

Cirkuláló mikroRNS-ek mint potenciális minimális
maradék betegség biomarkerek gyermekkori akut
limfoblasztos leukémiában

Doktori tézisek

Rzepiel Andrea

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Erdélyi Dániel János, MD, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Gaál Zsuzsanna, MD, Ph.D., Csecsemő- és
gyermekgyógyász szakorvos

Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Rosivall László, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Szabó László, Ph.D., főiskolai tanár
Dr. Fogarasi András, D.Sc., egyetemi magántanár

Budapest
2020

Bevezetés

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) a hematopoetikus őssejtek klonális megbetegedése. Az ALL a leggyakoribb malignus megbetegedések gyerekkorban. Magyarországon évente 60-70 új esetet diagnosztizálnak. Az prekursor B-sejtes alcsoport (pre B-ALL) a leggyakoribb, mintegy 85%-ot tesz ki. A maradék 15% pedig a T-sejtes altípushoz tartozik. A betegségben jellemző sejtek a limfoblasztok, melyek a csontvelőben és vérben (az esetek többségében) is megtalálhatóak. A betegek kezelési protokollja országonként, régiónként eltérő. Hazánkban jelenleg az ALL IC-BFM 2009 protokoll szerint történt a betegek kezelése, amely a következő fázisokra osztható: indukció, korai intenzifikáció, konszolidáció, reindukció, késői reintenzifikáció és fenntartó kezelés. Az indukció, azaz az első hónap kezelésének célja a kezdeti daganatos sejttömeg nagy részének elpusztítása. A terápia teljes hossza 2 év, azonban a kezelés közé szüneteket is beiktatnak, ezzel teret engedve a csontvelő regenerációjának.

A túlélési mutatók az elmúlt évtizedek során folyamatos javulást mutatnak, az ötéves túlélés napjainkban eléri a 83%-ot hazánkban. A minimális maradékbetegség (MRD) monitorozása, az így mért korai terápiás válasz alapján történő stratifikáció és igen fontos tényezője a magas túlélésnek.

Minimális reziduális vagy maradék betegség alatt a malignus sejtek alacsony (5% alatti) szintjét értjük a kezelés elkezdése után teljes remisszióban, amelyet valamilyen érzékeny diagnosztikus eljárással ki lehet mutatni. Tradicionálisan a kezelésre adott választ mikroszkópos analízissel határozták meg a csontvelőben illetve a vérben. Azonban ez a módszer nem elég szenzitív. Napjainkban az áramlási citometriával (flow citometria, FC) és PCR eljárással végzik a minimális maradék betegség vizsgálatát csontvelő mintákon. Az előbbi érzékenysége kb. 10^{-4} , míg utóbbié kb. 10^{-5} .

A mikroRNS-ek rövid, ~22 nukleotid hosszúságú, nem kódoló RNS-ek. A legtöbb mikroRNS a DNS szekvenciáról íródik át primary mikroRNS-é (pri-miR) majd precursor-mikroRNS-é (pre-miR) és végül érett mikroRNS-é. Jellemzően a target mRNS

3'UTR régiójához kapcsolódva annak expresszióját szuppresszálja. Azonban előfordul, hogy az 5' régióhoz, kódoló szekvenciához, vagy éppen gén promóterhez kapcsolódik.

A humán genom 1-5%-t teszik ki a mikroRNS-ek és a fehérje kódoló gének 30-60%-át szabályozzák. Az irodalomban 24 000 feletti a humán rövid RNS szekvenciák száma, ebből azonban az érett mikroRNS-ek száma 2300-ra tehető.

A mikroRNS-ek metabolikus és jelátviteli útvonalakat is befolyásolhatnak, a sejtproliferáció, differenciáció és a túlélés szabályozásával. Számos tumoros állapotban ismert a megváltozott mikroRNS expressziós profil. Expressziójukra jellemző a sejt, illetve szövetspecifitás, így megítélésük, miszerint onkogén vagy tumor szuppresszor egy adott mikroRNS, igen nehézkes. Továbbá nem tudjuk, hogy a megváltozott mikroRNS expresszió a malignus állapot direkt kiváltója vagy indirekt következménye. Nehezíti a helyzetet az is, hogy egy mikroRNS-nek több targete is lehet. Tehát egy adott mikroRNS bizonyos környezetben onkogén, míg máshol tumor szuppresszor funkciójú.

