsoportokban. A multivariancia analízis magába foglalta a recipiens életkorát a HSCT időpontjában, a nemét, a diagnózist, a donor típusát, a kondicionáló kezelést és GvHD profilaxist. A *TGFBI* genotípus és a megfelelő alcsoportok közötti interakciós tesztek p-értékei a megfelelő alcsoport neve alá vannak beillesztve. Az interakció statisztikai tesztje szignifikáns volt a donor *TGFBI* genotípus és a kondicionáló kezelés között (vastag betűs karakterrel jelölve az 1B ábrán).

Rövidítések: CI: konfidencia intervallum; HR: veszélyességi arány; MUD: egyeztetett, nem rokon donor, MAC: myeloablatív kondicionáló kezelés, RIC: csökkentett intenzitású kondicionáló kezelés, GvHD: Graft-versus-Hoszt Betegség, CSA: ciklosporin, nem CSA: nem ciklosporin (takrolimusz, valamint takrolimusz és szirolimusz alcsoport)

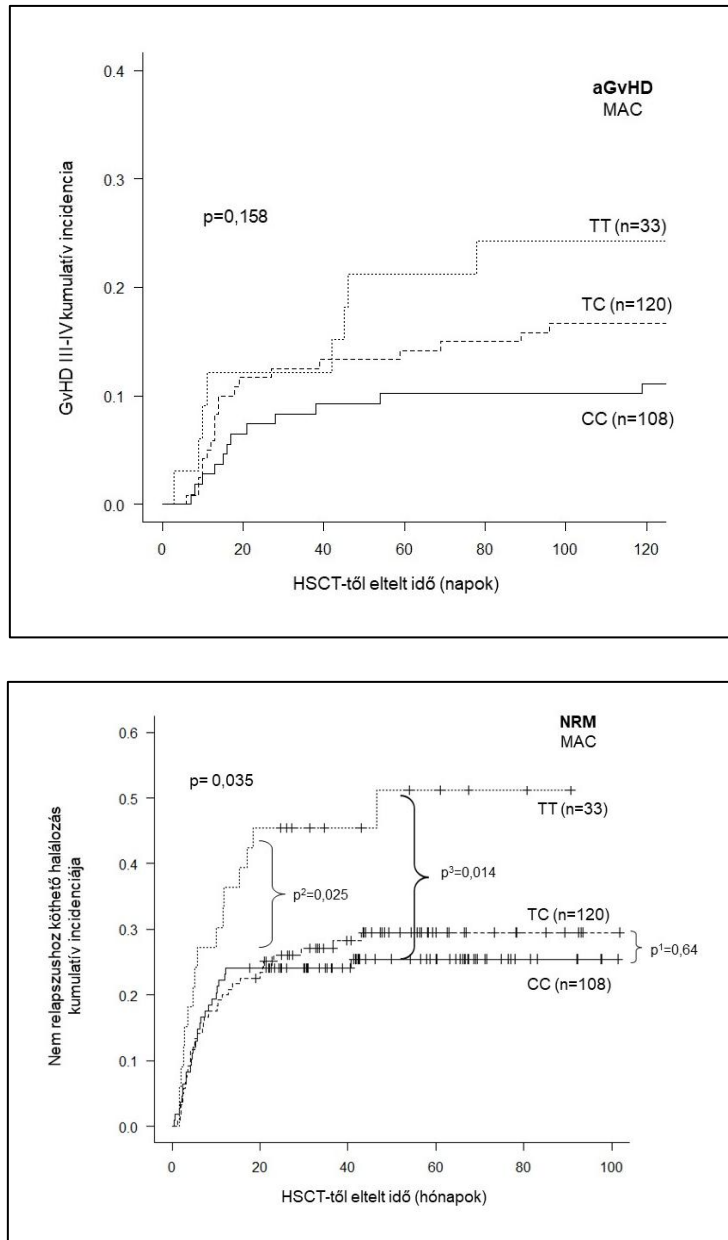
A MAC alcsoportban (n=261) a -1347TT genotípusú donorral transzplantált betegek kimenetele kedvezőtlenebbül alakult (60-hónapos OS a donor genotípusok szerint; CC: 62,1% ± 4,8%, TC: 46,8% ± 4,8% és TT: 35,6% ± 9,3%,  $p = 0,032$ ; amely független volt az életkortól, a donortípustól és a GvHD profilaxistól,  $p = 0,003$ , HR: 2,35, 95% CI: 1,348-4,097, 23B. és 24B.Ábra). A RIC alcsoportban az OS-t nem befolyásolta a donor *TGFBI* -1347C>T genotípusa (60-hónapos túlélés CC: 38,2% ± 6,1%, TC: 45,7% ± 7,9% és TT: 51% ± 12,6%,  $p = 0,25$ , 24C.Ábra).





24.ábra. A donorok *TGFBI* -1347C>T genotípusai alapján az összesített túlélés Kaplan-Meier valószínűsége (A) a teljes HSCT kohorszban; (B) a myeloablatív kondicionálással (MAC) kezelt alcsoportban; (C) csökkentett intenzitású kondicionálással (RIC) kezelt alcsoportban.

Myeloablatív kondicionáló kezelés esetén a relapszus aránya (CC: 18% vs CT 28% vs TT 18%) nem különbözött a donor *TGFBI* genotípusa szerinti alcsoportokban. Az aGvHD III-IV fokozat gyakorisága növekvő tendenciát mutatott a donor -1347T allél heterozigótaságával és homozigótaságával párhuzamosan (CC: 11%, CT: 17%, TT: 24%,  $p=0,057$ , az aGvHD kumulatív incidenciáját a 25.ábra mutatja). A TA-TMA, a CMV fertőzés/reaktiváció és a cGvHD nem különbözött a donor genotípus szerint. Az NRM azonban összefüggést mutatott a donor *TGFBI* genotípussal [24-hónapos NRM a donor genotípusai szerint; CC: 24,1% (16,5-32,5%), CT: 26,1% (18,5-34,2%) és TT: 45,5% (27,8-61,6%),  $p=0,035$ , 25B.ábra]. A gombás fertőzések gyakrabban fordultak elő halálként, ha a donor *TGFBI* -1347C>T hordozó volt (CC: 9,7% vs CT: 38,1% vs TT: 33,3%,  $p=0,022$ ), ami hozzájárulhatott a megnövekedett halálozáshoz.



25.ábra. Az (A) akut graft-versus-hoszt betegség (aGvHD) III-IV fokozatú és (B) nem relapszushoz köthető halálozás (NRM) kumulatív incidenciája a donor *TGFBI* -1347C>T genotípusok szerint.

NRM CC / CT: 25,1% (19,7-30,9%) vs TT: 45,5% (27,8-61,6%),  $p=0,011$ .

A MAC alcsoport mellett a *TGFBI* -1347T variáns kedvezőtlen hatásait a nem CSA alapú GvHD profilaxis alcsoportban is megfigyeltük. A GVHD profilaxis nem mutatott interakciót a *TGFBI* polimorfizmussal, feltételezhetően a CSA-alapú alcsoportban lévő alacsony esetszám miatt. Kalcineurin inhibitor mTOR-gátlóval



(TAC&SIR) kombinálva főleg MAC során alkalmaznak GvHD-profilaxisként (84,7%, n=221), míg a calcineurin-inhibitorokat (CSA vagy TAC) metotrexáttal (MTX) és mikofenolát-mofetillel (MMF) RIC esetében (csak 11,5%, n=17 kapott SIR-t,  $p < 0,001$ ). Hogy a donor *TGFBI* variáns hatását a homogéneen kezelt HSCT kohorszban vizsgálni tudjuk külön elemeztük a MAC és TAC&SIR GvHD profilaxis alcsoportokat. A donor *TGFBI* -1347T variáns kedvezőtlen hatása a domináns modellben mutatkozott meg (60-hónapos OS: CC:  $63,2\% \pm 5,1\%$  vs CT/TT:  $44,8\% \pm 4,8\%$ ,  $p=0,036$ ). Ennek háttérben gombás fertőzéseket észleltünk (CC: 8% vs CT / TT: 31,1%,  $p=0,037$ ), anélkül, hogy az aGvHD, cGvHD vagy TA-TMA előfordulása megváltozott volna.

## 6. Megbeszélés

A myeloid klón(ok)ban a szomatikus mutációk jelenlétét az AML többlépcsős patogenezisének írták le. A pre-leukémiás mutációk pl. *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* az AML korai folyamatában vannak jelen (MDS-ben, MPN-ben megfigyelhetőek). Ezen mutációk idős, egészséges betegekben is megtalálhatóak, MRD követési markerként nem használhatóak, mert remisszióban is megmaradnak, nem korrelálnak a betegség stádiumaival. [90] Önmagukban nem elegendőek az AML kialakulásához. A leukémia alapító mutációk pl. *PML-RARA*, *AML-ETO*, *CBFB-MYH11*, *NPM1* az AML alapító klónban vannak jelen. Ezek a WHO szerint külön entitást képző, nagy stabilitással rendelkező mutációk, melyek MRD követési markerként nagy érzékenységgel kvantitatív vizsgálatokban használhatóak. [2, 90] Az alapító mutációk jól korrelálnak az AML folyamatával (diagnóziskor jelen vannak, remisszióban eltűnnek, relapszuskor ismét jelen vannak). A pre-leukémiás és leukémia alapító mutációk még együttesen sem elegendőek az AML kialakulásához. Az AML kialakulásához egy domináns klónban jelen lévő mutációra is szükség van. A domináns mutációk önmagukban szintén nem alkalmasak MRD követési markerként, mert gyakori a markervesztés és relapszusban az újonnan való megjelenés. [90]

### **6.1 Citogenetikai és molekuláris genetikai markerek gyakorisága, társulásai és stabilitása relapszuskor**

Az általunk vizsgált AML betegcsoportban az irodalmi adatokhoz hasonló gyakorisággal jelentek meg *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, *NPM1*, valamint *IDH1* és *IDH2* mutációk. [12, 15, 17, 55, 173] Az *NPM1* mutáció gyakran társult *FLT3-ITD* valamint *IDH1* és *IDH2* R140Q mutációkkal, de *IDH2* R172 mutációval kölcsönösen kizárják egymást, akárcsak az irodalmi adatok alapján. [55, 133, 174, 175]

Eredményeinkből megfigyeltük, hogy az AML betegek esetében a citogenetikai eltérések relapszuskor az esetek 68%-ában megegyeztek a diagnóziskor megfigyelttel, és 32%-ban (n=33) történt citogenetikai változás relapszus idején. A 33 beteg több, mint felében, 21 esetben progresszió, klonális evolúció alakult ki. Az általunk vizsgált molekuláris genetikai markerek 91-97% stabilitással rendelkeztek, mely megegyezik az irodalomban lévő adatokkal. Relapszuskor újonnan megjelenő leggyakoribb mutáció az

*FLT3*-ITD volt 11 betegnél, TKD 1 esetben, emellett 1 *IDH1*-R132H és 2 betegnél *IDH2*-R140Q alakult ki.

