

mgr Karolina Karabin

**Markery niestabilności genetycznej w ostrych białaczkach
limfoblastycznych B-komórkowych (B-OBL) u dorosłych w korelacji
z klinicznym przebiegiem choroby**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Promotor: prof. dr hab. med. Wiesław Wiktor Jędrzejczak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Marta Libura

Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

Ostra białaczka limfoblastyczna B-komórkowa (B-OBL) jest genetycznie heterogenną grupą nowotworów, która u dorosłych charakteryzuje się szczególnie niekorzystnym przebiegiem. Ostatnie doniesienia podkreślają rolę procesów związanych z niestabilnością genetyczną oraz udział w progresji B-OBL endogennych mutatorów takich, jak kompleks enzymatyczny RAGs i białka z rodziny AID/APOBEC. Fizjologiczna funkcja tych enzymów jest związana z wprowadzaniem submikroskopowych delecji, insercji lub mutacji punktowych w procesie wytwarzania funkcjonalnych przeciwciał i receptorów limfocytów T (Ig/TCR) lub w trakcie obrony przeciwwirusowej. Jednak w niektórych sytuacjach enzymy te mogą powodować niestabilność genetyczną i wprowadzać do genomu mutacje typu zmiany liczby kopii fragmentów DNA (CNA) lub typu substytucji pojedynczych nukleotydów (SNV). Komórki układu odpornościowego, w tym limfoidalne są szczególnie narażone na nieprawidłową aktywność enzymów mutatorowych. Z uwagi na to, w pracy podjęto próbę oceny roli ekspresji kompleksu RAGs i enzymów z rodziny AID/APOBEC (AID, A3A, A3B) oraz ich potencjalnego udziału w powstawaniu niestabilności genetycznej typu CNA w poszczególnych podgrupach genetycznych w B-OBL u dorosłych.

Do pracy zostało zakwalifikowanych 162 chorych z B-OBL w wieku od 18 do 80 lat. Chorzy zostali zdiagnozowani w Polskich Ośrodkach Hematologicznych w latach 2007-2017 i leczeni według protokołu PALG-ALL5 lub ALL6. W pierwszej kolejności chorzy zostali przebadani metodą RT-PCR w kierunku powszechnie występujących genów fuzyjnych ujętych w protokole BIOMED-1 (*BCR-ABL1*, *E2A-PBX1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4*). Chorzy bez obecności powszechnie występujących genów fuzyjnych (97/162; 60%) zostali następnie przebadani w kierunku wybranych genów fuzyjnych i mutacji charakterystycznych dla podtypu *BCR-ABL1-like* za pomocą metod PCR, RT-PCR, RQ-PCR i/lub sekwencjonowania metodą Sangera. Wyodrębniona podgrupa *BCR-ABL1-like* stanowiła 10% całej populacji chorych.

Względna ekspresja mRNA genów kodujących enzymy mutatorowe *RAG2*, *AICDA*, *A3A*, *A3B* została oceniona za pomocą metody RQ-PCR i znormalizowana względem genu referencyjnego *GUS*. Ocena mutacji typu CNA (*IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1*,

CDKN2A/B), które są jednym z przejawów niestabilności genetycznej B-OBL, została wykonana za pomocą metody MLPA.

Stwierdzono, że chorzy z genem fuzyjnym *BCR-ABL1* charakteryzowali się wyższą ekspresją genu *RAG2* ($p=0,03$) oraz częstszym występowaniem mutacji typu CNA ($p=0,02$), szczególnie delecji genu *IKZF1* ($p=0,003$), co potwierdza rolę kompleksu RAGs jako czynnika niestabilności genetycznej w tej podgrupie chorych. Delecja genu *IKZF1* nie miała wpływu na ryzyko nawrotu i zgonu białaczki u chorych z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*. Jednak stwierdzono niekorzystny wpływ tej delecji na ryzyko nawrotu ($p=0,001$) i zgonu ($p=0,03$) białaczki w grupie chorych bez genu fuzyjnego *BCR-ABL1*, co potwierdzają również światowe doniesienia literaturowe. Brak wpływu mutacji typu CNA takich, jak delecje genu *IKZF1* na przeżycie u chorych z genem fuzyjnym *BCR-ABL1* wynika najprawdopodobniej z faktu zastosowania u nich inhibitorów kinaz tyrozynowych. Większe znaczenie w modyfikowaniu odpowiedzi na leczenie u tych chorych zdają się mieć mutacje typu SNV np. genu *ABL1*.