A mikroRNS-ek megtalálhatóak extracellulárisan is. Kimutathatóak a vérplazmában és szérumban, cerebrospinális folyadékban, vizeletben, nyálban, tejben, könnyben és egyéb testfolyadékokban is. Az extracelluláris mikroRNS-ek igen stabilak, szobahőmérsékleten több napig tarthatóak, különböző szélsőséges kondícióknak kitéve sem degradálódnak. A mikroRNS-ek extracelluláris vezikulákban vagy proteinekkal együtt, leginkább AGO2-vel koplexet alkotva találhatóak a testfolyadékokban.

Az egészséges és malignus hematopoézist vizsgálva kiderült, hogy a mikroRNS-eknek igen fontos szerepük van a folyamat szabályozásában az érési folyamat egésze során.

Az extracelluláris vezikulák (EV) kettős foszfolipid membránnal körülvett képletek. Három fő csoportra oszthatóak méretük és keletkezésük alapján: exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek.

Az extracelluláris vezikulák részt vesznek a sejtek közötti kommunikációban, az angiogenezisben, intracelluláris komponensek eltávolításában, a szervezet immunválaszában és a véralvadásban is. Működésük lehetővé teszi a fehérjék, RNS-, DNS-sejtek közötti kicserélődését. Mind az egészséges, mind pedig a malignus sejtek termelnek vezikulákat, amelyeket számos testfolyadékból sikerült már kimutatni.

Az exoszómák legjellemzőbb forrásai az immunsejtek és malignus sejtek. Az exoszómák képesek becsomagolni bizonyos mikroRNS-eket, a véráramban megtartani azok

integritását (megvédve őket a RNázok hasításától) így azok a sejtek, melyekből származnak, még a véráramban is azonosíthatóak.

Célkitűzések

Munkám során az alábbiak céljaim voltak:

- Szakirodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek extracelluláris expressziójának karakterizálása gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás betegek perifériás vérében, csontvelőjében és gerincvelői folyadék mintáiban.
- A vizsgált mikroRNS-ek vérplazmában mért expressziós változásának értékelése, mint minimális maradék betegség biomarker.

Módszerek

A Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekgyógyászati Klinikán és a Heim Pál Gyermekkórház Onko-hematológiai osztályán diagnosztizált és kezelt akut limfoblasztos leukémiás gyermekek csontvelői, perifériás vér és gerincvelői folyadék (CSF) mintáit vizsgáltam a kutatásom során. A vér (3,5 ml) és csontvelői (1 ml) mintákat citrátos csőbe, míg a gerincvelői folyadék (~1 ml) mintákat natív csövekbe gyűjtöttük. Az előbbi két mintaféleség esetén a levételtől számított 2 órán belül centrifugálással vérlemezkementes plazma (PFP) mintát állítottunk elő és tároltuk -80°C -on. ALL-IC BFM 2009 protokoll szerinti indukciós terápia alatt az alábbi időpontokban gyűjtünk perifériás vérmintát: diagnóziskor, 8, 9, 15, 29, 30, 33. nap. Csontvelői és gerincevlői folyadék (CSF) mintát pedig a diagnóziskorin felül a protokoll szerinti 15. és 33. napon.

Kutatásom során 28 de novo és 5 relabált, továbbá 2 központi idegrendszer érintett (KIR+) prekursor B-sejtes ALL-es beteg mintáit vizsgáltam. Az 5 relabált beteg első relapszusa alatt történt a mintagyűjtés. A betegek 1-18 éves kor közöttiek voltak. Az első vonalban kezelt ALL-es betegek három alcsoportját vontuk be a vizsgálatokba citogenetikai jellemzőik alapján: hiperdiploid (kromoszómáik száma 47 vagy több), t(12;21)(p13;q22) transzlokációs és normál kariotípus alcsoportba. Ez utóbbiba azok a betegek kerültek, akinél nem találtak citogenetikai abnormalitást (akár sikeres volt a kariotipizálás, akár nem), illetve a FISH vizsgálat során (melynél a leggyakoribb ALL-ben jellemző eltéréseket vizsgálják) sem találtak eltérést és diploidnak írta le az áramlási citometriai vizsgálat a DNS indexük alapján. Továbbá 10 gyermek kontroll perifériás vérmintáját is vizsgáltam.