Vizsgálatunkban a hosszú megfigyelési időszak lehetővé tette a késői AML relapszusok észlelését. A korábbi vizsgálatokkal összehangban az *NPM1* mutáció pozitív eseteink kevesebb mint 10%-a relabált *NPM1* mutáció negatívként. Betegcsoportunkban az *NPM1* mutáció negatívvá vált esetekben nem volt hosszabb a remissziótól relapszusig eltelt idő, amire számos korábbi tanulmány is utal. [37, 38] Tanulmányunkban a pre-leukémiás mutációk spektrumát nem vizsgáltuk, mégis egyetlen *NPM1* mutáció negatív relapszusban megfigyeltük az *IDH2* R140Q mutáció perzisztálását 13 hónappal a diagnózist követően. Mindezek alapján, *NPM1* ideális marker MRD követésre.

Az *IDH1/2* mutációk (különösen az *IDH2* R140Q) remisszióban való jelenlétét az irodalomban az AML esetek 7-39%-ában figyelték meg, [62-65] ami összehangban áll eredményeinkkel (remisszióban az *IDH1/2* mutációk 24%-a volt kimutatható 2,5%-nál magasabb VAF értékkel). Remisszióban a magas mutáció szint közvetlen bizonyítéka a szomatikus mutáció pre-leukémiás eredetének.

Tanulmányunkban az *IDH1/2* mutáció negatív AML betegek esetében az *IDH1/2* mutációk megjelenését a relapszus során 10%-ban figyeltük meg, ami ezen mutációk szubklonális, késői eredetére utal. Az AML patogenezisében van egy szokásos mutációs sorrendje, mégis egyes mutációk korai és késői eseményekben egyaránt megjelenhetnek. [37, 176]

## ***6.2 Citogenetikai és molekuláris genetikai markerek prognosztikai szerepe***

Harada és munkatársai a (JALSG) AML201 több centrumban zajló, randomizált, fázis 3 de novo AML-ben (akut promyelocitás leukémia kivételével) szenvedő betegeket vizsgáló tanulmányukban az ELN 2017-es rizikó besorolásának hasznosságát vizsgálták az ELN 2010-es besoroláshoz képest. Eredményeik megerősítették azt, hogy a 2017-es ELN hármass besorolások szerinti kimenetek a saját kohorszukban is hasonló eredményt mutatták, a CR-t szignifikánsan több beteg ért el a kedvező rizikójú csoportban (94,4%), mint az intermedier (65,1%) és a kedvezőtlen kategóriában (67,4%), az 5 éves túlélés is hosszabb volt a kedvező alcsoportban (59,1%), az intermedier (32,6%) és a kedvezőtlen (22,6%) alcsoportokhoz képest ( $p < 0,0001$ ). [177]

Egy tanulmányban az ELN2017 rizikó besorolást vizsgálták HSCT-n átesett 234 AML-es beteg esetében. HSCT-t követő 2 évvel a relapszus kumulatív incidenciája a kedvező csoportban volt a legalacsonyabb (12,8%), szemben az intermedier (30,7%) és a kedvezőtlen (54%) csoportokkal. Ezzel egyidejűleg a kedvező kategóriába tartozó betegek hosszabb OS-sel rendelkeztek (69,9%), az intermedier (52,9%), és a kedvezőtlen (47%) kategóriákhoz képest. [178]

Boddu és munkatársai a 2017-es ELN rizikó besorolást vizsgálták meg *NPM1* és *FLT3-ITD* pozitív újonnan diagnosztizált 18-60 év közötti AML betegen összehasonlítva a 2010-es ELN besorolással. Eredményeik azt mutatták, hogy prognózis szempontjából a 2017-es beosztás jobban elkülöníti a betegeket, az 5 éves OS a kedvező csoportban 57%, az intermedierben 37%, míg a kedvezőtlenben 18%. [179]

Harada és munkatársai felvetették, hogy vannak olyan citogenetikai abnormalitások, amelyek a kedvező csoportba tartozó *NPM1* és *CEBPA* mutációk prognózisát is befolyásolják, illetve, hogy az *FLT3-ITD*<sup>low</sup> nem feltétlen társul jobb prognózissal, mivel tanulmányukban prognosztikai különbséget nem találtak az *FLT3-ITD*<sup>low</sup> és *FLT3-ITD*<sup>high</sup> betegek között, [177] akárcsak Grimm és munkatársai, illetve Boddu és munkatársai. Előbbi tanulmányukban az *FLT3-ITD*<sup>low</sup> és *FLT3-ITD*<sup>high</sup> viszonyát is vizsgálták, azonban az alacsony esetszám miatt (n=33) szignifikáns különbséget nem tapasztaltak. [178] Boddu és munkatársai az *FLT3-ITD* allél arányát tekintve (low/high) a túlélésben szignifikáns különbséget nem találtak az *NPM1* mutáció pozitív, p=0,28, illetve negatív betegek tekintetében, p=0,35. [179]

Sakaguchi és munkatársai szerint *NPM1* és *FLT3-ITD*<sup>low</sup> mutációval rendelkező betegek esetében az első CR-ban történő allo-HSCT javítja a kimenetelt. [180] Több tanulmány szerint (ahol a 60 vagy 60 évnél fiatalabb betegeket vontak be, vagy intermedier citogenetikával rendelkezőket vizsgáltak) *NPM1* és *FLT3-ITD*<sup>low</sup> mutáció pozitív betegek 5 éves túlélése közepes, 35-47%, [133, 181-183] míg egy irodalom alapján a 3 éves túlélés kedvező kimenetellel, kb. 60% társul ezen mutációkkal rendelkező, de allo-HSCT-n átesett betegeket nem tartalmazó csoport esetében. [184]

Az ELN2017 besorolás szerint attól függően, hogy az *NPM1* mutáció pozitív betegek *FLT3-ITD*<sup>low</sup> vagy *FLT3-ITD*<sup>high</sup> mutációval társulnak kedvező vagy utóbbi esetben intermedier rizikó csoportba kerülnek. Yan Huang és munkatársai szerint az első CR-ban történő transzplantáció esetén hosszabb túlélés érhető el, azonban

tanulmányukban nem vizsgálták az *FLT3*-ITD allél arányokat (low vagy high). Tanulmányukban 76 normál kariotípussal rendelkező *NPM1* és *FLT3*-ITD pozitív AML (akut promyelocitás leukémia kivételével) beteget vizsgáltak. A transzplantáción átesett betegek kedvezőbb OS-sel ( $p=0,002$ ) és DFS-sel ( $p=0,001$ ) rendelkeztek, mint a csak kemoterápiában részesülő betegek. Ezen a kedvező hatáson a társuló mutációk, mint a *DNMT3A* R882, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *TET2* nem változtattak. Az *FLT3*-ITD, *NPM1* és *DNMT3A* mutációval is rendelkező betegek rosszabb OS-sel ( $p=0,007$ ) és DFS-sel ( $p=0,002$ ) rendelkeztek, mint a csak *FLT3*-ITD – *NPM1* pozitív és *DNMT3A* negatív betegek esetében. [185]

A HSCT előtti *NPM1* MRD pozitivitás 2 éves követése kedvezőtlen relapszus kumulatív incidenciával (53,8%) és OS-sel (30,8%) társul a HSCT előtti *NPM1* negatív betegekhez képest (relapszus kumulatív incidencia: 36,8%, OS: 72,8%), [178] amit már számos tanulmány megerősített. [87, 186] Olyan tanulmányok is vannak, amelyek szerint az *NPM1* és *FLT3*-ITD<sup>low</sup> mutációval rendelkező betegek esetében az allo-HSCT javítja a prognózist. [180, 187, 188]

Eisfeld és munkatársai 863 60 évnél fiatalabb de novo AML-ben (akut promyelocitás leukémia kivételével) szenvedő betegen vizsgálta a 2017-es ELN prognosztikai besorolást. Legnagyobb megfigyelésük az volt, hogy az *FLT3*-ITD<sup>high</sup> mutáció az *NPM1* mutáció státuszától függetlenül inkább kedvezőtlen kimenetellel társul, mintsem az intermedier kategóriákba tartozókkal. Eredményeikből azt is kiemelték, hogy a *DNMT3A* mutáció is kedvezőtlen túléléssel társul. Összességében eredményeik alapján változtatnának az ELN 2017-es besoroláson, a kedvező rizikójú betegek 4%-át és a kedvezőtlen rizikóval rendelkező betegek 9%-át intermedier kategóriába tennék, míg a kedvező csoportba tartozó betegek 9%-át és az intermedier csoportba tartozók több, mint felét, 53%-át a kedvezőtlen kategóriákba sorolnák át a hasonlóan kedvezőtlen túlélések miatt. [88]

Paola Minetto és munkatársai szerint az *NPM1* mutáció kedvező kimenetelét nem befolyásolja az *FLT3*-ITD mutáció hiánya vagy megléte, függetlenül az allél aránytól. Elemzéseik szerint az első CB-ban történő allo-HSCT az ELN2017-es besorolás alapján a kedvezőtlen rizikó csoportban tartozó betegek esetében társul kedvezőbb kimenetellel. Adataik alapján a fludarabin, nagy dózisos citarabin és idarubicin (FLAI) indukció

hatására megkérdőjeleződik az allo-HSCT szerepe első CR-ben *NPM1* és *FLT3-ITD* mutációk egyidejű jelenléte esetén. [189]

Ok és munkatársai az *IDH1* és *IDH2* mutációk perzisztálását vizsgálták 80 AML-es betegen. A perzisztáló *IDH1/2* mutációval rendelkező betegek (n=31) magasabb relapszus rizikóval rendelkeztek, mint a nem perzisztáló betegek 1 éves követés során. A perzisztáló mutációk főként *IDH2* R140Q és *IDH1* R132 formák voltak, illetve *IDH2* R172K. [64]

Eisfeld tanulmánya szerint, azok az ELN2017-es besorolás szerint kedvezőtlen rizikójú csoportba kerülő betegek, aki *IDH2* mutációval is rendelkeztek az intermedier csoportban tartozókhöz hasonló kimenetellel rendelkeztek, CR, OS és DFS tekintetében. Az *IDH2* mutáció pozitív kedvezőtlen kategóriába tartozó betegek hosszabb OS-sel rendelkeztek. Az *IDH2* mutáció hosszabb OS-sel való társulását korábban egy másik tanulmányban is leírták, egy teljes AML csoporton, illetve intermedier rizikójú csoporton is. [29]

