

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Dr. Jóna-Ujj Zsófia Ágnes

A Wilms tumor antigén prognosztikai szerepe és terápiában történő alkalmazása malignus hematológiai kórképekben

Témavezető: Dr. Rejtő László



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

A Wilms tumor antigén prognosztikai szerepe és terápiában történő alkalmazása malignus hematológiai kórképekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Jóna-Ujj Zsófia Ágnes okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája (Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Rejtő László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Egyed Miklós, PhD
Dr. Marton Imelda, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

**Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekklinika könyvtár
2017. június 30. 11:00**

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
Dr. Szerafin László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
Prof. Dr. Egyed Miklós, PhD
Dr. Marton Imelda, PhD
Dr. Szerafin László, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

**Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme
2017. június 30. 13:00**

Bevezetés

A WT1 gént egy gyermekkorban előforduló vesedaganatból, a Wilms tumorból izolálták. A gén egy cink-ujj fehérjét kódol, amely transzkripciósfaktorként más gének működését szabályozza. Fiziológiásan az embrionális szervezet számos sejtje mutat WT1 expressziót, de egészséges felnőttekben már nem, vagy csak bizonyos szövetekben mutatható ki kismértékű expressziója. Kezdetben tumorszupresszor géneként tartották számon, majd ismertté vált, hogy onkogénként is szerepet játszhat rosszindulatú daganatok, mint emlő-, tüdő-, vastagbél-, és hasnyálmirigyrák kialakulásában. Felfedezését követően hamar igazolták, hogy heveny leukémiákban is kimutatható expressziója, mely rossz prognózisra utal. Mára ez a nézet sokat változott, a kezdeti WT1 expresszió nem jár feltétlenül rövidebb túléléssel. A betegek követése során viszont jól használható a WT1 gén expressziójának meghatározása a minimális reziduális betegség monitorozására. A WT1 génextpresszió jelenlétét a malignus lymphomák esetén kevésbé vizsgálták, így erről alig áll adat rendelkezésünkre. A WT1 gén ellenes antitesttel történő vakcináció lehetőségeit számos tanulmány vizsgálja. Ismereteink bővülésével a felnőtt és gyermekkori leukémiák és lymphomák prognózisának meghatározásában, követésében és kezelésében lehet szerepe a WT1 gén pontosabb megismerésének.

Irodalmi áttekintés

A WT1 gén

A Wilms tumor megismerését követően a WT1 gén tumorszupresszor géneként került leírásra, később onkogén szerepe is nyilvánvalóvá vált. A WT1 gén kétirányú hatása feltehetően a jelen lévő kofaktoroktól, a kapcsolt gének működésétől, az adott sejttypustól és a differenciálódás fokától függően alakul ki.

A korai embrionális fejlődés során számos szövetben jelenik meg WT1 expresszió. Elengedhetetlen az embrionális vese fejlődéséhez, expressziójának zavara vese fejlődési rendellenességhez, akár Wilms tumor kialakulásához is vezethet. Részt vesz a gonadalis nem meghatározásában, a szív myocita sejtek proliferációjának szabályozásában, a koronáriák kialakulásában, a mellhártyát és peritoneumot képző mesothelium kialakulásában. Fontos a máj fejlődése során, erős WT1 expresszió mutatható ki embrionális korban a harántcsíkolt izmokban, az agy és gerincvelő ependymalis sejtjeiben is.

Égészséges felnőtt szervezetben csak kevés szerv, vagy szövet mutat WT1 expressziót. A felnőtt vese podocytaiban, a gonádok Sertoli és granulosa sejtjeiben, a mesotheliumban, valamint a csontvelői sejtek - a haemopoetikus őssejtek – kb. 1%-ban észlelhető a génexpresszió jelenléte.