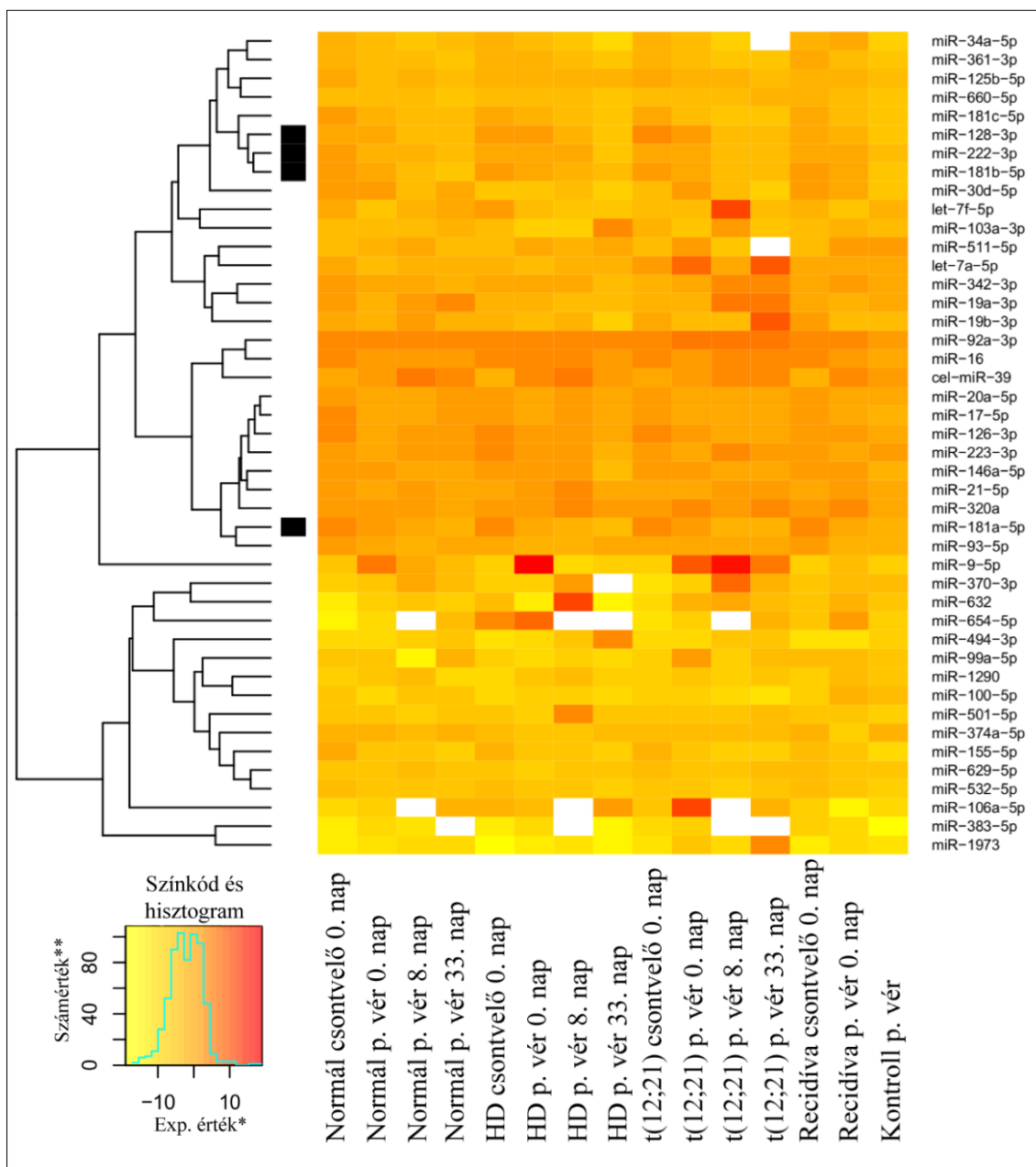
A PFP mintákból izolált RNS-t cDNS-é írtam át és vizsgáltam egyedi TaqMan Low Density Array (TLDA) kártyákon 46 előre kiválasztott mikroRNS expresszióját. A kiválasztás során azokat a mikroRNS-eket válogattam ki, amelyek magas intracelluláris expressziót mutatattak korábbi kutatások során és legalább két forrásban leírták potenciális szerepüket ALL-ben. A validáláshoz és a bővített populáció vizsgálatához qPCR metodikát alkalmaztam. Az exoszóma gazdag frakciót (EEF) ultracentrifugálással