Loghavi és munkatársai szerint a de novo AML-ek kb. 20%-ban együttesen van jelen az *FLT3-ITD*, *NPM1* és *DNMT3A* mutáció. [190] Irodalmi adatok alapján a *DNMT3A* kedvezőtlen kimenetellel társul. [6, 190-193] Számos *DNMT3A* mutáció szerepet játszik az AML-ben, a leggyakoribb, az R882 forma, mely a *DNMT3A* mutációk 70-80%-át teszi ki és rossz prognosztikai faktornak tekintik AML-ben. [194]

A *DNMT3A* mutációval is rendelkező betegek esetében a relapszus kumulatív incidenciája szignifikánsan magasabb (p=0,009), mint a *DNMT3A* mutációval nem rendelkező betegekkal szemben. Tanulmányukban a hiperleukocitózis hatását is vizsgálták, mi szerint azok a betegek, akik hiperleukocitózissal rendelkeztek rosszabb OS-sel (p=0,008) és DFS-sel (p=0,009) bírtak, mint azok, akiknek nem volt hiperleukocitózisuk. A transzplantáció okozta kedvező hatást a hiperleukocitózis nem befolyásolja. [185]

Wang és munkatársai összefoglalójukban 16 tanulmány metaanalízisét végezték el, mely szerint a *TET2* kedvezőtlen OS-sel és EFS-sel társult AML betegek esetében. [195]

Az MDS-ben gyakran mutálódott gének, mint pl. *ASXL1*, *SRSF2*, *STAG2*, *EZH2*, *SF3B1*, melyek a szekunder AML-ben is szerepet játszanak rövidebb eseménymentes túléléssel társulnak. Gardin és munkatársai tanulmányukban 509 idős ( $\geq 60$  év) beteget

vizsgálva megfigyelték, hogy az MDS-re jellemző mutációk az ELN besorolás szerint kedvező és kedvezőtlen besorolásba tartozók esetében a kimenetelt nem befolyásolták, hatásuk az ELN besorolás szerinti intermedier csoportban tartozó betegek esetében volt. A betegeket két csoportra osztva magas rizikójúnak tekintették azokat, akik intermedier besorolásba tartoztak, akik MDS-re jellemző mutációkat hordoztak, illetve akik az ELN besorolás szerint kedvezőtlen kategóriába kerültek. Standard rizikójú csoportba kerültek azok a betegek, akik ELN besorolás szerint egyéb intermedier vagy kedvező kategóriába kerültek be. Eredményeikből az látszik, hogy a magas kockázatú csoportban az első CR-ben történő transzplantáció segítségével hosszabb OS-t értek el, mint az olyan idős AML-ben szenvedő betegeknél, akik a standard kockázatú csoportban voltak. [196]Az MDS-ben szerepet játszó mutációk rutinban való vizsgálatával lehetőség nyílik az idős, szekunder AML-ben szenvedő betegek túlélésének javítására.

Különbséget figyeltek meg a TP53 mutációval rendelkező és a TP53 mutációval nem rendelkező kedvezőtlen besorolásba tartozó betegek között. A relapszus kumulatív incidenciája jóval magasabb volt a TP53 mutációval rendelkező (81,8%) és nem rendelkező (50%,  $p=0,02$ ) betegek tekintetében, és a OS több mint felére csökkent a TP53 mutált (16,7%), mint a nem mutált (48,4%,  $p=0,017$ ) esetekben. *RUNX1* és *ASXL1* mutációval rendelkező és a mutációval nem rendelkező, de kedvezőtlen csoportba tartozó betegek esetében a TP53 mutáltakhoz képest hasonlóan markáns eredmény nem volt látható. [178]

### **6.3 Mérhető reziduális betegség**

Egy a közelmúltban megjelent metaanalízis igazolja, hogy az alacsonyabb MRD összefüggésben áll a kedvezőbb kimenetellel, függetlenül az alkalmazott módszertől, a minta típusától vagy a mintavétel idejétől. [197] A kvantitatív PCR-t, a digitális PCR-t és az új generációs szekvenálást (NGS), mint molekuláris genetikai módszereket széles körben alkalmazzák MRD kimutatásra. A ddPCR-t nagy pontossága és reprodukálhatósága teszi különösen alkalmassá MRD monitorozásra, amit számos onkohematológiai driver alapján írtak le. [198-202] Az egyedi módszerek több *NPM1* mutáció számszerűsítését teszik lehetővé, de a degenerált primerek alkalmazása lehetővé teszi az azonos lokalizációt érintő több *NPM1* mutáció egyidejű detektálását (c.860\_863dupNNNN). [165] Adataink és más tanulmányaink is alátámasztották, hogy

az *NPM1* mutációk kevesebb, mint 5%-a érinti a nukleotidokat ettől eltérő pozíciókban. [28, 44, 161]

Érdekes, hogy míg az *NPM1* MRD fontosságával kapcsolatban teljes egyetértés figyelhető meg, az alacsony és a magas kockázatú MRD közötti különbségtételt illetően a heterogenitás széles tartománya mutatkozott meg. Számos tanulmány az *NPM1* transzkript szinteket csontvelőben és perifériás vérben egyaránt vizsgálta, erős korrelációt tapasztaltak, de a csontvelőben átlagosan 1-log magasabb érzékenységet figyeltek meg. [28, 40, 44, 172, 203-206] Ezzel összhangban az *NPM1<sup>mut</sup>/ABL1* transzkriptumszint 3 nagyságrend csökkenését kedvező prognosztikai mutatóként mutatták ki a csontvelőben, [172, 204, 205] de 4-log csökkenésre volt szükség perifériás vérben az indukciós terápiát követően. [28, 203] Vizsgálatunk során csontvelő mintákat dolgoztunk fel. Mivel az *NPM1<sup>mut</sup>* expressziója magas, jobb érzékenységet (medián: 1,3 log, tartomány: 0-2,78 log a vizsgálatunkban) értünk el RNS szinten, mint DNS-en. *NPM1* MRD monitorozásához az *NPM1<sup>mut</sup>* RNS expressziós szint detektálása ajánlott az irodalomban. [44, 164] Shayegi és mtsai. azt találták, hogy 1% *NPM1<sup>mut</sup>/ABL1* expresszió 0,016% *NPM1<sup>mut</sup>* VAF-nak vagy 1/32000 sejtnek (1,8 log különbség az RNS és a DNS szintje között) felel meg. [205] Ezek az adatok arra utalnak, hogy az *NPM1<sup>mut</sup>* MRD követést RNS módszer segítségével kell elvégezni, de ha RNS nem érhető el, akkor magas érzékenységű DNS módszerek helyettesíthetők. Vizsgálatunkban alkalmazott MRD negatív határ (*NPM1*-A típus: 0,01% és N-típus: 0,05% DNS-szinten) hozzávetőlegesen 1% *NPM1<sup>mut</sup>/ABL1* expressziós szintnek felel meg. Nem tudtunk nagyszámú RNS mintát vizsgálni, ami retrospektív vizsgálatunk fő korlátja. Ivey és mtsai. [28] kimutatták, hogy ha indukció után perifériás vérben az RNS MRD szintje kevesebb, mint 4log-ot csökken, az magasabb relapszus kumulatív incidenciával társul (MRC17-vizsgálat 3 éves CIR: 82% versus 30%), hasonlóan Balsat és mtsai. [203] (ALFA-0702 vizsgálat: 2 éves CIR: 55% versus 21%); Hubmann és mtsai. [207] kevesebb, mint 3log RNS MRD csökkenés csontvelőben (AMLCG 1999, 2004 és 2008 vizsgálat: 2 éves CIR 77,8% versus 26,4%.); Kapp-Schwoerer és mtsai. [40] kevesebb, mint 3-log<sub>10</sub> RNS MRD csontvelőben vagy perifériás vérben (AMLSG 09-09 vizsgálat 4 éves CIR csontvelőben 60% versus 28,5% perifériás vérben 62,5% szemben 33,9%). Saját adataink szerint DNS MRD pozitívítás (kevesebb, mint 3 nagyságrend csökkenés) kedvezőtlen kimenetellel társult, és az indukciós terápiát követő DNS-MRD alkalmas a magas kockázatú *NPM1<sup>mut</sup>* betegek azonosítására.



*NPM1* mutáns AML-ben *FLT3*-ITD-vel való együttes előfordulást kedvezőtlen tényezőként ismerték el, az ITD-vel rendelkező leukémiás klón erősen proliferatív jellege miatt. [44, 208] Ez ELN prognosztikai besorolás szerint az *NPM1* mutáció kedvező vagy intermedier kategóriába tartozik, az *FLT3*-ITD jelenlététől függően. [87] Nemrég az ELN prognosztikai kritériumait újra átsorolták és a magas *FLT3*-ITD szintet kedvezőtlen rizikónak határozták meg, függetlenül az *NPM1* mutáció státuszától. [88] Kedvező besorolású AML-ben az első teljes remisszióban nem ajánlott az allogén HSCT, azonban a relabáló *NPM1* pozitív esetek kedvezőtlen kimenetellel társulnak. [209] Megfigyeltük, hogy az *NPM1* MRD mérése képes volt a magas kockázatú betegek azonosítására még a kedvező kockázatú AML esetén is (*NPM1* pozitív magas ITD szint nélkül). Az *NPM1* MRD negatív (*NPM1*<sup>mut</sup> VAF<0,01-0,05% indukció után) és a magas *FLT3*-ITD szint diagnóziskor hasonlóan kedvezőtlen túlélést mutatott, mint az *NPM1* MRD pozitív betegek.