Bár a WT1 gén, mint tumorszupresszor gén felfedezése a Wilms tumorhoz köthető, az utóbbi évtizedben más szolid daganatok kialakulásában is igazolták szerepét. Mesothelium eredetű daganatok, rhabdomyosarcoma, emlőrák, colorectalis rák, pancreas carcinoma és nem-kissejtes tüdőrák esetén is ismert növekedett expressziója. A rosszindulatú hematológiai betegségek közül korán felismerték fokozott expresszióját AML-ben, ALL-ben, MDS-ben. A WT1 lymphomákkal való kapcsolatáról kevés adat ismert. Expressziót igazoltak nyirokcsomóban Hodgkin lymphomában, Burkitt lymphomában, DLBCL-ben és ALCL-ben (anaplasztikus nagy-sejtes lymphomában) is, de az expresszió prognosztikai értékét még nem vizsgálták.

A heveny myeloid leukémia

A heveny myeloid leukémia (AML) esetében a csontvelőben a myeloblastok aránya eléri, vagy meghaladja a 20%-ot. A prognózis szempontjából fontos a betegek kromoszóma eltéréseinek azonosítása. Emellett alapvetően a beteg életkora, általános állapota, a primer vagy szekunder eredet, az indukciós kezelésre adott válasz és az elért remisszió mélysége, bizonyos molekuláris markerek jelenléte, vagy hiánya határozza

meg a prognózist. A felnőttkori AML optimális kezelése máig nem megoldott. A fiatal (<60 év) és idősebb betegek kezelése alapvetően különbözhet egymástól, időskorban a biológiai állapottól függően dózisredukció is szükséges lehet, esetleg a kezelés palliatív és szupportív ellátás irányába tolódhat el. Az AML-es betegek kemoterápiás kezelése indukciós és konszolidációs fázisra osztható. A kezelés hatékonyságát a komplett remisszió arányával, annak mélységével, a betegségmentes és teljes túlélés időtartamával jellemezhetjük. A relapszusba került betegek kezelésében mentő protokollok kerülnek alkalmazásra. Remisszió esetén a prognosztikai tényezők ismeretében összejtájtetésre kell törekedni. A refrakter betegek, a relapszusba kerültek, de a frissen felismert betegek kezelésére is számos ígéretes új készítmény van vizsgálat alatt.

A diffúz nagy B-sejtes lymphoma

A diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) a felnőttkor leggyakoribb malignus lymphoid daganata. A diagnózis a nyirokcsomó szövettani vizsgálatán alapul, míg stádiumbesorolásra az Ann Arbor rendszert használjuk. A kezelés meghatározásához szükséges a beteg IPI (International Prognostic Index) alapján történő rizikó besorolása is. A hagyományos prognosztikai markerek mellett az interim PET-CT-nek van jelentősége, mivel felismerhetők a nem jól reagáló esetek. A nem kiterjedt esetek progresszió mentes túlélése 80-85%-os, míg a kiterjedt betegséggel rendelkezőké 50%-os. A DLBCL-es betegek kezelése intenzív kemoterápiával (általában RCHOP) történik. Elsősorban relapszus, vagy egyénre szabottan rossz prognózis esetén autológ őssejt átültetés javasolt az intenzív kemoterápiával elért CR-t követően. A DLBCL kezelésének fegyvertára is új szerekekkel bővült az utóbbi években.

Célkitűzések

A Humángenetikai Intézettel kollaborációban végzett vizsgálat során az AML-ben és DLBCL-ben észlelhető WT1 expresszióval kapcsolatos kérdéseink a következők voltak:

1. AML-ben, perifériás vérből megbízhatóan vizsgálható-e a WT1 expresszió az általunk alkalmazott módszerrel?
2. Meghatározható-e numerikusan a WT1 expresszió kóros tartománya?
3. Milyen prognosztikai jelentősége van AML-ben a WT1 expresszió mértékének a betegség felismerésekor, majd az első indukciós kemoterápiát követően?
4. A WT1 expresszió vizsgálata alkalmazható-e AML-ben az MRD monitorozására?
5. DLBCL-ben WT1 expresszió megbízhatóan vizsgálható-e perifériás vérből?
6. A DLBCL-es betegek WT1 expressziójának van-e prognosztikai jelentősége?

Anyagok és módszerek

2006. október és 2014. októbere között 60 AML-es, és 25 DLBCL-es beteget vizsgáltunk.