W pracy po raz pierwszy udokumentowano wpływ delecji genu *ETV6* na ryzyko zgonu ($p=0,01$) i nawrotu białaczki ($p=0,03$) u dorosłych z B-OBL. Ponadto chorzy posiadający 3 lub 4 mutacje typu CNA wykazywali większe prawdopodobieństwo nawrotu białaczki ($p=0,04$), wskazując, że ilość CNA jest wykładnikiem niestabilności genetycznej w B-OBL u dorosłych i może być markerem stratyfikacji chorych do grupy ryzyka.

Stwierdzono, że najwyższa ekspresja genu *AICDA* występowała w podgrupie bez genów fuzyjnych ujętych w protokole BIOMED-1, czyli NEG B-OBL ($p=0,03$). W podgrupie NEG B-OBL rzadziej występowały mutacje typu CNA w porównaniu z podgrupą *BCR-ABL1*-pozytywną i *BCR-ABL1-like* (67% vs 80 vs 83%). Szczególnie rzadko występowały delecje genu *IKZF1* ($p=0,04$). Warto również zauważyć, że istnieje wręcz odwrotny związek pomiędzy ilością mutacji typu CNA a ekspresją genu *AICDA* w całej grupie chorych ($p=0,09$). Ponadto zauważono, że w podgrupie NEG B-OBL występowała niższa ekspresja genu *RAG2* ($p=0,01$), co odzwierciedla negatywna korelacja pomiędzy ekspresją genu *RAG2* i *AICDA* ($r=-0,32$). Dlatego enzym AID pełni prawdopodobnie rolę czynnika niestabilności genetycznej w podgrupie NEG B-OBL, ale wyznacznikiem tego procesu nie jest obecność mutacji typu CNA, ale najprawdopodobniej niestabilność genetyczna związana z mutacjami typu SNV.

U chorych z genem fuzyjnym *BCR-ABL1* częściej występowała niska ekspresja genu *A3B* ($p=0,006$), a w przypadku ekspresji genu *A3A* stwierdzono trend statystyczny ($p=0,08$). Stąd wydaje się, iż białka A3A i A3B nie pełnią roli czynników niestabilności genetycznej

w B-OBL *BCR-ABL1*-pozytywnej. W obecnych badaniach wysoka ekspresja genów *A3A* i *A3B* nie miała związku z występowaniem mutacji typu CNA. Chorzy z mutacjami typu CNA wykazywali niższą medianę ekspresji genu *A3A* ($p=0,03$), szczególnie chorzy z delecjami genu *EBF1* ($p=0,001$), co sugeruje odwrotny związek pomiędzy ekspresją *A3A* a występowaniem mutacji typu CNA.

Stwierdzono także, że ekspresja genów *A3A* i *A3B* korelowała dodatnio ze sobą ($r=0,63$), a także w mniejszym stopniu z ekspresją genu *AICDA* ($p=0,1$), co świadczy o wspólnym szlaku aktywacji powyższych enzymów w komórce. Zaobserwowano również trend statystyczny w podgrupie NEG B-OBL, gdzie występowała wyższa ekspresja genów *A3A* ($p=0,06$) i *A3B* ($p=0,09$). Z uwagi na to bardziej prawdopodobne jest, że enzymy *A3A* i *A3B*, podobnie jak *AID*, pełnią rolę w powstawaniu mutacji typu SNV, które powstają w innym mechanizmie molekularnym niż mutacje typu CNA.

W podsumowaniu pracy należy stwierdzić, iż w badaniach stwierdzono związek pomiędzy wysoką ekspresją kompleksu RAGs a niestabilnością genetyczną związaną z pojawieniem się u mutacji typu CNA u chorych w wybranych podgrupach genetycznych B-OBL u dorosłych. Enzymy mutatorowe z rodziny *AID/APOBEC* wydają się korelować z niestabilnością genetyczną innego typu niż CNA (najprawdopodobniej typu SNV) w podgrupie genetycznej NEG B-OBL. Ponadto stwierdzono związek obecności mutacji typu CNA z ryzykiem nawrotu i zgonu białaczki. Najodpowiedniejszym klinicznie markerem stratyfikacji dorosłych z B-OBL wydaje się być obecność mutacji typu CNA, a nie ocena ekspresji mRNA genów kodujących enzymy mutatorowe.

Kebin

MIKROCYTNIK
KATEDRY KLINIKA HEMATOLOGII,
ONKOLOGII I CHOROBY WĘWĘTRZNYCH

Prof. dr hab. med. Dariusz W. Jędrzejczak

Abano Mateo