A molekuláris MRD mérések nemcsak a prognosztikát szolgálják, hanem befolyásolhatják a terápiát is. Perzisztáló MRD esetén a HSCT konszolidáció javította a túlélést a kemoterápiával szemben. [210] Az ELN 2017 alapján kedvező kockázatú *NPM1*<sup>mut</sup> AML alcsoportban a molekuláris kudarc (definiálva: *NPM1*<sup>mut</sup>/*ABL1*> 0,05% konszolidáció után vagy *NPM1*<sup>mut</sup> újbóli megjelenés molekuláris válasz után; ami az *NPM1*<sup>mut</sup> esetek 40%-át érintette) jelzésként szolgált az allogén HSCT-re az első teljes remisszióban. Az MRD irányelvek alapján a korai beavatkozás javította a túlélést (2 éves OS: 85% a HSCT-vel kezelt molekuláris kudarcok esetén és 39% a hematológiai relapszusban szenvedőknél). [211] Idős vagy kuratív kezelésre alkalmatlan betegek esetében az azacitidin képes megelőzni vagy késleltetni az MRD-pozitív AML betegek hematológiai relapszusát. [212]

A HSCT előtti *NPM1*<sup>mut</sup> MRD adataink összhangban vannak más, hasonló időpontban végzett MRD vizsgálatokkal: a HSCT előtti MRD negativitás előrejelzi a kedvező kimenetelt HSCT után. [172, 186, 210, 213, 214] A HSCT előtti MRD pozitivitás hatására terápiás döntéseket vezettek be a kondicionáló kezelés és a graft-versus-hoszt betegség megelőzése során, pl. előnyösebb a T-sejt depletált szemben a T-sejt depletált transzplantációval [172]; előnyösebb myeloablatív szemben a csökkentett intenzitású kondicionáló kezeléssel. [215] Az MRD mérések akár irányíthatják a célzott FLT3-gátló terápiát, azonosítva azokat a betegeket, akiknek többnyire előnyük van. [216]

Az MRD monitorozás szerepe *NPM1* esetében jól dokumentált, de az *IDH1* és *IDH2* mutációkról kevés adat áll rendelkezésre. *IDH1/2* MRD követéséhez BioRad által tervezett mutációdetektáló reagenseket alkalmaztunk a BioRad QX200 Droplet Digital PCR rendszeren, de érdekes módon nem tudtunk olyan magas érzékenységet elérni, mint az *NPM1* esetében. Hasonló kimutathatósági határértéket (LoD: 0,2%) figyeltek meg egy korábbi tanulmányban, mely ugyanezt a detektálási módszert alkalmazta. [63] Adataink alátámasztották az *IDH1/2* mutációk pre-leukémiás jellegét. Irodalmi adatok alapján a mutációk perzisztálása (VAF>2,5%) teljes remisszióban kedvezőtlen kimenetellel, nagyobb relapszus rizikóval vagy myelodiszplázia kialakulásával társul. [62, 63] A pre-leukémiás klón jelenléte a morfológiai leukémia-mentes remisszióban általában alacsonyabb túléléssel jár, mint azoknál a betegeknél, akiknek nem perzisztál az onkogén mutáció. [78, 217] Ezzel szemben perzisztáló DTA mutációk esetén nem volt magasabb a relapszus gyakorisága és számos tanulmány szerint hosszú remisszióval rendelkeztek magas VAF mellett is. [66-69] A remisszióban perzisztáló *IDH1/2* mutációk gyakorisága 7-39% a VAF cut-off-jától (1-5%) vagy az alkalmazott kemoterápiától függően, [62-64, 67] amely hasonló volt megfigyelésünkhöz (24%). Irodalmi adatokkal [62-64] összhangban eredményeink szerint a remisszióban perzisztáló *IDH1/2* mutációk kedvezőtlen prognosztikai hatással társulnak. Jelenleg nincsenek iránymutatások olyan megelőző terápiára vonatkozóan (például HSCT vagy *IDH1/2* inhibitorok), amelyek csökkentenék a relapszus gyakoriságát vagy javítanák a túlélést a remisszióban perzisztáló *IDH1/2* mutációk esetén. Az újonnan diagnosztizált AML betegek esetében az *IDH1* vagy *IDH2* inhibitorok kombinációja intenzív kemoterápiával javíthatja a mutáció clearance-ét, bár a terápiára vonatkozóan (inhibitorokkal vagy anélkül) összehasonlító adatok nem állnak rendelkezésre. [218]

Összességében, jelentősen nagy számú AML beteget vizsgáltunk szisztematikusan hosszú idő alatt; vizsgálatunk korlátja azonban a retrospektív vizsgálati tervezés és a megfigyelési időszakban alkalmazott heterogén kezelési protokollok. Eredményeink alátámasztják, hogy az *NPM1* MRD még DNS szinten is megbízható prognosztikai tényező. Az *IDH1/2* mutációk a leukémiát megelőző, alapító vagy szubklonális driverek, de az *IDH1/2* MRD ugyanakkor magas kockázatú AML-t jelent. Mivel az MRD egy biológiai folytonosságot jelent, speciális részletes útmutatásokra van

szükség a megelőző terápiák megkezdéséhez szükséges megfelelő küszöbértékek megállapításához.

Az a megfigyelésünk, hogy az *NPM1* VAF morfológiai leukémiamentes állapotban minden esetben 2,5% alá csökkent, szintén azt bizonyította, hogy az *NPM1* mutációk nem fordulnak elő pre-leukémiás állapotban.

*IDH* mutációk előfordulása diagnóziskor, remisszióban és relapszusban arra utal, hogy korai evolúciós esemény a leukemogenezisben. Számos tanulmány vizsgálta, köztük a mi laborunk is az *IDH1* és *IDH2* mutációt diagnóziskor, illetve relapszuskor és nagy stabilitás volt látható.

#### **6.4 *TGFB1* polimorfizmus szerepe HSCT esetén**

A *TGFB1*-et számos sejt, közöttük a transzplantációt követően a recipiens endothél, epitél sejtjei és a donor vérlemezkéi és T sejtjei is szekretálják. [219, 220] Számos *TGFB1* SNP-t vizsgáltak, amelyek összefüggenek az akut vagy krónikus GvHD kialakulásának rizikójával, fertőzésekkel, a transzplantációhoz köthető halálozással és a túléléssel.

Irodalmi adatok szerint a *TGFB1* genetikai variánsok jól definiált haplotípusokba vannak rendezve: -1347T (rs1800469) allél kapcsolódik + 29C-hez (rs1982073, + 29T>C; L10P) és + 74G-hez (rs1800471; + 74G>C; R25P), amely a második leggyakoribb *TGFB1* haplotípust alkotja (p001-nek hívják, gyakorisága: 30%). A -1347T és + 29C variánsok esetén a szérumban *TGFB1* szintje és a szabályozó T-sejteken történő felületi expressziója, általában magasabb. [150, 155] A p003 néven ismert haplotípus [-1347C, + 29T, + 74G] a leggyakoribb a kaukázusiak körében, 54% -os a gyakorisága. [150, 155] Mivel a *TGFB1* -1347T allél és a p001 haplotípus között szoros kapcsolódást mutattak ki (95% -1347TT p001 homozigóta volt), a *TGFB1* haplotípusok helyett csak -1347C>T-t vizsgáltunk, recipiens és a donor *TGFB1* genotípusát határoztuk meg. [150]

A *TGFB1* szerepe az immunszabályozásban és a funkcionális polimorfizmusai ismertek, mégis a *TGFB1* gén polimorfizmusainak szerepe a HSCT kimenetelében nem egyértelmű. (i) Számos tanulmány szól a recipiens *TGFB1* -1347T/+29C/+74G or p001 haplotípus kedvezőtlen hatásáról (csökkenti az aGvHD-t, NRM-et és kedvező az OS tekintetében) HSCT után. Az Anthony Nolan Kutatóintézet (UK) legnagyobb

tanulmányában 522 idegen recipiens-donor pár elemzését végezte el a *TGFBI* promoter haplotipizálásával: a p001 haplotípus és az -1347TT genotípus növelte a nem relapszushoz köthető mortalitást és csökkentette az összesített túlélést függetlenül a beteg életkorától, recipiens/donor HLA-egyeztetésétől, a betegség státuszától vagy CMV-szerostatusz illesztéstől. [150] Érdekes módon a +29CC variáns nem befolyásolta az kimenetelt, ellentétben ugyanazon intézet előző cikkében leírtakkal (hasonló klinikai jellemzőkkel rendelkező 427 recipiens-donor pár). Az előző tanulmányban a + 29CC genotípus növelte a nem relapszushoz köthető mortalitást, és csökkentette az összesített túlélést a megnövekedett fertőzés okozta halál miatt. [221] Egy másik tanulmány szerint a +29CC betegek magasabb NRM-mel rendelkeznek. [151] Kanadai HSCT-n átesett betegek (n=394) esetében a recipiens -1347TT/TC genotípusa megnövekedett aGvHD rizikóval társult, anélkül, hogy az NRM-re vagy az OS-re bármilyen hatást gyakorolt volna. [222, 223] A korábban említett tanulmányhoz hasonlóan a +29C kedvezőtlen hatását egy kisebb kohorszban (n=84) is leírták, ahol a másik allél (+29T) csökkentette az aGvHD kialakulását. [224]

(ii) Ezzel ellentétben vannak olyan tanulmányok, amelyek a recipiens *TGFBI* -1347T/+29C variáns kedvező hatását taglalják. Kínai HSCT-n átesett betegek (n=138), akik -1347T-t hordoztak, számukra védőhatást nyújtott az aGvHD-val szemben, anélkül, hogy bármilyen hatást gyakorolt volna az OS-re vagy a remisszióban bekövetkezett halálozás gyakoriságára. [225] Egy metaanalízis szerint a *TGFBI* -1347T hasonló védőhatást mutatott. [154]

Kevesebb tanulmány foglalkozott a donor *TGFBI* genotípusának/ haplotípusának és a HSCT kimenetelének a kapcsolatával, holott a *TGFBI* fő forrásának a donor T-sejteket és vérlemezkéket tekintik HSCT után. [145] Érdekes, hogy a donor génexpressziós profilja (köztük a *TGFBI* jelátvitelét magában foglaló géneket) hosszú távon fennmaradt, és összefüggésben volt a GvHD HSCT utáni előfordulásával. [226]

(iii) A donorok *TGFBI* -1347T/+29C kedvező hatását a következő vizsgálatokban figyelték meg. Egy argentin testvér donorokat alkalmazó myeloablatív HSCT kohorszban (n=245) a + 29TT donorral rendelkező betegeknél csökkent az összesített túlélés a magasabb relapszus arány miatt. [151] Egy nagy, japán, mismatched HSCT-kohorszban (n=460, csak kutatási kohorsz) a donorok a -1347CC genotípusa kockázati tényezőnek bizonyult az aGvHD szempontjából. [152] Egy kínai (related és

unrelated) myeloablátív kondicionált kohorszban (n = 240) a donor -1347TT genotípusa az aGvHD-val szemben protektívnek bizonyult. [154, 225]

(iv) Ezzel szemben a donorok *TGFBI* -1347T/+29C kedvezőtlen hatását is megemlítik, hasonlóan megállapításunkhoz. Egy kis japán tanulmányban (n=67) a -1347C>T nem társult, de +29TT (kapcsolódva -1347CC-hez) védő hatással rendelkezett aGvHD ellen. [153] Egy kanadai tanulmányban (n=394) a donorok -1347T alléja differenciáltan kapcsolódott a szervspecifikus GvHD-hez (növelte a cutan aGvHD kockázatát, de védett a tüdő cGvHD ellen.) [222]

Az irodalomban kevés tanulmány foglalkozik a *TGFBI* variánsok kedvező hatásával a HSCT kimenetellel (GvHD, OS) valamint a donor genotípus hatásával és ezeket a hatásokat a T-sejt deplíciónak tulajdonítják. A kisebb méretű vizsgálatok nem tudtak összefüggést találni a *TGFBI* polimorfizmusok és a HSCT kimenetele között. [145, 227, 228] A nagy léptékű replikációs és validációs vizsgálatok szintén nem tudták megerősíteni a *TGFBI* polimorfizmus és a HSCT kimenetel közötti összefüggést (The International Histocompatibility Working Group [IHWG] 1058 HSCT pár, [229] DISCOVeRY-BMT genom kiterjedt asszociációs vizsgálat 2888 HSCT recipiensre, [230] vagy egyéb tanulmányok [231, 232]).