A perifériás vérminták elemzése a Humángenetikai Intézetben történt. Az mRNS izolálásához a betegek vérmintáit PAXgene Blood RNA Tube csövekbe vettük le. Az RNS vérből történő izolálása PAXgene Blood RNA Kit segítségével történt. A WT1 gén expresszióját Real Time qRT-PCR módszerrel detektáltuk (Applied Biosystems 7500), melyben a gén expressziós szintjének kimutatása a TaqMan reakción alapult (Applied Biosystems Hs00240913-m1 assay). A WT1 gén kifejeződésének számszerű meghatározásához szükség volt egy olyan referenciagéntre, mely konstans és

magas expressziót mutat, erre a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) gént alkalmaztuk. Számításainkhoz nem a kapott „Ct” ciklus küszöbértéket használtuk, hanem mindkét gén expressziójának mértékét egy ismert DNS koncentrációjú oldat PCR amplifikációjának mértékére vonatkoztattuk. A számításaink során a kapott Ct értéket egy kalibrációs görbére illesztettük, és az így kapott eredményből következtettünk az egyes minták mRNS tartalmára. A vizsgált gén expressziójának mértékét egy standardizált numerikus értékkel (önkéntes egység) fejeztük ki, mely megadta a 10^4 GAPDH mRNS molekulára jutó WT1 mRNS molekulák számát. Az így kapott értéket használtuk a további számításokhoz.

Ahhoz, hogy a WT1 expressziót pozitívnak tekinthessük, meg kellett határozni a WT1 expresszió „cut-off,, értékét. Egy 35 főből álló kontroll csoportot alkalmaztunk, mely egészséges, önkéntes egyénekből állt, akik különböző korúak és neműek voltak. A vérmintáikból meghatározott WT1 expressziót a GAPDH expresszió értékére normalizáltuk, melynek tartománya 0,002-0,109 volt. Minden vizsgált egészséges egyén perifériás vérében volt kismértékű WT1 aktivitás. A logaritmikusan transzformált értékek χ_2 illeszkedés vizsgálatával igazoltuk, hogy a mért adatok normál eloszlást mutatnak ($p=0,9923$). Azt figyelembe véve, hogy egy normál eloszlású változó esetén a felső 2,5 százalékhhoz tartozó érték tekinthető magasnak, a 97,5 percentilis értéket (ami 0,108 volt) kerekítve adtuk meg a WT1 pozitívitás küszöbértékét 0,1-nek. Mivel a betegekben mért WT1 expresszió széles skálán mozogott (0,0077-239,0), megállapítottunk egy második küszöbértéket is a magas WT1 expresszióértéknek (10,0). A küszöbérték segítségével meghatározhatóvá váltak a WT1 pozitív és WT1 negatív betegek.

Eredmények

Az AML-es betegek WT1 expressziója

WT1 expresszió az AML felismerésekor

Az AML diagnózisakor a 60 betegből 53 esetében (88,33%) igazolódott WT1 pozitívitás. A diagnóziskor mért WT1 expresszió mértéke és

a betegség felismerésekor észlelt fehérvérsejt szám, a csontvelői blastok aránya, a betegség primer vagy szekunder jellege, az életkor és a citogenetika vonatkozásában statisztikailag igazolható összefüggés nem volt.

A diagnóziskor WT1 gént nem exprimáló 7 beteg teljes túlélése jobb, mint a WT1 pozitív 53 betegé, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,0812$).

A kezdetben WT1 pozitív 53 esetből 22 betegnél (a WT1 pozitívak 41%-nál) tudtunk indukciós kezelés mellett komplett remissziót elérni. A kezdetben WT1 negatív 7 betegből pedig három esetében alakult ki CR (a WT1 negatívak 43%-nál), így a betegségmentes túlélés (a remisszió időtartama) csak az ő esetükben volt meghatározható. A túlélésbeni különbség itt sem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,1232$).

