

A krónikus limfocitás leukémia genetikai háttere az újgenerációs szekvenálás korszakában

MAROSVÁRI DÓRA¹, ALPÁR DONÁT¹, KIRÁLY PÉTER ATTILA¹, RAJNAI HAJNALKA¹, REINIGER LILLA², BÖDÖR CSABA¹

¹MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,

²MTA-SE NAP, Agyi Áttét Kutatócsoport, Magyar Tudományos Akadémia, Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Bődör Csaba, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Üllői út 26., 1085 Budapest, Tel.: 0036-1-215-7300/54462, e-mail: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2016. január 6.

Elfogadva:

2016. február 6.

A krónikus limfocitás leukémia (CLL) a fejlett országokban a leggyakoribb érett B-sejtes non-Hodgkin-limfóma. Az újgenerációs szekvenálás megjelenésével az elmúlt években exponenciálisan növekedtek ismereteink a betegség kialakulásáról és progressziójáról. A teljes genom és exom vizsgálata során nagyfokú betegek közötti genetikai heterogenitás igazolódott. A legkülönbözőbb jelátviteli utakhoz tartozó CLL driver géneket azonosítottak, melyeknek prognosztikai és terápiás szerepük lehet. Csupán néhány gént írtak le, melyek az esetek legalább 15-20%-ában hordoztak mutációt, viszont számos alacsony frekvenciával mutálódott gént és nagyfokú betegen belüli genetikai heterogenitást figyeltek meg. A terápiaindukált klonális evolúció jelenségét is kimutatták a betegség lefolyása során, ami szerepet játszhat a kemorezisztencia kialakulásában. A CLL genetikai alapjainak alaposabb megismerésével lehetőség nyílik a betegek pontosabb rizikóbecslésére és az új terápiás lehetőségek hatékonyabb alkalmazására. Magyar Onkológia 60:118–125, 2016

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma in the Western countries. The recent next-generation sequencing (NGS) studies lead to an exponential increase in our knowledge of the pathogenesis and progression of CLL. Whole genome and exome sequencing studies revealed a remarkable inter- and intra-patient genetic heterogeneity with a significant therapy-induced clonal evolution in the majority of the patients. Driver mutations were identified in components of various signalling pathways and cellular processes with notable prognostic and therapeutic relevance. Interestingly, these studies revealed only a few genes mutated in at least 15-20% of the patients with a larger number of genes mutated in a smaller proportion of patients. This improved understanding of the genomic landscape of CLL has opened new avenues for a more precise patient stratification and rational application of novel, more effective targeted therapies.

Kulcsszavak: krónikus limfocitás leukémia, újgenerációs szekvenálás, driver mutációk, klonális evolúció

Marosvári D, Alpár D, Király PA, Rajnai H, Reiniger L, Bődör C. The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Hungarian Oncology* 60:118–125, 2016

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, next-generation sequencing, driver mutations, clonal evolution

BEVEZETÉS

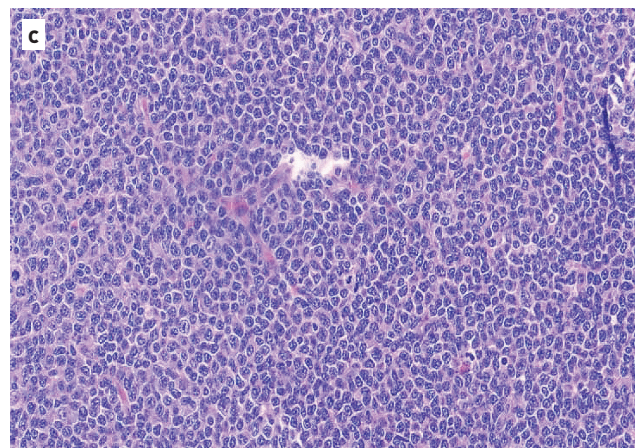
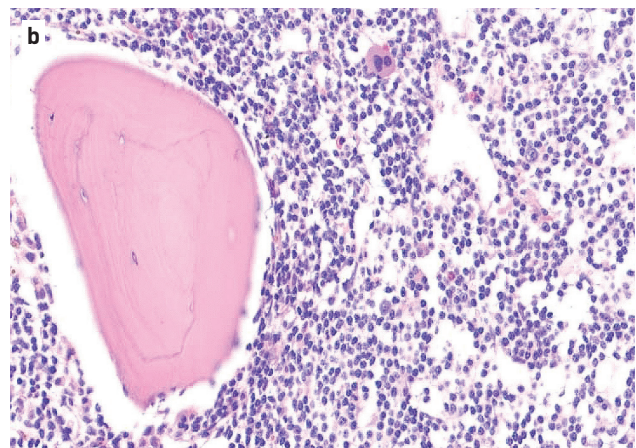
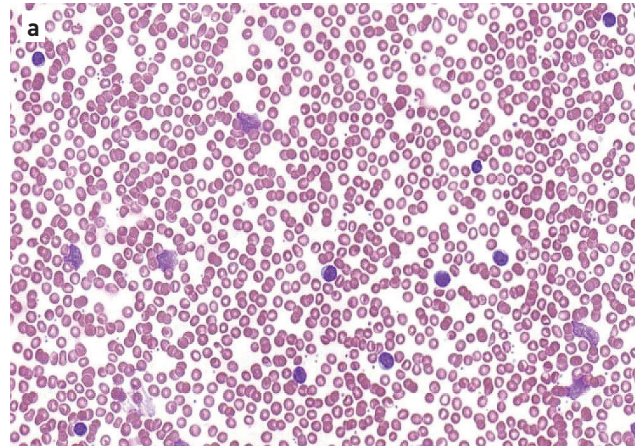
A krónikus limfocitás leukémia (CLL) a WHO-beosztás szerint az érett B-sejtes non-Hodgkin-limfómák közé tartozik, a leggyakoribb felnőttkori leukémia a nyugati országokban. A betegség incidenciája 2–6/100 000 fő, a betegek átlagéletkora a diagnóziskor 71 év. A betegséget aberráns CD5-expressziójú, CD19, CD20 és CD23 érett B-sejt markereket hordozó malignus B-limfociták felszaporodása jellemzi a perifériás vérben, a csontvelőben, a nyirokcsomókban és a lépben [1] (1. ábra).