Vizsgálatunk eredményei eltérnek a szakirodalomban korábban publikáltaktól, és felhívják a figyelmet arra a tényre, hogy a *TGFBI* immunmoduláló hatása pleiotrop. Vizsgálatunk erőssége: (i) Egy viszonylag nagy számú, jól karakterizált HSCT betegcsoportot elemeztünk. (ii) Szisztematikus alcsoportelemzéseket végeztünk azon alcsoportok azonosítása érdekében, ahol a *TGFBI* genotípus szerepet játszhat a HSCT kimenetelében. Egy centrumból származó HSCT betegcsoportunkban a donor *TGFBI* genotípus befolyásolta az olyan akut leukémiás betegek kimenetelét, akiket myeloablátív kondicionálással és takrolimusz/szirolimusz alapú GvHD profilaxis kezeltek. A populációs különbségek mellett a legtöbb tanulmányban ciklosporin vagy takrolimusz alapú GvHD profilaxist alkalmaztak, míg esetünkben a legtöbb beteget takrolimusszal és szirolimusszal kezelték. [150-152, 222, 225] A rapamicin (mTOR) gátló alapvetően befolyásolja a szabályozó és a konvencionális T-sejt funkciókat. [233]

A tanulmányunknak korlátai is vannak: (i) Bár kohorszunk viszonylag nagyszámú recipiens-donor párból áll, az alapbetegségek heterogenitása és a kezelési módok korlátozzák a betegek számát az egyes alcsoportokban. Nem sikerült felállítanunk egy

független validációs kohortot, mert intézetünk az egyetlen felnőtt allo-HSCT központ volt a vizsgálati időszakban hazánkban. (ii) A *TGFB1* szignalizáció poligén módon szabályozódik, és nem csak a *TGFB1* genetikai variánsoktól függ. [153, 226] A *TGFB1* szintet más gének variánsai (például az *FBNI*) is befolyásolják, amelyeket mi nem vizsgáltunk. [234]

Végezetül elmondható, hogy a *TGFB1* szabályozó régió variáns, -1347C>T, rosszabb kimenetellel társul a myeloablatív kondicionáló kezelést követő HSCT után. Eredményeink felvetik a lehetőségét annak, hogy a *TGFB1* polimorfizmusokat prediktív markerként lehet kezelni a HSCT-ben, azaz a kimenetelt csak specifikus terápiás módok esetén befolyásolják (esetünkben káros hatás myeloablatív kondicionáló kezelésben mTOR gátló kombinációval a GvHD profilaxis érdekében). A *TGFB1* variáns eltérő hatása a különböző transzplantációs helyzetekben a megoldása az irodalomban szereplő ellentmondó eredményeknek. Eredményünk segít azonosítani az emelkedett aGvHD III-IV rizikójú betegeket, és irányt mutat az immunsuppresszív kezelési módok és/vagy a donor kiválasztásában.

## 7. Következtetések

- 1.) Munkám során 916 felnőtt újonnan diagnosztizált AML beteg adatbázisa került kialakításra. A 20 évet átölelő adatbázis tartalmazza a betegek alapvető klinikai adatait, vérkép paramétereit, áramlási citometriai, citogenetikai, valamint molekuláris genetikai eredményeit diagnóziskor, és genetikai adatait relapszuskor.
- 2.) Az *FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* mutációk stabilitása relapszuskor megegyezik az irodalomban szereplőkkel. A leukemogenesis késői szakában kialakuló *FLT3* mutációk bizonyultak a leginstabilabb mutációnak, így önmagában MRD markerként nem alkalmazható, csak egy másik markerrel együttesen.
- 3.) Laboratóriumunkban új szűrő és MRD monitorozásra alkalmas DNS (*IDH1/2*, *NPM1*) és RNS (*NPM1*) módszereket vezettünk be, melyek által az AML betegek relapszusa hamarabb jelezhető.
- 4.) 116 kuratíván kezelt, remisszióban lévő felnőtt AML beteg *NPM1* mutáció típusának meghatározása (diagnóziskor) és MRD követése valósult meg, indukciós kezelést követően (DNS és RNS alapú módszerrel amennyiben elérhető volt az RNS minta), illetve HSCT előtt (DNS alapú módszer). MRD markerként önmagában az *NPM1* mutáció alkalmazható, mert nagyfokú stabilitással rendelkezik relapszusban, új mutációként nem jelent meg, illetve remisszióban is lecsökkent a szintje.
- 5.) 62 felnőtt kuratíván kezelt, remisszióban lévő AML beteg *IDH1* és *IDH2* mutációinak vizsgálata (DNS alapú módszerrel) valósult meg. Az *IDH1* és *IDH2* mutációk szintje az *FLT3* és *NPM1* mutációtól eltérően számos esetben nem csökkent remisszióban 2,5% alá, hanem perzisztált. A mutációk relapszusban való eltűnése, új mutációként való megjelenése, illetve remisszióban történő perzisztálása arra enged következtetni, hogy az *IDH1* és *IDH2* mutációk az AML patogenezisének folyamatában bármely szakaszban kialakulhatnak.
- 6.) 409 HSCT-n átesett recipiens és donor pár *TGFBI* -1347C>T genotípusát határoztuk meg. A betegek különböző hematológiai rendellenességekkel bírtak, de jelentős részük AML-ben szenvedett. A donor *TGFBI* -1347TT genotípusa kedvezőtlen kimenetellel társul myeloablatív kondicionáló kezelést követő HSCT esetén. A kedvezőtlen hatást GvHD profilaxisként mTOR gátló alkalmazása esetén figyeltük meg.

## 8. Összefoglalás

Az akut myeloid leukémia (AML) a hematológiai betegségek malignus kórképe. Heterogén genetikai háttér jellemzi, kialakulásához több mutáció együttes jelenlétére van szükség. A szomatikus mutációk meghatározzák az AML beteg rizikó besorolását, ezáltal prognózisát, illetve előre vetítik a kezelési lehetőségeket. A mutációk detektálásához érzékeny és specifikus citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekre van szükség. Az azonosított mutációk célzott terápiás célpontot biztosíthatnak a kemoterápiás kezelés mellett, illetve az adott beteg életkorától és társuló betegségeitől függően allogén hematopoetikus őssejt transzplantáció (HSCT) is felmerülhet, mint kezelési lehetőség. Munkám során célul tűztük ki újonnan diagnosztizált AML betegek diagnóziskori mutációs profiljának a feltérképezését, azok vizsgálatát remisszióban és relapszuskor, mérhető reziduális betegség (MRD) követésére alkalmas markerek azonosítását és alkalmazását droplet digitális PCR (ddPCR) segítségével. Vizsgáltuk továbbá a transzplantált betegek és a donoraik transzformáló növekedési faktor béta 1 (*TGFBI*) polimorfizmusának a hatását a HSCT kimenetelére. Eredményeinkből láttuk, hogy az izocitrát dehidrogenáz 1/2 (*IDH1/2*) mutációk remisszióban esetek jelentős százalékában perzisztáltak, utalva ezzel a mutációk preleukémiás eredetére. Ugyanakkor *IDH1/2* mutációk újonnan történő megjelenése relapszusban arra utaltak, hogy az *IDH1/2* mutációk az AML patogenezisének több lépcsőjén is kialakulhatnak. A nukleofoszmin 1 (*NPM1*) mutáció pozitívitás esetében a betegek túlélése az *fms*-szerű tirozin kináz 3 - internal tandem duplikáció (*FLT3-ITD*) jelenlététől és allél arányától függően változott. Mind a *NPM1*, mind az *IDH1/2* MRD követés az indukciós kezelést követően és a HSCT-t megelőzően értékes független prognosztikai markernak bizonyult. A HSCT kezelés során a donor *TGFBI* -1347C>T genotípusa befolyásolta a túlélést myeloablatív kondicionáló (MAC) kezelésben részesülő betegek esetében. Munkánk során az AML számos prognosztikai faktorát vizsgáltuk, MRD követésre alkalmas markereket követtünk ddPCR módszerrel, melyek lehetőséget nyújthatnak célzott terápiák korai alkalmazására.



## Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant hematological disorder, characterized by heterogeneous genetic background, the co-occurrence of several mutations is required for its development. The somatic mutations determine the risk classification, and thus the prognosis of the AML patient, and predict treatment options. Detection of mutations requires sensitive and specific cytogenetic and molecular genetic methods. The identified mutations may provide targeted treatment options beside chemotherapy and, depending on the age and comorbidities of the patient, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is also a treatment option. In my work, we aimed to screen the mutation profile of newly diagnosed AML patients at diagnosis, remission and relapse, to identify and apply markers suitable for monitoring measurable residual disease (MRD) using droplet digital PCR (ddPCR). We also examined the effect of transforming growth factor beta 1 (*TGFB1*) polymorphism on HSCT outcome in transplant patients and their donors. Our results revealed, that isocitrate dehydrogenase 1/2 (*IDH1/2*) mutations persisted in remission in a relevant number of cases, suggesting preleukemic origin of the mutations. However, the novel appearance of *IDH1/2* mutations at relapse suggested, that *IDH1/2* mutations may develop at several stages in the pathogenesis of AML. In case of nucleophosmin 1 (*NPM1*) mutation positivity patient survival was influenced by the presence and allelic ratio of *fms*-like tyrosine kinase 3 - internal tandem duplication (*FLT3-ITD*). Both *NPM1* and *IDH1/2* MRD monitoring after induction treatment and before HSCT proved to be a valuable independent prognostic marker. In HSCT treatment, donor *TGFB1* -1347C>T genotype influenced survival in patients with myeloablative conditioning (MAC). In my work we analysed several prognostic factors, we monitored MRD markers by ddPCR, which might allow for early intervention using targeted therapies.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Rajnai H, Király AP. [Pathogenesis and genetic landscape of acute myeloid leukemia]. *Magy Onkol.* 2017;61(1):21-8.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
3. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, et al. *Williams Hematology.* New York: McGraw-Hill Education; 2016; 1373.
4. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532-42.
5. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339(6127):1546-58.
6. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine.* 2013;368(22):2059-74.
7. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127(1):29-41.
8. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273-84.
9. DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):348-55.
10. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia.* 2016;30(11):2160-8.
11. Green CL, Tawana K, Hills RK, Bödör C, Fitzgibbon J, Inglott S, et al. GATA2 mutations in sporadic and familial acute myeloid leukaemia patients with CEBPA mutations. *Br J Haematol.* 2013;161(5):701-5.
12. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine.* 2016;374(23):2209-21.