nyertem (Beckman Coulter Optima XP) majd az RNS izolálást követően a korábbiakkal megegyezően jártam el és vizsgáltam qPCR-rel a mikroRNS expressziót.

Az elemzést R statisztikai szoftver segítségével Dr. Gézsi András végezte.

Eredmények

A felfedező populáció vizsgálata során 46 mikroRNS expresszióját mértük egyedi TLDA kártyákon ALL-es betegek perifériás vér és csontvelői vérlemezke-mentesített plazma továbbá gerincvelői folyadék és egészséges kontroll perifériás vér vérlemezke-mentesített plazma mintáiban (1. ábra). Nem találtunk szignifikáns korrelációt a vizsgált perifériás vér és csontvelő minták mikroRNS mintázata között.



1. ábra. TaqMan Low Density kártyán mért normalizált log₂ transzformált expressziós szintek perifériás vér és csontvelői PFP-ben ALL alcsoportokban és kontroll betegekben. A sárga szín alulexpresszálságot, míg a piros felülexpresszálságot jelent a normalizáló mikroRNS-hez képest. A bal oldalon található fekete jelölések a qPCR vizsgálatra kiválasztott mikroRNS-eket jelölik. *log₂ transzformált expressziós érték **hisztogram magassága

Összesen 21 mikroRNS esetén mutattunk ki szignifikáns eltérést a perifériás vér vérelemzke-mentesített plazma mikroRNS expressziója de novo és relabált betegek esetén egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A relabált betegeket kivonva az elemzésből (kis elemszám és rövid követési idő) 19 mikroRNS esetén mutattunk ki szignifikáns különbséget. 18 mikroRNS expressziója szignifikánsabb magasabb, míg egy mikroRNS-é szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult.

Vizsgáltuk a három kariotípus csoportot is külön, egészséges kontroll perifériás vérhez hasonlítva. Öt mikroRNS egységesen mindhárom csoportba (hiperdiploid, t(12;21) és normál kariotípus csoport) felülexpresszált volt: miR-128-3p, miR-146a-5p, miR-181b-5p, miR-222-3p és a miR-532-5p. Nem találtuk egyedi mikroRNS mintázatot egyik alcsoportban sem.