PROGNOSZTIKAI MARKEREK CLL-BEN

A CLL első prognosztikai klasszifikációi az 1970-es évek végén bevezetett Rai- és Binet-stádium-osztályozások voltak, melyek főként a klinikai tulajdonságokon (hemoglobinszint, trombocitaszám, illetve a megnagyobbodott nyirokcsomók, lép, máj jelenléte) alapultak [2, 3]. Bár ezek a klasszikus prognosztikai osztályozások a mai napig használatosak, számos új marker segíti a betegség kimenetelének minél pontosabb meghatározását. Kedvezőtlen prognózisra utal a β_2 -mikroglobulin és a timidinkináz emelkedett szérumszintje [4], illetve a CD38 [5], CD49a [6] és a ZAP70 [7] felszíni fehérjék fokozott expressziója.

A CLL-es betegek közel 80%-a hordoz valamilyen kromoszómaaberrációt, melyek közül a 13q, a 11q és a 17p deléciójának, valamint a 12-es triszómiájának (tri12) van bizonyítottan jelentős prognosztikai szerepe [8]. A CLL-es betegek 55%-ában megtalálható a del(13q) kromoszómaeltérés; e deléciót hordozó betegek kórlefolyása a legkedvezőbb [8, 9]. A tri(12) az esetek 16%-ában van jelen, mely kedvező prognózissal társul [8]. A del(11q) a diagnóziskor az esetek 18%-ában azonosítható [8]. A del(11q) eltérést gyorsabb betegségprogresszió és szignifikánsan rövidebb túlélés jellemzi a normális kariotípushoz képest [10]. A del(17p) az esetek kevesebb mint 10%-ában figyelhető meg, ez az eltérés jár a legrosszabb prognózissal és a legrövidebb túléléssel [8].

Már a 90-es évek elején leírták a 17p régióban található *TP53* gén mutációit CLL-ben. Megfigyelték a *TP53*-mutációk összefüggését a kemorefrakteritással és a progresszív betegségelfolyással [11]. Dohner és munkatársai vizsgálataikban kimutatták, hogy a teljes *TP53* gént tartalmazó 17p kromoszómaregió deléciója szignifikánsan rövidebb túléléssel jár, mint a normális kariotípus vagy az egyéb citogenetikai eltérések [8]. Ezek után a *TP53*-mutációk vizsgálata háttérbe szorult, mivel a 17p-deléciók FISH-sel történő vizsgálatát ezzel egyenértékűnek vélték [12, 13]. A *TP53*-mutációk akkor kerültek újra látótérbe, amikor több tanulmányban kimutatták a mutációk jelenlétét intakt 17p kromoszóma mellett is [14, 15]. Az összes *TP53*-eltérés kb. 30%-ában fordulnak elő mutációk kromoszómadeléció nélkül, míg kb. 10%-ban detektálható csak 17p-deléció [12]. A del(17p) a diagnóziskor kevesebb mint 5%-ban van jelen, azonban terápia hatására az eltérés előfordulása nő, és a kemorefrakter betegek akár 50%-ában is megtalálható [12]. Mindezeket figyelembe



1. ÁBRA. Krónikus limfocitás leukémia citológiai és hisztológiai megjelenése. a) Perifériás vérkenet, benne abszolút limfocitózis [5-500 G/L] azonosítható. Gyakran láthatóak a mechanikailag károsodott limfociták maradványai (ún. Gumprecht-rögök) (May-Grünwald-Giemsa-festés). b) Csontbiopszia; a csontvelőben diffúz infiltráció látható, mely a normális vérképzést teljesen kiszorítja a velőűrkérből (HE). c) Nyirokcsomó, állományát diffúzan kis neoplasztikus limfoid sejtek infiltrálják. Az infiltrátumban világosabban festődő területek, ún. pszeudofollikulusok, más néven proliferációs centrumok azonosíthatók. A pszeudofollikulusokban proliferáló limfociták, immunoblasztok és paraimmunoblasztok láthatók (HE)

véve, a 2012-es ERIC (European Research Initiative on CLL) ajánlás szerint a klinikai gyakorlatban mind a 17p-deléció, mind a *TP53*-mutációk vizsgálata szükséges e kedvezőtlen prognózisú betegcsoport pontos azonosításának céljából, bármilyen terápia elkezdése előtt. A *TP53*-mutációk vizsgálatára alkalmas módszer a gén 4-9-es exonjainak direkt Sanger-szekvenálása [16]. Ez a vizsgálat az ERIC ajánlásának megfelelően intézetünkben elérhető.