13. Ravandi F, Kantarjian H, Faderl S, Garcia-Manero G, O'Brien S, Koller C, et al. Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res.* 2010;34(6):752-6.
14. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;122(4):523-38.
15. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol.* 2000;111(1):190-5.
16. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996;10(12):1911-8.
17. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002;99(12):4326-35.
18. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia.* 1999;13(1):38-43.
19. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97(1):89-94.
20. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoun SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine.* 2014;371(26):2477-87.
21. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20(12):1472-8.
22. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature.* 2018;559(7714):400-4.

23. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med*. 2018;24(7):1015-23.
24. Shahin OA, Chifotides HT, Bose P, Masarova L, Verstovsek S. Accelerated Phase of Myeloproliferative Neoplasms. *Acta Haematol*. 2021:1-16.
25. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007;92(6):744-52.
26. Christiansen DH, Andersen MK, Desta F, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS-BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(12):2232-40.
27. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2548-53.
28. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *The New England journal of medicine*. 2016;374(5):422-33.
29. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1079-89.
30. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol*. 2016;17(1):19.
31. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2018;32(3):167-83.
32. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine*. 2005;352(3):254-66.
33. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2488-98.

34. Forghieri F, Nasillo V, Paolini A, Bettelli F, Pioli V, Giusti D, et al. NPM1-Mutated Myeloid Neoplasms with <20% Blasts: A Really Distinct Clinico-Pathologic Entity? *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
35. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-33.
36. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res.* 2006;66(6):3310-6.
37. Cocciardi S, Dolnik A, Kapp-Schwoerer S, Rucker FG, Lux S, Blätte TJ, et al. Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation. *Nat Commun.* 2019;10(1):2031.
38. Höllein A, Meggendorfer M, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Kern W, et al. NPM1 mutated AML can relapse with wild-type NPM1: persistent clonal hematopoiesis can drive relapse. *Blood advances.* 2018;2(22):3118-25.
39. Jain P, Kantarjian H, Patel K, Faderl S, Garcia-Manero G, Benjamini O, et al. Mutated NPM1 in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse. *Leukemia & lymphoma.* 2014;55(6):1337-44.
40. Kapp-Schwoerer S, Weber D, Corbacioglu A, Gaidzik VI, Paschka P, Krönke J, et al. Impact of gemtuzumab ozogamicin on MRD and relapse risk in patients with NPM1-mutated AML: results from the AMLSG 09-09 trial. *Blood.* 2020;136(26):3041-50.
41. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschürtz F, Gaidzik VI, Kühn MW, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(1):100-8.
42. Meloni G, Mancini M, Gianfelici V, Martelli MP, Foa R, Falini B. Late relapse of acute myeloid leukemia with mutated NPM1 after eight years: evidence of NPM1 mutation stability. *Haematologica.* 94. Italy2009. p. 298-300.
43. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol.* 2009;144(4):517-23.

44. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-31.
45. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(8):2854-61.
46. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009;360(22):2289-301.
47. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-33.
48. Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*. 2013;339(6127):1621-5.
49. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell*. 2011;19(1):17-30.
50. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Future oncology (London, England)*. 2018;14(10):979-93.
51. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*. 2010;18(6):553-67.
52. Platt MY, Fathi AT, Borger DR, Brunner AM, Hasserjian RP, Balaj L, et al. Detection of Dual IDH1 and IDH2 Mutations by Targeted Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2015;17(6):661-8.
53. Clark O, Yen K, Mellinger IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(8):1837-42.

54. Willander K, Falk IJ, Chaireti R, Paul E, Hermansson M, Green H, et al. Mutations in the isocitrate dehydrogenase 2 gene and IDH1 SNP 105C > T have a prognostic value in acute myeloid leukemia. *Biomarker research*. 2014;2:18.
55. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2348-55.
56. Wagner K, Damm F, Gohring G, Gorlich K, Heuser M, Schafer I, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2356-64.
57. Molenaar RJ, Thota S, Nagata Y, Patel B, Clemente M, Przychodzen B, et al. Clinical and biological implications of ancestral and non-ancestral IDH1 and IDH2 mutations in myeloid neoplasms. *Leukemia*. 2015;29(11):2134-42.
58. Lin CC, Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Chen CY, et al. IDH mutations are closely associated with mutations of DNMT3A, ASXL1 and SRSF2 in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution. *Am J Hematol*. 2014;89(2):137-44.
59. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017;31(2):272-81.
60. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia*. 2012;26(3):475-80.
61. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24(7):1302-9.
62. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease

- monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget*. 2015;6(39):42345-53.
63. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, Madic J, Nibourel O, Marceau-Renaut A, et al. Clinical relevance of IDH1/2 mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica*. 2018;103(5):822-9.
  64. Ok CY, Loghavi S, Sui D, Wei P, Kanagal-Shamanna R, Yin CC, et al. Persistent IDH1/2 mutations in remission can predict relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2019;104(2):305-11.
  65. Wiseman DH, Williams EL, Wilks DP, Sun Leong H, Somerville TD, Dennis MW, et al. Frequent reconstitution of IDH2(R140Q) mutant clonal multilineage hematopoiesis following chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 302016. p. 1946-50.
  66. Gaidzik VI, Weber D, Paschka P, Kaumanns A, Krieger S, Corbacioglu A, et al. DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(1):30-7.
  67. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2018;378(13):1189-99.
  68. Pløen GG, Nederby L, Guldborg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. *Br J Haematol*. 2014;167(4):478-86.
  69. Sun Y, Shen H, Xu T, Yang Z, Qiu H, Sun A, et al. Persistent DNMT3A mutation burden in DNMT3A mutated adult cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients in long-term remission. *Leuk Res*. 2016;49:102-7.
  70. Youn HS, Kim TY, Park UH, Moon ST, An SJ, Lee YK, et al. *Asxl1* deficiency in embryonic fibroblasts leads to cellular senescence via impairment of the AKT-E2F pathway and *Ezh2* inactivation. *Sci Rep*. 2017;7(1):5198.
  71. Yannakou CK, Jones K, McBean M, Thompson ER, Ryland GL, Doig K, et al. ASXL1 c.1934dup;p.Gly646Trpfs\*12-a true somatic alteration requiring a new approach. *Blood Cancer J*. 2017. p. 656.



72. Kakosaiou K, Panitsas F, Daraki A, Pagoni M, Apostolou P, Ioannidou A, et al. ASXL1 mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics. *Leukemia & lymphoma*. 2018;59(10):2439-46.
73. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*. 2003;102(7):2395-402.
74. Nasmyth K, Haering CH. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*. 2009;43:525-58.
75. Thota S, Viny AD, Makishima H, Spitzer B, Radivoyevitch T, Przychodzen B, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*. 2014;124(11):1790-8.
76. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-9.
77. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015;6(10):8388-96.
78. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-76.
79. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*. 2006;108(10):3280-8.
80. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-65.

81. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-36.
82. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-74.
83. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5):1312-20.
84. Klein K, Kaspers G, Harrison CJ, Beverloo HB, Reedijk A, Bongers M, et al. Clinical Impact of Additional Cytogenetic Aberrations, cKIT and RAS Mutations, and Treatment Elements in Pediatric t(8;21)-AML: Results From an International Retrospective Study by the International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(36):4247-58.
85. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y, et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood*. 2010;115(12):2372-9.
86. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299-312.
87. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
88. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mims A, Nicolet D, Walker CJ, Blachly JS, et al. Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. *Leukemia*. 2020;34(12):3215-27.

89. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol.* 2015;43(8):609-24.
90. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2018;131(12):1275-91.
91. Voso MT, Ottone T, Lavorgna S, Venditti A, Maurillo L, Lo-Coco F, et al. MRD in AML: The Role of New Techniques. *Front Oncol.* 2019;9:655.
92. Buccisano F, Maurillo L, Schuurhuis GJ, Del Principe MI, Di Veroli A, Gurnari C, et al. The emerging role of measurable residual disease detection in AML in morphologic remission. *Semin Hematol.* 2019;56(2):125-30.
93. Cicconi L, Lo-Coco F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1474-81.
94. Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, Du J, Bullinger L, et al. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFβ-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(23):3724-9.
95. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213-23.
96. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2009;113(9):1875-91.
97. Forghieri F, Comoli P, Marasca R, Potenza L, Luppi M. Minimal/Measurable Residual Disease Monitoring in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Clinical Viewpoint and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
98. Coltoff A, Houldsworth J, Keyzner A, Renteria AS, Mascarenhas J. Role of minimal residual disease in the management of acute myeloid leukemia-a case-based discussion. *Ann Hematol.* 2018;97(7):1155-67.
99. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood advances.* 2018;2(11):1356-66.

100. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.
101. Yates JW, Wallace HJ, Jr., Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep*. 1973;57(4):485-8.
102. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61.
103. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2015;373(12):1136-52.
104. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen L, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m<sup>2</sup> vs 60 mg/m<sup>2</sup> in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood*. 2015;125(25):3878-85.
105. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2009;361(13):1249-59.
106. Lee JH, Joo YD, Kim H, Bae SH, Kim MK, Zang DY, et al. A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(14):3832-41.
107. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2009;361(13):1235-48.
108. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(27):3360-8.
109. Löwenberg B, Pabst T, Vellenga E, van Putten W, Schouten HC, Graux C, et al. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;364(11):1027-36.
110. Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(1):26-8.

- 111.Schaich M, Röllig C, Soucek S, Kramer M, Thiede C, Mohr B, et al. Cytarabine dose of 36 g/m<sup>2</sup> compared with 12 g/m<sup>2</sup> within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(19):2696-702.
- 112.Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. 2007;109(6):1114-24.
- 113.Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):562-9.
- 114.Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(21):2670-7.
- 115.Ramos NR, Mo CC, Karp JE, Hourigan CS. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2015;4(4):665-95.
- 116.Sarkozy C, Gardin C, Gachard N, Merabet F, Turlure P, Malfuson JV, et al. Outcome of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Am J Hematol*. 2013;88(9):758-64.
- 117.Itzykson R, Thépot S, Berthon C, Delaunay J, Bouscary D, Cluzeau T, et al. Azacitidine for the treatment of relapsed and refractory AML in older patients. *Leuk Res*. 2015;39(2):124-30.
- 118.Ivanoff S, Gruson B, Chantepie SP, Lemasle E, Merlusca L, Harrivel V, et al. 5-Azacytidine treatment for relapsed or refractory acute myeloid leukemia after intensive chemotherapy. *Am J Hematol*. 2013;88(7):601-5.

