

Örökletes genetikai variánsok prognosztikai és prediktív
szerepe myeloma multiplexben

Doktori tézisek

Kiss Katalin Piroska

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

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

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

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

Budapest
2021

1. **Bevezetés**

A myeloma multiplex (MM) rosszindulatú hematológiai megbetegedés, mely a poszt-germinális centrum eredetű B-sejtek transzformációja és proliferációja következtében alakul ki. A primer genetikai eltérések alapján az MM két fő alcsoportra kategorizálható, (i) az immunglobulin nehézlánc (IgH) lókuszt érintő transzlokációkkal, valamint (ii) a hiperdiploiditással jellemzett myeloma. A diagnózis felállítása az International Myeloma Working Group (IMWG) által kiadott kritériumok alapján történik. A myeloma kezelési protokolljaiban alkalmazott immunmoduláns gyógyszerek (IMiD) és a proteaszóma gátló (PI) szerek mellett, melyek ma is a kezelés gerincét alkotják, megjelentek újabb terápiás eszközök. Ezek közé tartoznak a monoklonális antitestek, checkpoint inhibitorok. immunterápiák. A myeloma rendkívül heterogén kórlefolyású. A nagyfokú heterogenitás magyarázatára, különböző prognosztikai és prediktív markereket írtak le. A prognosztikai markerek a betegség kimeneteléről adnak információt az alkalmazott kezeléstől függetlenül. A beteggel kapcsolatos fontosabb

prognosztikai markerek közé tartoznak az életkor és a beteg fittségi állapota. A myeloma aktivitására és a kiváltott szervezeti károsodásra jellemző prognosztikai marker az international staging system (ISS), amely a szérum albumin és a β 2-mikroglobulin alapján kerül kiszámításra. A revised ISS (R-ISS), pedig ezeken a paramétereken felül a specifikus citogenetikai abnormalitások meglétét, vagy hiányát, valamint az emelkedett laktát-dehidrogenáz szintet is figyelembe veszi. A prognosztikai markerekkel szemben a prediktív markerek különböző gyógyszerek és kezelések hatására elért válasz és kimenetel valószínűségéről adnak információt. Számos biomarker egyszerre prognosztikus és prediktív, ezek közé tartozik a mindennapi rutin diagnosztikában is alkalmazott citogenetikai vizsgálatok, valamint a jelenleg még kutatási eszközként számon tartott génexpressziós vizsgálatok.

A teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS) segítségével szisztematikusan kiszűrhetők azok a polimorfizmusok a gén vagy a variáns funkcióra gyakorolt hatásának ismerete nélkül, amelyek

prognosztikai vagy prediktív szerepet játszhatnak az adott betegségben.

Az első GWAS vizsgálat során azonosították az *FOPNL* (fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 onkogén partner N terminális szerű) génen egy olyan egy pontos nukleotid polimorfizmust (rs72773978), mely kedvezőtlen hatással volt az MM összesített túlélésre. A genetikai variáns feltehetőleg fokozott *FOPNL* expressziót, emelkedett centroszómális fehérjeszintet eredményezhet, amely hatással lehet a különböző centroszóma abnormalitások kialakulására (centroszóma amplifikáció, abnormális funkció és struktúra), kedvezőtlen túlélést eredményezve. Myelomát illetően kimutatták, hogy az ismeretlen jelentőségű monoklonális gammopátiától kezdődően az MM-ig a centroszóma amplifikáció minden esetben jelen volt, mely a betegség előrehaladásával fokozatos emelkedést mutatott. Így a myeloma patogenezeise esetén egy korai eseménynek tekinthető, mértéke kedvezőtlen prognózist jelenthet.

A myeloma kezelésének alapját képező bortezomib, a proteaszóma proteolitikus alegységének ($\beta 5$) gátlása során intracelluláris fehérje felhalmozódást okoz, mely a

myeloma sejtek apoptózisához vezet. A $\beta 6$ alegységet kódoló proteaszóma alegység $\beta 1$ (*PSMB1*) génen található rs12717 polimorfizmust bortezomibbal kombinált és rituximab monoterápia esetén is, a progressziómentes túlélést befolyásoló biomarkerként azonosítottak relabált follikuláris lymphomás betegcsoporton.

A proteaszóma egyes alegységeit kódoló gének genetikai variánsai befolyásolhatják a proteaszóma kialakulását, szerkezetét, funkcióját és a proteaszóma gyógyszerkötő helyeinek konformációs változását.

2. Célkitűzések

Munkánk során a *FOPNL* és a *PSMB1* polimorfizmusok vizsgálatát tűztük ki célul egy klinikailag jól jellemzett MM betegcsoportban.