Az immunglobulin nehézlánc variábilis (*IGHV*) régiójának mutációs státusza alapján két prognosztikai csoportot különböztethetünk meg. A CLL-esetek közel 60%-ában az *IGHV* régió szomatikus hipermutáción (SHM) megy keresztül a nyirokcsomó centrum germinativumában. E mutált CLL-esetek (mCLL) kedvezőbb prognózissal bírnak, míg a nem mutált CLL- (nmCLL) esetek általában agresszívebb kórlefolymást mutatnak, a betegség kimenetele rosszabb [5, 17, 18]. A jó, illetve a rossz prognózisú citogenetikai eltérések gyakran korrelálnak az *IGHV* mutációs státusszal. A legtöbb betegnél, aki 13q-deléciót hordoz, az *IGHV* mutált, betegségük indolens lefolyást mutat. Ezzel szemben a betegek nagy része, akikben nagy rizikójú citogenetikai eltérés, pl. del(17p) azonosítható, a rosszabb prognózisú, nem mutált *IGHV* csoportba tartoznak [8].

A CLL-GENOM FELTÉRKÉPEZÉSE

Az újgenerációs szekvenálás („next generation sequencing”, NGS) megjelenése az elmúlt öt évben exponenciálisan növelte az ismereteinket a CLL molekuláris hátteréről. Az NGS-technikák és a bioinformatika fejlődésével számos új, és esetenként meglepő driver gént azonosítottak, melyek prognosztikus szerepük mellett terápiás célpontok is lehetnek [19, 20]. A teljes genom és exom szekvenálása („whole genome/exome sequencing”, WGS/WES) segítségével lehetőség nyílt tumoros és hozzátartozó normális szövetek összehasonlítására, ezáltal jobban megismerhettük a CLL mutációs profilját [20]. Az elmúlt években számos munkacsoport végzett NGS-vizsgálatokat, e közlemények főbb adatait az 1. táblázat, az azonosított géneket a 2. táblázat tartalmazza.

Az első NGS-alapú vizsgálatban teljesgenom-szekvenálást végeztek 4 CLL-ben szenvedő beteg mintáján (2 mCLL, 2 nmCLL). Puente és munkatársai négy gén (*NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1* és *KLHL6*) visszatérő mutációit azonosították, további 169 CLL-es minta célzott szekvenálása során [21]. E gének közül korábbi vizsgálatokban csak a *NOTCH1* mutációjának szerepe merült fel CLL-ben [22]. Ez a munkacsoport egy későbbi vizsgálatában 105 CLL-es beteg mintáját vizsgálta WES-sel. A korábban már azonosított génmutációk mellett az *SF3B1*, a *POT1*, a *CHD2* és az *LRP1B* gyakori eltéréseit találták. E gének közül az *SF3B1* szomatikus mutációit az esetek közel 10%-ában azonosították. Továbbá, célzott szekvenálással vizsgáltak 156 non-Hodgkin-limfómás beteget, mely során egy esetben sem találtak *SF3B1*-mutációt. Eredményük arra enged következtetni, hogy az *SF3B1*-mutáció a limfoid megbetegedések között CLL-re specifikus lehet [23].

Egy további tanulmányban Wang és munkatársai 88 CLL-es mintán teljesexom-, míg 3 mintán teljesgenom-szekvenálást végeztek. Kilenc gén (*TP53*, *SF3B1*, *MYD88*, *ATM*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *ZMYM3*, *DDX3X* és *MAPK1*) nem szinonim mutációit azonosították. A talált mutációk előfordulását citogenetikai eltérésekkel összevetve megfigyelték, hogy a *TP53*-mutációk többsége együtt járt 17p-delécióval, ezzel a p53 homozigóta inaktivációját okozva. A mutációk és a citogenetikai eltérések együttes előfordulását tovább vizsgálva, az *ATM*-mutációk egy részét 11q-deléciót hordozó esetekben figyelték meg. Meglepő módon a del(11q) esetek közel 40%-ában *SF3B1*-mutációt azonosítottak. Két olyan esetet is találtak, ahol az *SF3B1*-mutáció intakt 11q kromoszóma mellett volt megfigyelhető, ugyanakkor ezekben az esetekben az *ATM* heterozigóta mutációját is azonosították. Továbbá megfigyelték, hogy a *NOTCH1* és az *FBXW7* gént érintő mutációk tri(12)-vel jártak együtt. Az összes *MYD88*-mutáció heterozigóta 13q-delécióval együtt fordult elő [24]. Ezek az eredmények arra hívták fel a figyelmet, hogy a különböző géneket érintő mutációk esetében megfigyelhetőek bizonyos preferált kombinációk, amelyek a betegség prognózisára is hatással lehetnek.