Hasonló eredményeket kaptunk akkor is, ha csak a 41 de novo AML-es betegnekél hasonlítottuk össze a kezdetben WT1 negatív és WT1 pozitív beteg teljes túlélését ($p=0,1174$), és a közülük CR-be került WT1 negatív és pozitív esetek betegségmentes túlélését ($p=0,134$). A WT1 negatív betegek túlélése jobb volt, de a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

A WT1 expresszió változása az első indukciós kezelést követően

A WT1 génexpresszió ismételt vizsgálatára az első kemoterápiás kezelést követően életben lévő 49 beteg esetén kerülhetett sor. Mind a 49 beteg indukciós kezelésben részesült. Az kezdetben 7 WT1 negatív beteg mellett még 11 vált WT1 negatívvá, így összesen 18 betegnek volt az indukció után küszöbérték alatti, 31 betegnek küszöbérték feletti WT1 értéke.

A kezelés után WT1 negatív 18 beteg és a WT1 gént végig exprimáló 31 beteg teljes túlélést összehasonlítva szignifikáns eltérés volt kimutatható ($p<0,0001$). A WT1 negatív betegek kétéves túlélési valószínűsége 61%-os volt, 206 hét medián túléléssel, míg a WT1 pozitív betegek kétéves túlélési valószínűsége csak 24%-os volt, 46 hetes medián túléléssel.

A betegségmentes túlélés tekintetében is szignifikáns különbség észlelhető ($p=0,018$) az első indukciót követően CR-t elért 14 WT1 negatív és 11 WT1 pozitív beteg DFS-e között.

Az indukciós kezelés utáni három betegcsoport túlélése a WT1 expresszió változásától függően

A kezdeti WT1 negativitás és az első indukciós kezelésre kialakuló WT1 negativitás közötti túlélésbeni különbség pontosabb megítélésére az első indukciót követően életben lévő betegeket három csoportra osztottuk. Az első csoport az indukció előtt és után is WT1 negatív maradt, ide 7 beteg tartozott, DFS csak 3 betegnél volt számítható, akik komplett remisszióba kerültek. A második csoportba a végig WT1 pozitív betegek kerültek. Ide 31 beteg tartozott, CR 11 betegnél alakult ki, DFS náluk számítható. A harmadik csoportba azok a betegek kerültek, akik diagnóziskor WT1 pozitívnak bizonyultak, de az első indukció után WT1 negatívvá váltak. Összesen 11 beteg WT1 expressziója csökkent a küszöbérték alá. CR alakult ki mind a 11 betegnél.

Szignifikáns különbséget észleltünk a három betegcsoport OS eredményei között ($p=0,0015$). A legjobb OS eredmény (medián 222 hét, 35-324 hét) annál a 11 betegnél észlelhető, akik kezdetben ugyan mutattak WT1 expressziót, de az indukciót követően WT1 negatívvá váltak, a kétéves túlélés valószínűsége ebben az esetben 63% volt. Valamivel rosszabb az OS (median 180 hét, 34-324 hét) a végig WT1 negatív (7 beteg) csoportban, itt a kétéves túlélés valószínűsége 57%-nak adódott. A legrosszabb teljes túlélést (median 43 hét, 5-209 hét) a végig WT1 expressziót mutató 31 betegnél észleltünk, a kétéves túlélés valószínűsége csak 7,8% volt.

A betegségmentes túlélést tekintve is szignifikáns különbség észlelhető ($p=0,0471$). A betegségmentes túlélés a végig WT1 negatív betegcsoportnak, 100%-os valószínűségű, mivel mind a három CR-be került beteg tartósan remisszióban is maradt (medián 167 hét, 71-167 hét). A kezdetben WT1 pozitív, majd negatívvá válók (11 beteg) DFS értéke két évnél

65%-os (medián 192 hét, 27-282 hét). A legrosszabb két éves DFS érték (27%) a végig WT1 expressziót mutató 11 betegnél észlelhető (medián 73, 7-205 hét).