1) *FOPNL* rs72773978 esetében vizsgálni kívántuk, hogy hatással van-e a variáns allél a klinikai jellemzőkre (nem, életkor, ISS, citogenetikai abnormalitások) az MM-ben szenvedő betegek esetén.

2) *FOPNL* rs72773978 prediktív hatásának felderítése (az összesített, valamint a progressziómentes túlélés számítása különböző kezelésben részesült MM betegcsoportok esetén).

3) *PSMB1* rs12717 vizsgálata MM-ben szenvedő betegcsoporton, valamint klinikai jellemzők elemzése a különböző genetikai variánsok esetén.

4) *PSMB1* rs12717 prediktív hatásának vizsgálata.

5) Az egészséges egyének mintáin elvégzett funkcionális vizsgálatok esetén, arra kerestük a választ, hogy a *PSMB1* rs12717 polimorfizmus jelenléte befolyásolja-e a proteaszóma szerkezetének kialakulását, a proteolitikus aktivitását bortezomib gátlással vagy a nélkül.

3. Módszerek

3.1 Vizsgált személyek

Tanulmányunkban a *FOPNL* rs72773978 vizsgálatát 2005 és 2013 között diagnosztizált, 373 MM-ben szenvedő beteg esetében végeztük el. A polimorfizmus magyarországi allélfrekvenciájának meghatározásához a kontroll csoport 112 egészséges véradóból állt. A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus esetében 2007 és 2013 közötti időszakban diagnosztizált, 211 MM beteget vontunk be a vizsgálatba. A betegek diagnózisa és követése a Dél-pesti Centrumkórházban történt. A proteaszóma és *PSMB1* expresszió és funkciójának vizsgálatát 7 egészséges önkéntes egyén perifériás vérmintáján végeztük el.

3.1 Molekuláris genetikai vizsgálatok

Az *FOPNL* rs72773978, valamint a *PSMB1* rs12717 variánsok genotipizálása valós idejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel történt, LightCycler 480II (Roche) készüléken, genomiális DNS mintából.

3.2 Proteaszóma expresszió és funkció vizsgálata

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

20S proteaszóma mennyiségét, valamint a *PSMB1* expresszió vizsgálata FACSCanto II áramlási citométerrel történt. Proteaszóma funkció vizsgálat során a kimotripszin-szerű, a kaszpáz-szerű és a tripszin-szerű aktivitásokat a Proteasome Activity Fluorometric Assay Kit II (UBPBio) kittel határoztuk meg, a gyártó utasításainak megfelelően.

3.4 Fluorszccens in situ hibridizációs vizsgálat (FISH)

A vizsgálatok a Dél- Pesti Centrumkórház Citogenetikai Laboratóriumában történtek. A *PSMB1* vizsgálat során 211 betegből 194 esetében, míg a *FOPNL* csoportnál 373 betegből 346 esetében volt elérhető FISH eredmény.

4. Eredmények

4.1. FOPNL rs72773978 polimorfizmus

Az FOPNL rs72773978 vizsgálata során az MM betegcsoport minor allélfrekvenciája ($AF \pm 95\%CI$) $6,3 \pm 1,8\%$ nem különbözött az egészséges kontroll csoport ($6,3 \pm 3,2\%$) esetén meghatározottól. A homozigóta TT egyének alacsony száma miatt a további vizsgálatokat a domináns modell alkalmazásával végeztük: a minor variánst hordozó heterozigóta AT genotípusú és homozigóta TT betegcsoportokat összevontunk. Vizsgálataink során az alábbi klinikai jellemzőket vettük figyelembe: nem, életkor, ISS, citogenetikai eltérések, azonban egyik esetben sem találtunk különbséget a variáns allélhordozást illetően.

Vizsgálati csoportunk esetén a betegek nagy része ($n=241$, $64,6\%$) bortezomib bázisú terápiában részesült, míg a többi páciens ($n=132$, $35,4\%$) IMiD alapú kezelést kapott. A PI csoportban gyakoribb variáns allélhordozás volt megfigyelhető, mint a nem-PI csoportban ($15,4\%$ vs. $6,1\%$, $p=0,008$). További csoportosítás esetén a minor allél gyakorisága az eltérő terápiás protokollokban nem különbözött. A teljes csoportot figyelembe véve, a

terápiára adott válaszokat illetően nem volt különbség a vad típusú és az *FOPNL* variánst hordozók között, azonban a bortezomib alapú terápiás alcsoportban szignifikánsan több *FOPNL* hordozó ért el teljes remissziót (CR) a vad típusú betegekhez képest (66,7% vs. 47,7%; $p=0,047$).