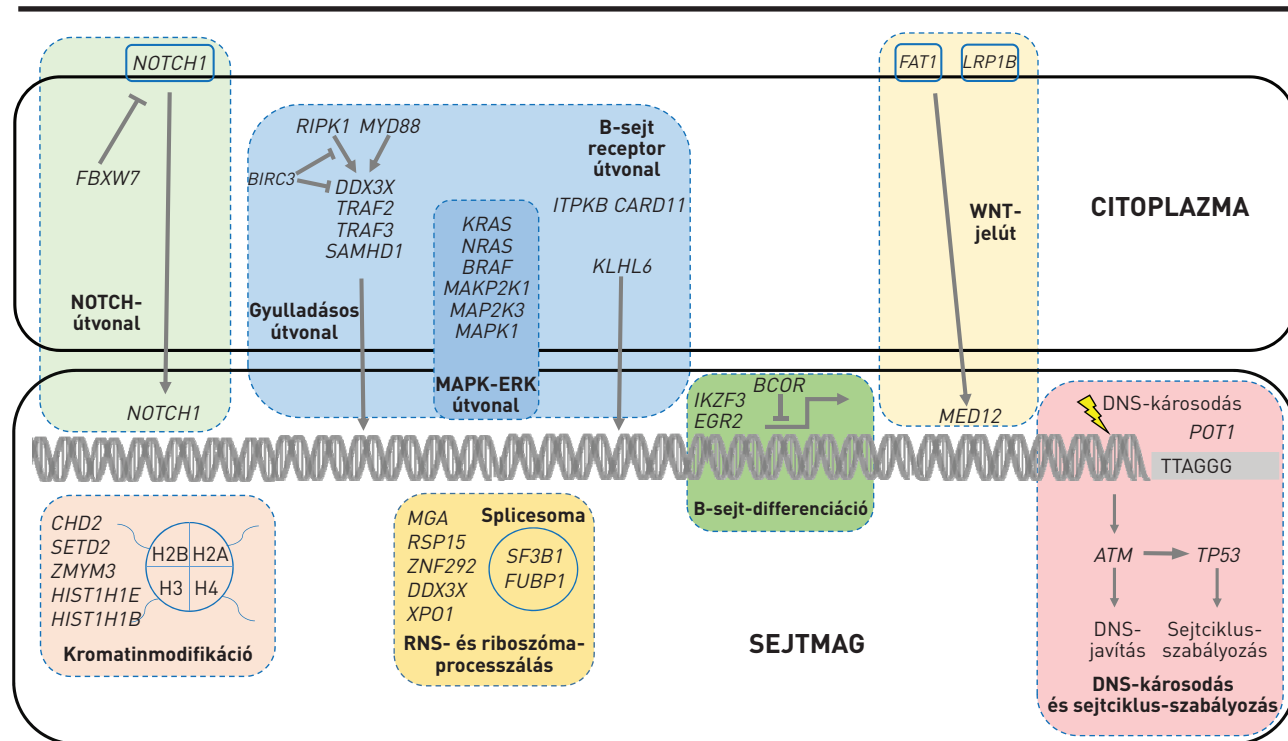
1. TÁBLÁZAT. A különböző NGS-alapú CLL-tanulmányok összefoglalása

VIZSGÁLAT	BETEGEK SZÁMA	MÓDSZER	LEGFONTOSABB GÉNEK	REFERENCIA
Puente 2011	4	WGS	4 gén, <i>MYD88</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>KHL6</i> , <i>XPO1</i>	21
Wang 2011	88+3	WES, WGS	9 gén, <i>SF3B1</i> , <i>TP53</i> , <i>MYD88</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>ATM</i>	24
Quesada 2012	105	WES	78 gén, <i>SF3B1</i> , <i>POT1</i> , <i>CHD2</i> , <i>LRP1B</i>	23
Landau 2013	160	WES	20 gén, <i>SF3B1</i> , <i>TP53</i> , <i>MYD88</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>ATM</i> , <i>XPO1</i> , <i>CHD2</i>	25
Puente 2015	506	WES, WGS	36 gén, <i>NOTCH1</i> , <i>ATM</i> , <i>SF3B1</i> , <i>BIRC3</i> , <i>CHD2</i> , <i>TP53</i> , <i>MYD88</i>	26
Landau 2015	538	WES	44 gén, <i>SF3B1</i> , <i>ATM</i> , <i>TP53</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>POT1</i> , <i>CHD2</i> , <i>XPO1</i> , <i>RPS15</i>	27

WGS: teljesgenom-szekvenálás (whole genome sequencing), WES: teljesexom-szekvenálás (whole exome sequencing)