119. Ritchie EK, Feldman EJ, Christos PJ, Rohan SD, Lagassa CB, Ippoliti C, et al. Decitabine in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(9):2003-7.
120. Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, Ravandi F, Borthakur G, Garcia-Manero G, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. *Cancer*. 2014;120(14):2142-9.
121. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, Ramachandran A, Small D, Cortes J, et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*. 2014;123(1):94-100.
122. Emadi A, Faramand R, Carter-Cooper B, Tolu S, Ford LA, Lapidus RG, et al. Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2015;90(5):E77-9.
123. Jin J, Hu C, Yu M, Chen F, Ye L, Yin X, et al. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e100206.
124. DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, Luthra R, Pierce S, Borthakur G, et al. Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(8):1925-9.
125. Kernytsky A, Wang F, Hansen E, Schalm S, Straley K, Gliser C, et al. IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood*. 2015;125(2):296-303.
126. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *The New England journal of medicine*. 2018;378(25):2386-98.
127. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-31.

- 128.Harding JJ, Lowery MA, Shih AH, Schwartzman JM, Hou S, Famulare C, et al. Isoform Switching as a Mechanism of Acquired Resistance to Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibition. *Cancer discovery*. 2018;8(12):1540-7.
- 129.Intlekofer AM, Shih AH, Wang B, Nazir A, Rustenburg AS, Albanese SK, et al. Acquired resistance to IDH inhibition through trans or cis dimer-interface mutations. *Nature*. 2018;559(7712):125-9.
- 130.Quek L, David MD, Kennedy A, Metzner M, Amatangelo M, Shih A, et al. Clonal heterogeneity of acute myeloid leukemia treated with the IDH2 inhibitor enasidenib. *Nat Med*. 2018;24(8):1167-77.
- 131.Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70.
- 132.Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhäuser M, Juliusson G, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(10):579-90.
- 133.Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776-84.
- 134.Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Jama*. 2009;301(22):2349-61.
- 135.Kuba A, Raida L. Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. *Mediators of inflammation*. 2018;2018:9451950.
- 136.Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *The New England journal of medicine*. 2017;377(26):2565-79.
- 137.Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *The New England journal of medicine*. 2017;377(22):2167-79.

138. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
139. Gam R, Shah P, Crossland RE, Norden J, Dickinson AM, Dressel R. Genetic Association of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome beyond Histocompatibility Genes. *Frontiers in immunology.* 2017;8:380.
140. Spierings E, Kim YH, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2013;19(8):1244-53.
141. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, Rowe V, Kuns R, Don A, et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood.* 2005;106(6):2206-14.
142. Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2010;34(9):1158-68.
143. Malone FR, Leisenring WM, Storer BE, Lawler R, Stern JM, Aker SN, et al. Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant. *Bone marrow transplantation.* 2007;40(8):765-72.
144. Remberger M, Jaksch M, Uzunel M, Mattsson J. Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2003;70(6):384-91.
145. Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, Vigorito AC, Aranha FJ, de Brito Eid KA, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31(11):1044-50.
146. Arrieta-Bolanos E, Madrigal JA, Shaw BE. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms and the outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2012;39(3):192-202.
147. Coomes SM, Moore BB. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta in hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2010;90(11):1139-44.



148. Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF-beta family of cytokines. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(9):917-22.
149. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 2008;28(4):468-76.
150. Arrieta-Bolanos E, Mayor NP, Marsh SG, Madrigal JA, Apperley JF, Kirkland K, et al. Polymorphism in TGFB1 is associated with worse non-relapse mortality and overall survival after stem cell transplantation with unrelated donors. *Haematologica*. 2016;101(3):382-90.
151. Berro M, Palau Nagore MV, Rivas MM, Longo P, Foncuberta C, Vitriu A, et al. Transforming growth factor-beta1 functional polymorphisms in myeloablative sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2017;52(5):739-44.
152. Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. *Blood*. 2012;119(26):6365-72.
153. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nagatoshi Y, Sakata N, et al. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2002;30(10):665-71.
154. Zhang L, Mao L, Xu J. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms and graft-versus-host disease risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(3):2455-61.
155. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(1):93-7.
156. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(2):214-9.
157. Koszarska M, Bors A, Feczko A, Meggyesi N, Batai A, Csomor J, et al. Type and location of isocitrate dehydrogenase mutations influence clinical characteristics and

- disease outcome of acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(5):1028-35.
- 158.Kövy P, Kozma A, Bors A, Meggyesi N, Ádám E, Borsy A, et al. Új terápiás célpont akut myeloid leukémiában: izocitrát dehidrogenáz 1 és 2 mutációk. *Hematológia Transzfuziológia*. 2019;152:142-7.
- 159.Balassa K, Krahling T, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, et al. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(2):391-8.
- 160.Przepiorcka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone marrow transplantation*. 1995;15(6):825-8.
- 161.Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-20.
- 162.Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752-9.
- 163.Chou WC, Tang JL, Wu SJ, Tsay W, Yao M, Huang SY, et al. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia*. 2007;21(5):998-1004.
- 164.Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-8.
- 165.Mencia-Trinchant N, Hu Y, Alas MA, Ali F, Wouters BJ, Lee S, et al. Minimal Residual Disease Monitoring of Acute Myeloid Leukemia by Massively Multiplex Digital PCR in Patients with NPM1 Mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2017;19(4):537-48.

166. Waterhouse M, Pfeifer D, Duque-Afonso J, Follo M, Duyster J, Depner M, et al. Droplet digital PCR for the simultaneous analysis of minimal residual disease and hematopoietic chimerism after allogeneic cell transplantation. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(5):641-7.
167. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2474-86.
168. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood.* 2002;99(12):4618-25.
169. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(5):999-1003.
170. Topic E, Nikolac N, Panteghini M, Theodorsson E, Salvagno GL, Miler M, et al. How to assess the quality of your analytical method? *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(11):1707-18.
171. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation.* 2013;48(3):452-8.
172. Dillon R, Hills R, Freeman S, Potter N, Jovanovic J, Ivey A, et al. Molecular MRD status and outcome after transplantation in NPM1-mutated AML. *Blood.* 2020;135(9):680-8.
173. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, Martelli MP. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. *Blood.* 2020;136(15):1707-21.
174. Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol.* 2014;93(8):1279-86.

- 175.Scholl S, Theuer C, Scheble V, Kunert C, Heller A, Mügge LO, et al. Clinical impact of nucleophosmin mutations and Flt3 internal tandem duplications in patients older than 60 yr with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2008;80(3):208-15.
- 176.Tuval A, Shlush LI. Evolutionary trajectory of leukemic clones and its clinical implications. *Haematologica.* 2019;104(5):872-80.
- 177.Harada Y, Nagata Y, Kihara R, Ishikawa Y, Asou N, Ohtake S, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res.* 2018;66:20-7.
- 178.Grimm J, Jentzsch M, Bill M, Goldmann K, Schulz J, Niederwieser D, et al. Prognostic impact of the ELN2017 risk classification in patients with AML receiving allogeneic transplantation. *Blood advances.* 2020;4(16):3864-74.
- 179.Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, Cortes J, Alfayez M, Borthakur G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer.* 2019;125(7):1091-100.
- 180.Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, Usuki K, Ueki T, Oh I, et al. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood advances.* 2018;2(20):2744-54.
- 181.Linch DC, Hills RK, Burnett AK, Khwaja A, Gale RE. Impact of FLT3(ITD) mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood.* 2014;124(2):273-6.
- 182.Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood.* 2013;121(14):2734-8.
- 183.Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood.* 2014;124(23):3441-9.
- 184.Schnittger S, Bacher U, Kern W, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(8):1297-304.

- 185.Huang Y, Hu J, Lu T, Luo Y, Shi J, Wu W, et al. Acute myeloid leukemia patient with FLT3-ITD and NPM1 double mutation should undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in CR1 for better prognosis. *Cancer Manag Res.* 2019;11:4129-42.
- 186.Bill M, Grimm J, Jentzsch M, Kloss L, Goldmann K, Schulz J, et al. Digital droplet PCR-based absolute quantification of pre-transplant NPM1 mutation burden predicts relapse in acute myeloid leukemia patients. *Ann Hematol.* 2018;97(10):1757-65.
- 187.Liu SB, Qiu QC, Bao XB, Ma X, Li HZ, Liu YJ, et al. Pattern and prognostic value of FLT3-ITD mutations in Chinese de novo adult acute myeloid leukemia. *Cancer Sci.* 2018;109(12):3981-92.
- 188.Oran B, Cortes J, Beitinjaneh A, Chen HC, de Lima M, Patel K, et al. Allogeneic Transplantation in First Remission Improves Outcomes Irrespective of FLT3-ITD Allelic Ratio in FLT3-ITD-Positive Acute Myelogenous Leukemia. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2016;22(7):1218-26.
- 189.Minetto P, Candoni A, Guolo F, Clavio M, Zannier ME, Miglino M, et al. Fludarabine, High-Dose Cytarabine and Idarubicin-Based Induction May Overcome the Negative Prognostic Impact of FLT3-ITD in NPM1 Mutated AML, Irrespective of FLT3-ITD Allelic Burden. *Cancers (Basel).* 2020;13(1).
- 190.Loghavi S, Zuo Z, Ravandi F, Kantarjian HM, Bueso-Ramos C, Zhang L, et al. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations. *Journal of hematology & oncology.* 2014;7:74.
- 191.Gale RE, Lamb K, Allen C, El-Sharkawi D, Stowe C, Jenkinson S, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2015;33(18):2072-83.
- 192.Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(7):742-50.