A *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus progressziómentes (PFS) és összesített túlélésre (OS) gyakorolt hatását vizsgálva a teljes csoporton, azt tapasztaltuk, hogy a variáns allélhordozás nincs hatással sem a PFS, sem pedig az OS alakulására (PFS: $p=0,135$; OS: $p=0,328$). Mivel a polimorfizmus jelenléte statisztikai interakciót mutatott a bortezomib kezeléssel, mind a PFS és mind az OS-t illetően (PFS: $p=0,011$; OS: $p<0,001$), a polimorfizmus kimenetelt befolyásoló hatását a különböző kezelési alcsoportok esetén is megvizsgáltuk. Érdekes módon az irodalomban ismertetett kedvezőtlen hatása a variáns allélnak az alkalmazott kezeléstől függően megváltozott. A nem PI alapú terápiában részesülő betegeknél a minor allélhordozás kedvezőtlen PFS és OS-t eredményezett (PFS: $p=0,042$; OS:

$p=0,022$). Míg a PI alapú kezelést kapott betegek esetén, ellentétes tendencia volt megfigyelhető. A variáns allélt hordozóknál kedvezőbb OS volt kimutatható, PFS esetén nem volt eltérés (OS $p=0,048$; PFS: $p=0,082$). Multivariancia elemzéssel figyelembe véve az életkort, nemet, az ISS-t és az ASCT-t (autológ őssejt-transzplantáció) a nem PI kezelt betegcsoport esetén a *FOPNL rs72773978* hordozása független rizikófaktornak bizonyult az OS-t illetően (OS: $p=0,045$; HR: 2,69; 95%CI: 1,02-7,11; PFS: $p=0,33$; HR: 1,58; 95%CI: 0,63-3,98). A PI alapú terápiában részesülő betegek esetén ellentétes irányú tendencia volt megfigyelhető (OS: $p=0,09$; HR: 0,58; 95%CI: 0,31-1,09; PFS: $p=0,08$; HR: 0,69; 95%CI: 0,46-1,04).

4.2 *PSMB1 rs12717* polimorfizmus

A *PSMB1 rs12717* polimorfizmus minor allélfrekvenciája (AF: $37,7\pm 4,7\%$) nem különbözött az irodalomban leírtaktól (AF: $40,7\pm 7,0\%$). A betegcsoport vizsgált klinikai paraméterei esetében (életkor, nem, ISS, citogenetikai eltérések) nem volt eltérés megfigyelhető a különböző genotípusú csoportokat illetően.

A terápiát elemezve a bortezomib alapú kezelésben részesült csoportban (n=154, 72,9%) a variáns allélfrekvencia szignifikánsan alacsonyabb volt (55,8% vs. 71,9% p=0,05). A különböző kezelési protokollokat, valamint a kezelésre adott válaszokat illetően, nem volt különbség kimutatható az egyes genotípusú csoportok esetén. További vizsgálataink a túlélési végpontokra irányultak. A teljes betegcsoportot elemezve C/G és G/G genotípusú páciensek progresszió-mentes túlélése kedvezőtlenebb volt, míg az OS-t illetően nem különböztek az eltérő genotípusú csoportok (PFS: p=0,002; OS: p= 0,268). Ezt követően megvizsgáltuk az egyes alcsoportok (ISS, citogenetika, kezelés, ASCT) esetén, hogyan alakul a PFS és az OS. Az ISS csoportok esetén kedvezőtlenül befolyásolta a PFS-t a minor allélhordozás, ez a hatás megfigyelhető volt még standard rizikójú citogenetikai eltéréssel rendelkező betegcsoportot illetően, bortezomib kezelésnél, valamint ASCT esetén is. OS elemzésnél csak az ISS3-as csoportnál volt eltérés kimutatható. Multivariancia analízis során a teljes betegcsoporton, figyelembe véve a kort, ISS-t, FISH-t, bortezomib kezelést valamint az

ASCT-t, a G/G variáns allél hordozása független rizikófaktor volt a PFS esetén. Az OS elemzése során, a C/G és C/C genotípusú csoportok esetén volt szignifikáns különbség, mely a homozigóta genotípusokat illetően nem volt kimutatható.

A proteaszóma mennyiségi vizsgálata, a PSMB1 expresszió, valamint a funkcionális vizsgálat a rs12717 polimorfizmusra homozigóta C/C és G/G genotípusú egészséges egyének perifériás vérmintáiból történtek. A fehérvérsejtek, T-sejtek, B-sejtek, monocyták és granulociták esetén meghatározott proteaszóma mennyiségi és expressziós méréseket illetően nem volt eltérés megfigyelhető az egyes genotípusoknál. A proteaszóma 20S alegységének kimotripszin-szerű, kaspáz-szerű és tripszin-szerű proteolitikus aktivitása esetében a variáns allélt hordozó G/G egyének alacsonyabb aktivitással rendelkeztek. A bortezomib in vitro relatív gátló hatásában, a kimotripszin-szerű aktivitás esetén nem volt eltérés a különböző genotípusokat illetően ($IC_{50}G/G$: 0,146 vs. $IC_{50}C/C$: 0,150 μM). Csökkent tripszin-szerű és kaspáz-szerű proteolitikus aktivitás volt megfigyelhető a variáns allél