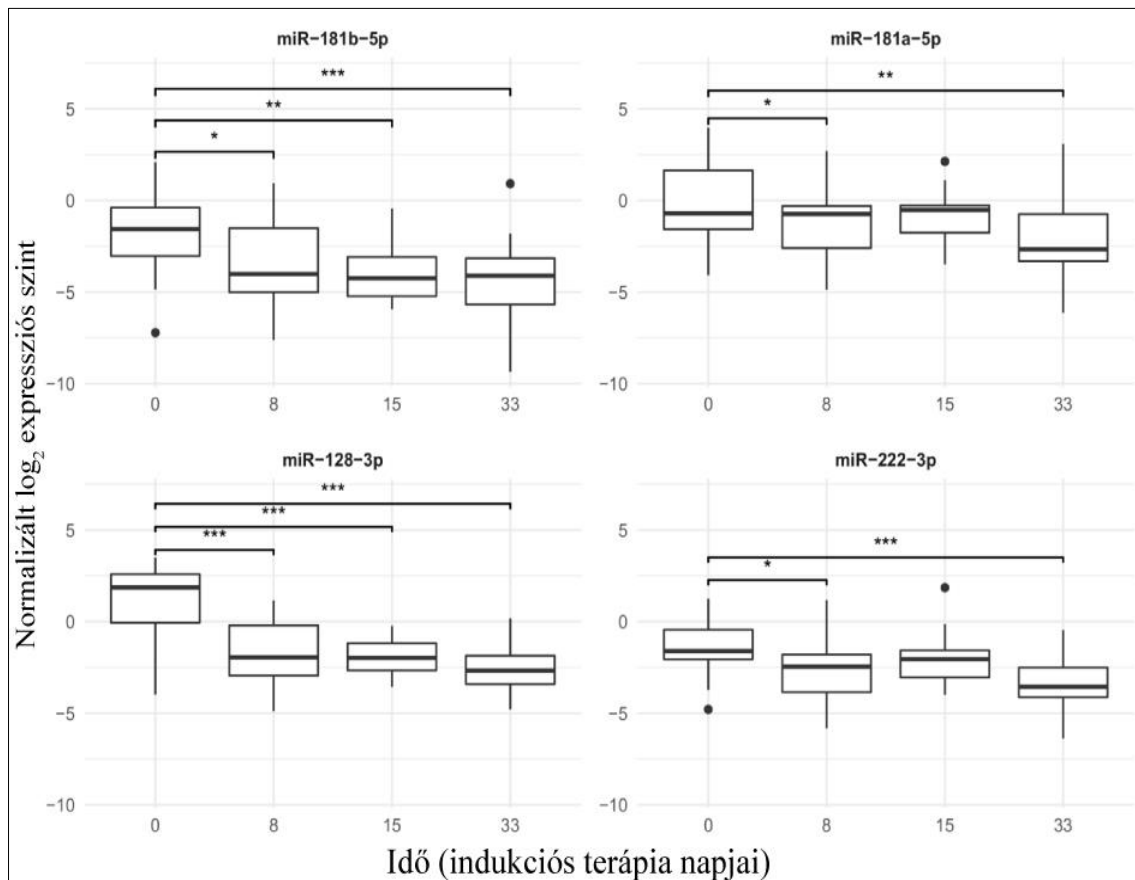
Az összes de novo ALL-es perifériás vér vérelemzke-mentesített plazmáját vizsgálva a diagnózis és a kezelés 33. napja között az alábbi 4 mikroRNS expressziója volt szignifikánsan magasabb a kontrollokhöz viszonyítva: miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-222-3p. Így a bővített populáción qPCR-rel ezt a 4 mikroRNS-t vizsgáltuk tovább.

A qPCR-es mérés során a de novo diagnóziskori ALL perifériás vér mikroRNS expresszióját vizsgáltuk egészséges kontrollokkal összehasonlítva (1. táblázat)

1. táblázat. Diagnóziskor de novo ALL perifériás vér PFP mikroRNS expressziója egészséges kontrollokhöz viszonyítva. NS: nem szignifikáns

Alcsoportok	miR-128-3p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-181a-5p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-181b-5p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-222-3p log ₂ FC (adj. p érték)
Hiperdiploid kariotípus	3,39 (7,05*10 ⁻⁴)	NS	NS	2,09 (4,06*10 ⁻²)
t(12;21) kariotípus	5,93 (9,59*10 ⁻¹⁰)	2,56 (1,38*10 ⁻²)	3,84 (2,26*10 ⁻⁴)	3,34 (2,21*10 ⁻⁴)
Normál kariotípus	4,23 (1,78*10 ⁻⁵)	3,45 (5,35*10 ⁻⁴)	4,31 (4,73*10 ⁻⁵)	2,63 (4,76*10 ⁻³)
Teljes ALL csoport	4,52 (3,48*10 ⁻⁹)	2,46 (2,11*10 ⁻³)	3,4 6(4,73*10 ⁻⁵)	2,68 (2,15*10 ⁻⁴)

A bővített populáció perifériás vér vérelemezke-mentesített plazma mintáit qPCR-rel vizsgáltuk 4 mintavételi időpontban az indukciós terápia során. A kezelés megkezdése után mindegyik mikroRNS szintje szignifikáns csökkenést mutatott a 8. illetve a 33. napra (2. ábra). Azonban folyamatos csökkenést nem detektáltunk a vizsgált időpontokban.