193. Tie R, Zhang T, Fu H, Wang L, Wang Y, He Y, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e93353.
194. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nat Commun*. 2016;7:10924.
195. Wang R, Gao X, Yu L. The prognostic impact of tet oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: a systematic-review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):389.
196. Gardin C, Pautas C, Fournier E, Itzykson R, Lemasle E, Bourhis JH, et al. Added prognostic value of secondary AML-like gene mutations in ELN intermediate-risk older AML: ALFA-1200 study results. *Blood advances*. 2020;4(9):1942-9.
197. Short NJ, Zhou S, Fu C, Berry DA, Walter RB, Freeman SD, et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020;6(12):1890-9.
198. Chung HJ, Hur M, Yoon S, Hwang K, Lim HS, Kim H, et al. Performance Evaluation of the QXDx BCR-ABL %IS Droplet Digital PCR Assay. *Ann Lab Med*. 2020;40(1):72-5.
199. Link-Lenczowska D, Pallisgaard N, Cordua S, Zawada M, Czekalska S, Krochmalczyk D, et al. A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. *Ann Hematol*. 2018;97(12):2299-308.
200. Maier J, Lange T, Cross M, Wildenberger K, Niederwieser D, Franke GN. Optimized Digital Droplet PCR for BCR-ABL. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2019;21(1):27-37.
201. Wang WJ, Zheng CF, Liu Z, Tan YH, Chen XH, Zhao BL, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *Eur J Haematol*. 2018;101(3):291-6.
202. Waterhouse M, Follo M, Pfeifer D, von Bubnoff N, Duyster J, Bertz H, et al. Sensitive and accurate quantification of JAK2 V617F mutation in chronic

- myeloproliferative neoplasms by droplet digital PCR. *Ann Hematol.* 2016;95(5):739-44.
203. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2017;35(2):185-93.
204. Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(19):2709-16.
205. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood.* 2013;122(1):83-92.
206. Stahl T, Badbaran A, Kröger N, Klyuchnikov E, Zabelina T, Zeschke S, et al. Minimal residual disease diagnostics in patients with acute myeloid leukemia in the post-transplant period: comparison of peripheral blood and bone marrow analysis. *Leukemia & lymphoma.* 2010;51(10):1837-43.
207. Hubmann M, Köhnke T, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Zellmeier E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica.* 2014;99(8):1317-25.
208. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Østergaard M, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood.* 2010;115(2):198-205.
209. Schlenk RF, Frech P, Weber D, Brossart P, Horst HA, Kraemer D, et al. Impact of pretreatment characteristics and salvage strategy on outcome in patients with relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31(5):1217-20.

210. Lussana F, Caprioli C, Stefanoni P, Pavoni C, Spinelli O, Buklijas K, et al. Molecular Detection of Minimal Residual Disease before Allogeneic Stem Cell Transplantation Predicts a High Incidence of Early Relapse in Adult Patients with NPM1 Positive Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10).
211. Bataller A, Oñate G, Diaz-Beyá M, Guijarro F, Garrido A, Vives S, et al. Acute myeloid leukemia with NPM1 mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease. *Br J Haematol*. 2020;191(1):52-61.
212. Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, Herbst R, Wolf D, Baldus CD, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(12):1668-79.
213. Karas M, Steinerova K, Lysak D, Hrabetova M, Jungova A, Sramek J, et al. Pre-transplant Quantitative Determination of NPM1 Mutation Significantly Predicts Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Normal Karyotype AML in Complete Remission. *Anticancer Res*. 2016;36(10):5487-98.
214. Kayser S, Benner A, Thiede C, Martens U, Huber J, Stadtherr P, et al. Pretransplant NPM1 MRD levels predict outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e449.
215. Hourigan CS, Dillon LW, Gui G, Logan BR, Fei M, Ghannam J, et al. Impact of Conditioning Intensity of Allogeneic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With Genomic Evidence of Residual Disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(12):1273-83.
216. Burchert A, Bug G, Fritz LV, Finke J, Stelljes M, Röllig C, et al. Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3-Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(26):2993-3002.



- 217.Klco JM, Miller CA, Griffith M, Petti A, Spencer DH, Ketkar-Kulkarni S, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *Jama*. 2015;314(8):811-22.
- 218.Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Mims AS, Pratz KW, Savona MR, et al. Ivosidenib or enasidenib combined with intensive chemotherapy in patients with newly diagnosed AML: a phase 1 study. *Blood*. 2020.
- 219.Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine*. 2000;342(18):1350-8.
- 220.Liem LM, Fibbe WE, van Houwelingen HC, Goulmy E. Serum transforming growth factor-beta1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1999;67(1):59-65.
- 221.Berro M, Mayor NP, Maldonado-Torres H, Cooke L, Kusminsky G, Marsh SG, et al. Association of functional polymorphisms of the transforming growth factor B1 gene with survival and graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010;95(2):276-83.
- 222.Kim D, Won HH, Su S, Cheng L, Xu W, Hamad N, et al. Risk stratification of organ-specific GVHD can be improved by single-nucleotide polymorphism-based risk models. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(5):649-56.
- 223.Kim DD, Yun J, Won HH, Cheng L, Su J, Xu W, et al. Multiple single-nucleotide polymorphism-based risk model for clinical outcomes after allogeneic stem-cell transplantation, especially for acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2012;94(12):1250-7.
- 224.Noori-Dalooi MR, Rashidi-Nezhad A, Izadi P, Hossein-Nezhad A, Sobhani M, Derakhshandeh-Peykar P, et al. Transforming growth factor-beta1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogeneic BMT in Iranian population. *Annals of transplantation*. 2007;12(4):5-10.
- 225.Xiao H, Cao W, Lai X, Luo Y, Shi J, Tan Y, et al. Immunosuppressive cytokine gene polymorphisms and outcome after related and unrelated hematopoietic cell transplantation in a chinese population. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(4):542-9.

226. Baron C, Somogyi R, Greller LD, Rineau V, Wilkinson P, Cho CR, et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene-expression profiling. *PLoS medicine*. 2007;4(1):e23.
227. Sellathamby S, Lakshmi KM, Busson M, Viswabandya A, George B, Mathews V, et al. Polymorphisms in the immunoregulatory genes are associated with hematopoietic recovery and increased susceptibility to bacterial infections in patients with thalassaemia major undergoing matched related hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2012;18(8):1219-26.
228. Shah R, Selby ST, Yokley B, Slack RS, Hurley CK, Posch PE. TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Tissue Antigens*. 2009;74(1):50-6.
229. Malkki M, Gooley T, Dubois V, Horowitz M, Petersdorf EW. Immune response gene polymorphisms in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens*. 2007;69 Suppl 1:50-3.
230. Karaesmen E, Rizvi AA, Preus LM, McCarthy PL, Pasquini MC, Onel K, et al. Replication and validation of genetic polymorphisms associated with survival after allogeneic blood or marrow transplant. *Blood*. 2017;130(13):1585-96.
231. Alam N, Xu W, Atenafu EG, Uhm J, Seftel M, Gupta V, et al. Risk model incorporating donor IL6 and IFNG genotype and gastrointestinal GVHD can discriminate patients at high risk of steroid refractory acute GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2015;50(5):734-42.
232. Hyvarinen K, Ritari J, Koskela S, Niittyvuopio R, Nihtinen A, Volin L, et al. Genetic polymorphism related to monocyte-macrophage function is associated with graft-versus-host disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):15666.
233. Zeng H, Chi H. mTOR signaling in the differentiation and function of regulatory and effector T cells. *Current opinion in immunology*. 2017;46:103-11.
234. Sepetiene R, Patamsyte V, Zukovas G, Jariene G, Stanioniene Z, Benetis R, et al. Association between Fibrillin1 Polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and Transforming Growth Factor beta1 Concentration in Human Plasma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;21(1):735-8.



## 10. Saját publikációk jegyzéke

### Amelyek kapcsolódnak a disszertációhoz

1. Petra Kövy, Zoltán Órfi, András Bors, András Kozma, László Gopcsa, János Dolgos, Nóra Lovas, József Harasztombi, Viktor Lakatos, Ágnes Király, Gábor Mikala, István Vályi-Nagy, Péter Reményi, Hajnalka Andrikovics. Nucleophosmin1 and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 as measurable residual disease markers in acute myeloid leukemia. Plos One 2021 Jun 21;16(6):e0253386. doi: 10.1371/journal.pone.0253386. eCollection 2021.
2. Petra Kövy, Nóra Meggyesi, Lívia Varga, Katalin Balassa, András Bors, László Gopcsa, Melinda Paksi, Árpád Bártai, Eszter Vad, János Sinkó, Attila Tordai, Tamás Masszi, Péter Reményi, Hajnalka Andrikovics. Investigation of TGFB1 -1347C>T variant as a biomarker after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2020 Jan;55(1):215-223. doi: 10.1038/s41409-019-0656-4. Epub 2019 Sep 16.
3. Kövy Petra, Kozma András, Bors András, Meggyesi Nóra, Ádám Emma, Borsy Adrienn, Dolgos János, Lovas Nóra, Harasztombi József, Lakatos Viktor, Vályi-Nagy István, Mikala Gábor, Reményi Péter, Andrikovics Hajnalka. Új terápiás célpont akut myeloid leukémiában: izocitrátdehidrogenáz 1 és 2 mutációk. Hematológia –Transzfuziológia 52 : 2 pp. 106-114. , 9 p. (2019)

### Amelyek nem kapcsolódnak a disszertációhoz

1. Andrikovics Hajnalka, Kövy Petra, Bors András, Csabán Dóra, Meggyesi Nóra, Órfi Zoltán, Borsy Adrienn, Kozma András, Dolgos János, Harasztombi József, Mikala Gábor, Reményi Péter, Vályi-Nagy István. Az új generációs szekvenálás jelentősége az akut mieloid leukémia precíziós onkológiai megközelítésében [Importance of next generation sequencing in precision oncology approach of acute myeloid leukemia]. Magyar Onkológia 63 : 4 pp. 282-287. , 6 p. (2019)

2. 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. Proteasome Subunit Beta Type 1 P11A Polymorphism Is a New Prognostic Marker in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(11):734-742; doi: 10.1016/j.clml.2017.06.034. Epub 2017 Jun 30.
3. Kiss KP, Varga G, Mikala G, Balassa K, Bors A, Kovy P, Meggyesi N, Kozma A, Csacsovski 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;59(3):710-716. doi: 10.1080/10428194.2017.1346250. Epub 2017 Jul 9.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsőként témavezetőmnek, Dr. Andrikovics Hajnalkának, aki lehetőséget adott arra, hogy megismerhessem a molekuláris genetika szépségeit és kihívásait az általa vezetett laboratóriumban. Köszönöm áldozatos munkáját, rám szánt idejét és energiáját, mellyel irányt mutatott és végig segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Tordai Attilának a tanulmányaim alatt nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom a molekuláris genetikai laboratórium diplomás munkatársainak, Dr. Bors Andrásnak, Dr. Borsy Adriennek, Kozma Andrásnak, Dr. Meggyesi Nórának, Dr. Órfi Zoltánnak és Dr. Tankó Lenkének, akik szakmai tudásukkal, meglátásukkal és tanácsaikkal támogattak.

Köszönöm a laboratórium asszisztenseinek, Madarasi-Haluska Brigittának, Markovich Zsófiának, Petró Péternének, Suriné Gulyás Juditnak, Tóth-Zsidai Alexandrának, hogy a labormunka minden csínjára megtanítottak és munkájukkal segítették a haladásomat.

A klinikai adatokért köszönettel tartozom a Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Hematológiai és Óssejt Transzplantációs Osztály valamennyi orvosának.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a szüleimnek és a férjemnek, hogy mellettem álltak és bíztattak az évek során.