(G/G) esetén (tripszin-szerű: IC_{50} G/G: 44.4 vs. IC_{50} C/C: 462 μ M; kaszpáz-szerű: IC_{50} G/G: 2,05 vs. IC_{50} C/C: 6,07 μ M)

5. Következtetések

A *FOPNL* rs72773978 polimorfizmus myelomás betegcsoporton meghatározott allélfrekvenciája nem különbözött az irodalomban leírt eredményektől, valamint az általunk vizsgált egészséges csoporttól. A klinikai jellemzők vizsgálata során a variáns allélhordozás nem mutatott eltérést a vad típushoz képest. A kezelések elemzése során azonban, a bortezomib bázisú kezelésben részesülő betegek esetén a variáns allél hordozás gyakoribbnak bizonyult, mint az immunmoduláns alapú terápiában részesülő betegcsoportban.

A *FOPNL* rs72773978 eltérést mutatott az alkalmazott kezeléstől függően az MM betegcsoporton elemezve az összesített túlélést és a progressziómentes túlélést illetően. A minor allélhordozás kedvezőtlen hatása volt megfigyelhető a nem bortezomib alapú terápiás betegcsoport esetén mind a PFS-t, mind pedig az OS-t illetően. Bortezomib alapú kezelés esetén pedig ez a hatás megfordult és a variáns allél kedvezőbb OS-sel társult, PFS esetén pedig tendencia volt kimutatható.

Multivariancia analízis során a nem bortezomib kezelt csoportban, a *FOPNL* rs72773978 az OS-t meghatározó független rizikófaktornak bizonyult.

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

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

A *PSMB1* rs12717 minor allélje a teljes betegcsoportban kedvezőtlenebb PFS-sel társult ($p=0,002$), amely multivariancia analízissel is független rizikófaktornak bizonyult (PFS: $p<0,001$; HR: 2,293; 95%CI:1,458-3,604). Az OS-t nem befolyásolta a minor allél jelenléte.

A *PSMB1* rs12717 polimorfizmus funkcionális vizsgálata során egészséges C/C és G/G genotípusú

egyének mintáin, a proteaszómák mennyisége valamint PSMB1 expressziója nem különbözött. A minor allélt homozigóta formában hordozó egyéneknél alacsonyabb 20S proteaszóma kimotripszin, tripszin,- és a kaszpáz-szerű proteolitikus aktivitások voltak megfigyelhetőek. Bortezomib gátlás alatt csökkent IC_{50} értékeket igazoltak a tripszin,- és a kaszpáz-szerű aktivitások esetén a G/G genotípusú egyének mintáin. A kimotripszin-szerű aktivitás során nem volt megfigyelhető eltérés.

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

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

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

6.2 A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények

- Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Szilvasi A, Bors A, **Kiss KP**, Rajczy K, Inotai D, Torbagyai E, Lengyel L, Barta A, Gopcsa L, Tordai A,

Masszi T. Sex-specific survival difference in association with HLA-DRB1*04 following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *Hum Immunol.* 2018 Jan;79(1):13-19.

- Krahling T, Balassa K, **Kiss KP**, Bors A, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Remenyi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Co-occurrence of Myeloproliferative Neoplasms and Solid Tumors Is Attributed to a Synergism Between Cytoreductive Therapy and the Common TERT Polymorphism rs2736100. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan;25(1):98-104.

- Balassa K, Krahling T, Remenyi P, Batai A, Bors A, **Kiss KP**, Torbagyi E, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Varga G, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma.* 2017 Feb;58(2):391-398.

- Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Bors A, **Kiss KP**, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Reti M, Tordai A, Masszi T. The

potential role of HLA-DRB1*11 in the development and outcome of haematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Oct;50(10):1321-5.

- Inotai D, Szilvasi A, Benko S, Boros-Major A, Illes Z, Bors A, **Kiss KP**, Rajczy K, Gelle-Hossó A, Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tordai A. HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens.* 2015 Aug;86(2):115-21.

- Tordai A, Bors A, **Kiss KP**, Balassa K, Andrikovics H, Batai A, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Torbagyi E, Lengyel L, Barta A, Remenyi P, Masszi T. Donor KIR2DS1 reduces the risk of transplant related mortality in HLA-C2 positive young recipients with hematological malignancies treated by myeloablative conditioning. *PLoS One.* 2019 Jun 25;14(6):e0218945.