2. TÁBLÁZAT. A CLL-ben azonosított génmutációk összefoglalása

GÉN	ÉRINTETT ÚTVONAL	MUTÁCIÓ %-OS GYAKORISÁGA	REFERENCIA
<i>SF3B1</i>	RNS- és riboszomális processzálas	8–25%	23–27
<i>XP01</i>		2–8%	21, 25–27
<i>ZNF292</i>		5%	26
<i>MGA</i>		3%	26
<i>FUBP1</i>		3%	27
<i>DDX3X</i>		2–3%	24–27
<i>BIRC3</i>	Gyulladásos jelpálya	6–8%	26, 27
<i>MYD88</i>		3–9%	21, 24
<i>SAMHD1</i>		3%	25
<i>TRAF3</i>		3%	26
<i>TRAF2</i>		3%	27
<i>KLHL6</i>	B-sejt-útvonal	2–3%	21, 26
<i>ITPKB</i>		2%	25
<i>CARD11</i>		2%	27
<i>ATM</i>	DNS-károsodás, sejtkontroll	8–22%	24–27
<i>TP53</i>		5–15%	24–27
<i>POT1</i>		3–10%	23, 25–27
<i>NOTCH1</i>	Notch-jelút	4–12,6%	21, 23–27
<i>FBXW7</i>		1–4%	24, 26
<i>CHD2</i>	Kromatinmodifikáció	4–8%	17,19–21
<i>ZMYM3</i>		3–4%	24–27
<i>HIST1H1E</i>		3%	27
<i>SETD2</i>		2%	26
<i>EGR2</i>	B-sejt-differenciáció	1–5%	25–27
<i>BCOR</i>		3%	25
<i>NRAS</i>	MAPK-ERK útvonal	1–3%	25
<i>MAP2K1</i>		4%	27
<i>MAPK1</i>		3%	24
<i>BRAF</i>		2%	26
<i>KRAS</i>		2%	25
<i>LRP1B</i>	WNT-útvonal	5%	23
<i>MED12</i>		1–2%	25–27



2. ÁBRA. Az azonosított CLL driver gének és az általuk érintett jelátviteli útvon. A különböző NGS-alapú vizsgálatokban azonosított potenciális CLL driver gének 9 fő jelpályához tartoznak

Szintén WES-vizsgálat segítségével Landau és munkatársai 160 CLL-es betegben 20 gént azonosítottak, melyek szerepet játszhatnak a betegség patogenezisében. Ezek közül 8 gén megegyezett a korábbi közleményükben már leírt génekkel. A további 12 gén közül az *XPO1*, a *CHD2* és a *POT1* mutációit korábbi vizsgálatokban már összefüggésbe hozták a CLL-lel. Emellett 9 új potenciális driver gént azonosítottak, melyek szerepet játszanak különböző malignus betegségek kialakulásában, de mutációikat CLL-ben korábban még nem azonosították (*NRAS*, *KRAS*, *BCOR*, *EGR2*, *MED12*, *RIPK1*, *SAMHD1*, *ITPKB* és *HIST1H1E*) [25]. E mutációk pontos szerepének a feltárása a CLL patogenezisében még várat magára.

Egy nagy esetszámú tanulmány keretén belül Puente és munkacsoportja közel 500 CLL-es mintát vizsgált WES és WGS segítségével. Vizsgálatuk során 36 gén mutációit azonosították, melyek közül 12 gén eltéréseit CLL-ben korábban még nem írták le (pl. *ZNF292*, *ARID1A*, *ZMYM3* és *PTPN11*). A teljesgenom-vizsgálatokkal a nem kódoló régiókban is találtak mutációkat. A *NOTCH1* gén 3' nem átíródo szakaszán (untranslated region, UTR) talált mutáció fokozott Notch1-aktivitást és agresszívabb betegségfolyással társult. Emellett a *PAX5* gén szintén nem kódoló, ún. „enhancer” régiójában talált mutáció a B-sejt-specifikus transzkripció faktor, a *PAX5* expressziójának csökkenésével járt. Ez az

első példája annak, hogy a genom nem kódoló régiójában bekövetkező genetikai eltérés ugyanolyan prognosztikus következménnyel járhat, mint a kódoló szakasz mutációja [26]. Ez a megfigyelés egyben felhívja a figyelmet a teljes genetikai állományunk mintegy 98%-át kitevő – és a jelen pillanatban nagyrészt ismeretlen – nem kódoló részben rejlő eltérések lehetséges patogén szerepére.

Legfrissebb közleményükben Landau és munkatársai 538 CLL-es beteg mintájában WES-sel 44 gén visszatérő mutációját és 11 kópiaszám-eltérést azonosítottak. A mutációkat hordozó gének közül 26 gén eltérését eddig CLL-ben még nem írták le. E gének közül érintettek voltak pl. a MAPK-ERK útvon génjei (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF* és *MAP2K1*), a B-sejt-aktivációs útvon génjei (*TRAF2*, *TRAF3* és *CARD11*) és a kromatinmodifikációban szerepet játszó gének (*ASXL1*, *HIST1H1B*, *BAZ2B* és *IKZF3*). Emellett két olyan gén mutációját is sikerült azonosítani, amelyeknek korábban még nem merült fel potenciális szerepük a tumorképződésben (*IKZF3* és *RPS15*) [27].