2. ábra. Az indukció terápia alatti mikroRNS szintek perifériás vér PFP-ben mérve.

A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges vonal a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3+1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket, a boxok feletti vonalak pedig a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p < 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

A teljes ALL csoportra jellemző perifériás vér vérlemezke-mentesített plazma mikroRNS expressziót és annak változásait és a 15. napi csontvelői áramlási citometriás MRD-t illetve egyéb prognosztikai faktorokat korreláltattuk. A miR-128-3p és a miR-222-3p esetén a 0-8. nap közti expresszió csökkenés korrelált a 15. napi áramlási citometriával mért csontvelői MRD-vel (adj. $p: 2,71 \cdot 10^{-4}$ és $3,00 \cdot 10^{-3}$). A másik két vizsgált mikroRNS esetében, illetve 0-15. nap vonatkozásában nem volt szignifikáns a korreláció.

Annak vizsgálatára, hogy az adott mikroRNS expressziós változás mennyire pontosan tudja megjósolni, hogy a beteg alacsony (15. napi FC MRD<1%) vagy magas (MRD>1%) MRD csoportba tartozik, ROC analízist végeztünk. A miR-128-3p (AUC=0,91) és a miR-222-3p (AUC=0,79) esetén is magas AUC értékeket kaptunk.

Exoszóma gazdag frakcióban is vizsgáltuk a miR-128-3p és a miR-222-3p expresszióját az indukciós terápia alatt 4 időpontban. A miR-128-3p expressziója szignifikánsan csökkent a 15. és 33. napra, míg a 8. napra jelentős expresszió csökkenést nem tudtunk kimutatni. A miR-222-3p esetén egyirányú változást nem detektáltunk.

A 15. napi áramlási citometriával mért csontvelői MRD-vel és további prognosztikai faktorokkal korreláltatva azt találtuk, hogy a miR-128-3p esetén a diagnóziskorítól a 8. a 15. és a 33. napra való expresszió változás korrelált a 15. napi csontvelő áramlási citometriával mért MRD-vel. A miR-222-3p esetén szignifikáns korrelációt nem tudtunk kimutatni.

Következtetések

Kutatásom során akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek csontvelői és perifériás vér vértörzse-mentesített plazmájából és gerincvelői folyadék mintáiból egyedi TaqMan Low Density Array kártyákon azonosítottuk számos mikroRNS felülextípusát egészséges kontroll gyermekek perifériás vér vértörzse-mentesített plazmájához viszonyítva.

Valós idejű qPCR metodikát használva kibővített populáción perifériás vér vértörzse-mentesített plazma mintákat vizsgálva validáltuk a korábbi mérést és statisztikai elemzést végeztünk az indukciós terápia alatti mikroRNS expresszió és annak változása tekintetében. Ennek eredményeképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy mikroRNS expressziója a diagnóziskori mintában detektálhoz képest a kezelés 8. napjára csökkenést mutatott, azonban a további időpontokra (15. és 33. nap) nem volt további szignifikáns csökkenés.

Megállapítható a vizsgálataink alapján, hogy a normalizált expressziós szint változás jobb lehetséges MRD biomarker mint az expressziós szint maga.

A miR-128-3p és a miR-222-3p diagnóziskori és 8. napi perifériás vér vértörzse-mentesített mintákban mért expressziós változás korrelált a 15. napi áramlási citometriával mért MRD-vel.

Az exoszóma-gazdag frakció vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a miR-128-3p a diagnózis és 8. nap, a diagnózis és a 15. nap illetve a diagnózis és a 33. nap közti expressziós változása korrelált a 15. napi áramlási citometriával mért csontvelői MRD-vel, így tehát megerősítette a miR-128-3p lehetséges biomarker szerepét.

A kutatás eredményeképpen elmondható, hogy a perifériás vér vértörzse-mentesített plazma miR-128-3p és miR-222-3p expressziós vizsgálata nem bizonyult szenzitívebbnek, mint a jelenleg hazánkban használt áramlási citometriás minimális maradék betegség mérési módszer.