Összességében a genomszintű tanulmányok alapján látható, hogy a CLL-re alacsony mutációs ráta (0,6–0,9/Mb) jellemző, valamint az, hogy kevesebb nem szinonim mutáció található a kódoló régiókban más tumorokhoz képest [14–111/Mb melanómában [28]; 1,7–3,4/Mb diffúz nagy B-sejtes lim-

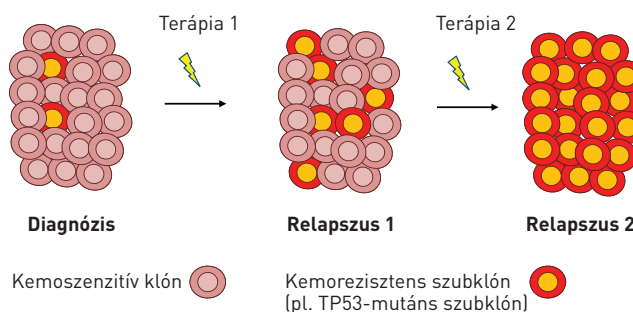
fómában [29]). Emellett nagyfokú genetikai heterogenitás mutatható ki a CLL-es betegek között, amit alátámaszt az azonosított gének nagy száma, valamint a különböző tanulmányokban leírt újabb és újabb mutációs célpontok sokfélesége. A leggyakoribb mutációs célpontok az esetek 15-20%-ában megtalálható *SF3B1*, *ATM*, *TP53* vagy *NOTCH1* gének. Ezenfelül számos alacsony frekvenciájú (az esetek 1-10%-ában megjelenő) mutáció fordul elő. A visszatérő mutációkat mutató gének 9 fő jelátviteli útvonal tagjai. E géneket a 2. táblázat tartalmazza, a jelpályák összefoglalása pedig a 2. ábrán látható.

TUMORON BELÜLI HETEROGENITÁS ÉS KLONÁLIS EVOLÚCIÓ

Már a 2000-es évek elején, fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) vizsgálatok során felmerült, hogy a CLL-esetekben genetikai heterogenitást mutató különböző szubpopulációk találhatók [8]. Az utóbbi években az NGS technikák megjelenésével és fejlődésével a tumoron belüli heterogenitás és a klonális evolúció jelenségét is jobban megismerhettük, és kiderült, hogy a CLL-t valóban nagyfokú betegen belüli és betegek közötti heterogenitás is jellemzi.

Egy nagyszabású tanulmányban Landau és munkatársai a tumoron belüli heterogenitást vizsgálták WES-sel 149 betegen. Klonális eltérésnek tekintettek egy mutációt, ha az közel az összes tumorsejtben megtalálható volt. Ezek a génmutációk és kromoszómaeltérések a szelekciós lépés előtt jelentek meg, így korai eseménynek tekinthetők. Szubklonálisnak neveztek egy eseményt, ha csak a tumorsejtek egy részét érintette. Ezeket a mutációkat késői eseménynek tartják. A fentiek alapján a CLL patogenezisében pl. a *MYD88* mutációja, a tri(12) és a del(13q) klonális, korai eseményeknek számítanak, ezzel szemben a *TP53*, *SF3B1* és az *ATM* gének eltérései késői események, melyek főként a betegség progressziójában játszanak szerepet. Emellett vizsgálták 18 beteg sorozatmintáit is (két mintavétel között medián 3,5 év telt el), amely során két fő mintázatot figyeltek meg. A legtöbb nem kezelt, és néhány kezelt beteg klonális egyensúlyban maradt, azaz az egyes szubklónok mérete nem változott a vizsgálat során, ezek a betegek stabil betegséggel rendelkeztek. Ezzel szemben a legtöbb kezelt betegnél klonális evolúciót figyeltek meg, mely során egy vagy több agresszív szubklón dominánssá vált, ami rezisztencia kialakulásához vezetett az esetek nagy részében. Arra következtettek, hogy a kezeletlen esetekben több időre van szükség, hogy a rátermett klón dominánssá váljon, míg a citotoxikus terápia hatására a korábban domináns klón kiszelektálódik, és helyét rátermett, gyakran rezisztens szubklónok vehetik át [25].

Az egyes szubklónok jelentőségét vizsgálva Rossi és munkacsoportja több mint háromszáz frissen diagnosztizált CLL-es betegen a *TP53* gén nagy érzékenységgű, ún. „ultradeep” NGS-vizsgálata során azt figyelte meg, hogy a szubklonális *TP53*-mutációk (amikor a mutáció a tumorsejtek csak egy kis hányadában mutatható ki) jelenléte ugyanolyan rossz prognózissal járt, mint amikor a *TP53* klonális mutációként



3. ÁBRA. A rátermett szubklónok szelekciója a terápia hatására. A diagnóziskor nem detektálható, vagy csak nagy érzékenységgű újgenerációs szekvenálással kimutatható kemorezisztens szubklónok a hagyományos kemoterápia hatására kiszelektálódnak, és a relapszus során domináns populációvá válnak

volt jelen. Emellett követéses vizsgálatok során megállapították, hogy a terápia előtt jelen levő kisméretű, *TP53*-mutáns szubklónok dominánssá váltak a relapszus során. A *TP53*-mutációt hordozó betegek rizikója fokozott a hagyományos kemoterápiával szembeni terápiás kudarcra [3. ábra]. Rossi és munkatársai eredménye a kisméretű, *TP53*-mutációt hordozó szubklónok korai detektálásának szükségességét vetíti előre, mely lehetővé teszi azon betegek magasabb rizikócsoportha sorolását, akikben ezek a szubklónok korán kimutathatóak. E betegcsoportban mérlegelendő a hagyományos kemoterápia helyett alternatív terápia alkalmazása [30]. Ennek kapcsán Malcikova és munkacsoportja *TP53*-mutációk terápiaindukált klonális evolúcióját vizsgálta. Összességében azt tapasztalták, hogy több kezelt betegen jelent meg *TP53*-mutáció, mint a kezelésben nem részesülő betegen. Továbbá kimutatták, hogy megfelelően érzékeny metodika alkalmazásával a legtöbb ilyen betegen már a diagnóziskor detektálható a relapszus során dominánssá váló *TP53*-mutáció [31].