Saját publikációk jegyzéke

Rzepiel Andrea, Nóra Kutszegi, András Gézsi, Judit C. Sági, Bálint Egyed, György Péter, Henriett Butz, Gábor Nyíró, Judit Müller, Gábor T. Kovács, Csaba Szalai, Ágnes F. Semsei, Dániel J. Erdélyi: Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of translational medicine* 17:372. 2019.

IF: 4,124

Rzepiel Andrea, Nóra Kutszegi, Judit C. Sági, Andrea Kelemen, Krisztina Palóczy, Ágnes F. Semsei, Edit Buzás, Dániel J. Erdélyi: Extracelluláris vesiculák és hematológiai malignitásokban játszott szerepük. *Orvosi Hetilap* 157 (35): 1379-1384. 2016.

IF: 0,349

Bálint Egyed, Nóra Kutszegi, Judit C. Sági, András Gézsi, **Andrea Rzepiel**, Tamás Visnovitz, Péter Lőrincz, Judit Müller, Marianna Zombori, Csaba Szalai, Dániel J. Erdélyi, Gábor T. Kovács, Ágnes F. Semsei: MicroRNA-181a as novel liquid biopsy marker of central nervous system involvement in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of translational medicine* 18:250. 2020.

IF: 4,124

Értekezés témájában megjelent közlemények

Egyed B., G. T. Kovács, N. B. Kutszegi, **A. Rzepiel**, J. Cs. Sági, D. J. Erdélyi, J. Müller, A. F. Semsei: Új és hagyományos irányok a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia biológiájában és ellátásában. *Orvosi Hetilap* 159 (20): 786-797. 2018.

IF: 0,564

Sági J. C., B. Egyed, A. Kelemen, N. Kutszegi, M. Hegyi, A. Gézsi, M. A. Herlitschke, **A. Rzepiel**, L. E. Fodor, G. Ottóffy, G. T. Kovács, D. J. Erdélyi, Cs. Szalai, A. F. Semsei: Variations in *ABCC2*, *NQO1* and *CYP3A5* genes might influence the risk of cardiotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia and osteosarcoma. *BMC Cancer* 18(1):704. 2018.

IF: 2,933

Egyéb közlemények

Laczikó D., E. Répási, **A. Rzepiel**, E. Kerekes, K. Shenker-Horváth, A. Koller, G. Elbert, Zs. B. Nagy: A vérnyomást befolyásoló genetikai tényezők diagnosztikája, és a magas vérnyomás genetikai rizikófaktora. *Hypertonia és Nephrologia* 19(6): 252-6. 2015.

Kerekes É., K. Shenker-Horváth, E. Répási, V. Szokolai, **A. Rzepiel**, A. Koller, Zs. B. Nagy: Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) génváltozatainak sportélettani vonatkozásai és hatása a magas vérnyomásra. *Új Diéta* 5: 7-9. 2015.

Dinnyés A., **A. Rzepiel**, V. Vass: Orvosi Nobel-díj 2012. Újraprogramozott sejtjeink. *Temészet világa* 144(2): 50-53. 2013.

Rzepiel A., Zs. Bíró, P. Lehotzky, L. Ózsvári, M. Horvai-Szabó, Z. B. Nagy: Házimacska genombankjának kialakítása és gyakorlati jelentősége a Maine Coon fajta modelljén keresztül. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135: 543-548. 2013.

IF: 0,185

Nagy Zs. B., **A. Rzepiel**, Á. Szabára, M. Heltai, S. Csányi, P. Lehotzky, L. Ózsvári: Az aranyakál magyarországi helyzete, genetikai térképezésének fontossága és felhasználási lehetőségei. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135: 149-158. 2013.

IF: 0,185

Rzepiel A., M. Horvai-Szabó, Sz. Monoki, L. Ózsvári, P. Lehotzky, Zs. B. Nagy: A hazai komondorállomány DNS-biobankjának létrehozása és felhasználási területei. *Magyar Állatorvosok Lapja* 134: 620–627. 2012.

IF: 0,146