Ezekből a közleményekből látható, hogy a betegek közötti heterogenitás mellett nagyfokú genetikai heterogenitás jellemző egy adott betegen belül is. Az egyes betegeken megfigyelhető szubklonális architektúra pontos megismerése elősegítheti a személyre szabott terápiát, hiszen ha az alkalmazott gyógyszer a szubklonális mutációkra nem hat, a betegnek nagyobb rizikója van a relapszusra [32].

EPIGENETIKAI VÁLTOZÁSOK A CLL-BEN

Az epigenetika foglalkozik azokkal a génexpressziós változásokkal, amelyek nem járnak együtt a DNS-szekvencia megváltozásával. Ismert, hogy az epigenetikai változások szerepet játszhatnak a tumorgenezisben, ezek közül a legalaposabb ismeretek a DNS-metilációról állnak rendelkezésre. Általánosságban elmondható, hogy a daganatokra a teljes genomszintű

hipometiláció mellett a lokális hipermetiláció jellemző, valamint a DNS-metiltranszferázok emelkedett expressziója, aminek következménye genomikai instabilitás és onkogénaktiváció vagy tumorsuppresszorgén-inaktiváció is lehet [33, 34].

Az eddig legjobban tanulmányozott epigenetikai módosulás CLL-ben épp a DNS-metiláció folyamata. Kvantitatív vizsgálatokkal a CLL-genomnak főként az ismétlődő szekvenciákban globális hipometilációt mutattak ki [35, 36]. További tanulmányokban leírták különböző kandidáns gének aberráns metilációját, pl. a *BCL2* [37] és *TCL1* [38] hipometilációját, és a *DAPK1* gén promotorének hipermetilációját [39]. E metilációs változások vizsgálata azonban nem vált a CLL rutin diagnosztikájának részévé.

Genomszintű metilációs vizsgálatokban kimutatták, hogy CLL-ben a DNS-metilációs státusz stabil a betegség lefolyása során, és megfigyelték, hogy a két *IGHV*-mutációs csoport metilációs státusza eltérő. Ezek a metilációs változások megegyeztek a naiv és memória B-sejtekben megfigyelhető módosulásokkal. Így felmerül, hogy a nmCLL esetek a naiv B-sejtekből alakulnak ki, míg az mCLL esetén a memória B-sejtek szolgálnak prekursoraként. Emellett azonosítottak egy korábban nem ismert intermedier prognosztikus csoportot is, amelyben az *IGHV* döntően mutált volt, viszont a metilációs mintázat naiv B-sejtekéhez hasonlított [40]. Érdekes módon Oakes és munkacsoportja összefüggést talált a driver génmutációk és a DNS-metilációs profil között. Megfigyelték, hogy azokban a CLL-esetekben, ahol genetikai eltérések mutatkoztak, DNS-metilációs változások is megjelentek. Viszont genetikai módosulás hiányában epigenetikai eltérés sem volt kimutatható. Emellett azt találták, hogy azok a betegek, akikben alacsony volt a metilációs heterogenitás, a jobb prognózisú mCLL-be tartoztak, míg a nagyobb metilációs heterogenitást mutató esetek a nmCLL-be [41].

Mióta Calin és munkatársai leírták a mikroRNS-ek (miR) összefüggését daganatokkal [42], nyilvánvalóvá vált, hogy ezeknek a kis, nem kódoló RNS-eknek tumorsuppresszor vagy onkogén szerepük is lehet a különböző daganatok patogenezisében [43]. A miR-expressziós változásokat CLL-ben vizsgálva a miR-15/16 klaszter, miR-29, miR-181 család tagjai, és a miR-34b/c eltérő expresszióját találták a normális B-sejtekhez viszonyítva. A miR-expressziós profil meghatározásával el lehet különíteni a normális B-sejtektől a CLL-sejteket, emellett összefüggésbe hozhatóak a progresszióval, a prognózissal és terápiarezisztenciával. A 13q kromoszómarégióban elhelyezkedő miR-15a/16-1 deléciójával együtt jár a *BCL2* gén upregulációja indolens CLL-ben. Emellett a miR-29 és a miR-181 csökkent expressziója korrelál a *TCL1* gén fokozott expressziójával agresszív lefolyású CLL-ben. A miR-34-család tagjai pedig a *TP53* regulációjában játszanak szerepet [44].

Bár ezek a tanulmányok izgalmas eredményeket hoztak, az epigenetikai változások vizsgálata nem képezi a CLL mindennapi diagnosztikus algoritmusának részét.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az NGS alkalmazásával az elmúlt években jelentősen bővültek az ismereteink a CLL molekuláris hátterével kapcsolatban. E technikák segítségével számos korábban ismert (*TP53* és *ATM*) és nem várt (*SF3B1* és *POT1*) CLL driver gént azonosítottak. Emellett kimutatták, hogy a CLL-re nagyfokú, betegek közötti és betegen belüli genetikai heterogenitás jellemző, aminek pontos feltérképezése és megismerése fontos szereppel bírhat a közeljövőben a megfelelő célzott terápiás stratégiák kidolgozásában és megválasztásában.

Az NGS-vizsgálatokkal megismert új gének közül a *NOTCH1*, *SF3B1* és *BIRC3* prognosztikus jelentőségűek, és elképzelhető, hogy az eddig használt prognosztikai markerek mellett a jövőben a klinikai gyakorlatban is szerepet kaphatnak. Az első, mutációkat is magába foglaló prognosztikus rendszert Rossi és munkatársai egy 1274 minta eredményeit bemutató tanulmányukban közzétették, ahol négy prognosztikai csoportot határoztak meg. Magas rizikócsoportba sorolták a *TP53*- és/vagy *BIRC3*-mutációt hordozó betegeket (10 éves túlélés: 29%), intermedier rizikócsoportba voltak sorolhatóak a *NOTCH1*- és/vagy *SF3B1*-mutációt és/vagy a del(11q) eltérést hordozó betegek (10 éves túlélés: 37%), alacsony rizikójú a tri(12) vagy a normális kariotípus (10 éves túlélés: 57%), és nagyon alacsony rizikócsoportba tartoztak a del(13q) eltérést hordozó betegek, akiknek a 10 éves túlélése 69,3%, ami nem különbözik szignifikánsan a korban megfelelő átlagpopulációtól [45].

A terápiával kapcsolatos klonális evolúció vizsgálata segíthet a rezisztenciamechanizmusok megértésében. Több közleményben megfigyelték, hogy a relapszus során detektálható mutációk nagy része már a diagnóziskor azonosítható, alacsony allélfrekvenciával [25, 31]. Ezek a kezelés előtt kis frekvenciával jelen lévő, viszont a relapszus során dominánssá váló mutációk NGS-alapú, korai felismerésével, és célzott kezelésével javulhatna a CLL jelenlegi terápiájának a hatékonysága.

Az elmúlt évek során soha nem látott részletességgel tárult elénk a CLL genetikai és epigenetikai térképe. Az egyes mutációk és egyéb változások pontos szerepének tisztázása a betegség kialakulásában és lefolyásában jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi. Az egyre bővülő célzott terápiák megjelenésével párhuzamosan egyre fontosabb szerep jut majd a betegség genetikai hátterének, valamint a klonális architektúra pontos feltérképezésének, ami reményeink szerint az új terápiás lehetőségek egyre hatékonyabb alkalmazásához vezet majd.

IRODALOM

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2008
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219–234, 1975
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198–206, 1981
4. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*. 27:1637–1643, 2009
5. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840–1847, 1999
6. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111:865–873, 2008
7. Claus R, Lucas DM, Ruppert AS, et al. Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 124:42–48, 2014
8. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916, 2000
9. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323:720–724, 1990
10. Neilson JR, Auer R, White D, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 11:1929–1932, 1997
11. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5413–5417, 1991
12. Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, et al. TP53 mutation analysis in clinical practice: lessons from chronic lymphocytic leukemia. *Hum Mutat* 35:663–671, 2014
13. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50:7717–7722, 1990
14. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 15:995–1004, 2009
15. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 114:5307–5314, 2009
16. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26:1458–1461, 2012
17. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848–1854, 1999
18. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, et al. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 95:2455–2457, 2000
19. Gruber M, Wu CJ. Evolving understanding of the CLL genome. *Semin Hematol* 51:177–187, 2014
20. Meyerson M, Gabriel S, Getz, G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 11:685–696, 2010
21. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475:101–105, 2011
22. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 151:404–406, 2010
23. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:47–52, 2012
24. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365:2497–2506, 2011
25. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152:714–726, 2013
26. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 526:519–524, 2015
27. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 526:525–530, 2015
28. Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485:502–506, 2012
29. Vaque JP, Martínez N, Batlle-López A, et al. B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica* 99:222–231, 2014
30. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123:2139–2147, 2014
31. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29:877–885, 2015
32. Sutton LA, Rosenquist R. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: impact of subclonality on disease progression. *Expert Rev Hematol* 8:71–78, 2015
33. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415–428, 2002
34. Ziller MJ, Gu H, Muller F, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500:477–481, 2013
35. Cahill N, Rosenquist R. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 8:138–148, 2013
36. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, et al. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 80:2074–2080, 1992
37. Hanada M, Delia D, Aiello A, et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82:1820–1828, 1993
38. Yuille MR, Condie A, Stone EM, et al. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 30:336–341, 2001
39. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 129:879–890, 2007
40. Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:1236–1242, 2012
41. Oakes CC, Claus R, Gu L, et al. Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discov* 4:348–361, 2014
42. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524–15529, 2002
43. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2257–2261, 2006
44. Balatti V, Pekarky Y, Rizzotto L, et al. miR deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol* 792:309–325, 2013
45. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403–1412, 2013