Kezelési eredmények betegcsoportonként az első indukciót követően és a követés végén

- Az első kemoterápiás kezelést követően életben lévő 49 betegből 25-nél (51%) alakult ki CR. Mind a 60 vizsgált beteget figyelembe véve a remissziós arány 42%-os.
- A 7 végig WT1 negatív beteg közül az első indukciót követően 3 beteg esetén CR, 4 beteg esetén PR alakult ki (42% ill. 58%). A három CR-be került beteg a követési idő végén is életben és remisszióban volt. A 4 PR-be került beteg nem volt életben a követés végén.
- Annál a 31 betegnél, akiknél végig kimutatható volt a WT1 expresszió, az első indukciót követően 11 esetben CR (35%), 10 esetben PR alakult ki (32%), 10 beteg (32%) pedig refrakternek bizonyult. A CR-be került 11 betegnél sem csökkent a küszöbérték alá a WT1 expressziója. A követési idő végére az első indukció után CR-be került 11 betegből csak 4 volt életben, és közülük csak ketten (25%) voltak még mindig remisszióban. A többi, első indukcióra CR-be nem került 20 betegből a vizsgálat végével egy sem volt életben.
- A kezdeti WT1 expressziót mutató, majd WT1 negatívvá váló 11 betegnél az első indukciót követően minden esetben CR alakult ki. A követési idő végén 7 beteg volt életben, közülük 6 volt CR-ben.
- A követési idő végén az összes életben lévő 14 betegből 11-en voltak CR-ben. Közülük 3 beteg (27%) tartozott a végig WT1 negatív betegek közé, 136 hét medián túlélési idővel. Hat beteg (55%) a kezdetben WT1 gént exprimáló, majd negatívvá vált csoportba tartozott 247,5 hét medián teljes túlélési idővel, és 2 beteg (18%) a

tartósan WT1 pozitív csoportba, 209, illetve 156 hét túlélési idővel. A három nem CR-ben lévő betegnél a vizsgálati idő zárásakor kezelés zajlott aktív betegségük miatt.

- Összességében elmondható, hogy a WT1 végig pozitív betegek túlélése volt a legkedvezőtlenebb, a CR arány a legrosszabb, és a közülük remisszióba került 11 betegből a követés végén már csak 2 beteg volt remisszióban. A WT1 negatív betegek OS értéke alulmaradt a kezelést követően WT1 negatívvá váló betegektől, kevesebben kerültek remisszióba (42%), azok viszont remisszióban maradtak a követés végéig. Ezzel szemben a WT1 negatívvá váló betegek OS-e bizonyult a legjobbnak, CR 100%-ban alakult ki, de a betegek 45%-a viszont relabált, és a negatívvá válók 36%-a végül elhalálozott a követési idő végéig.
- A WT1 negatívvá váló betegek közül négy nem APL-es és három APL-es beteg esetét ismertetjük külön. Közülük a második indukciót követően 1 beteg, a konszolidáció során 2, a kemoterápiát követően 1 beteg relabált. Mind a négy relapszus WT1 pozitivitással jelentkezett, WT1 negatív relapszus nem volt. Mindhárom APL-es betegben CR alakult ki.

A WT1 génexpresszió mértéke

Vizsgáltuk, hogy a WT1 expresszió mértéke befolyásolja-e a betegség prognózisát. Emiatt először az 53 kezdetben WT1 pozitív beteget két csoportra osztottuk a diagnóziskor észlelt WT1 expresszió mértékének függvényében. Az első csoportba az a 19 beteg került, akik WT1 expressziójának értéke 0,1 és 9,99 közé esett, ők voltak az enyhén pozitív esetek, míg a második csoportba az erősen pozitív, nagy WT1 expressziót (10,0 felett) mutató 34 beteg került. A betegek teljes túlélése között nem találtunk szignifikáns eltérést ($p=0,5286$). A közülük CR-be került 8 enyhén pozitív és 14 erősen pozitív beteg DFS görbéi sem mutattak különbséget ($p=0,4719$).

Akkor sem észleltünk különbséget, ha csak azt a 31 beteget vizsgáltuk, akik az első indukciós kezelést követően is WT1 pozitívak maradtak. Közöttük megnéztük a kezdeti WT1 expresszió alapján 14 enyhe és 17 erős expressziót mutató beteg teljes túlélését ($p=0,6773$). A DFS esetén (összesen 11 beteg: 2 enyhén WT1 pozitív, 9 erősen WT1 pozitív) sem volt szignifikáns különbség ($p=0,401$).

Nem volt szignifikáns különbség az OS-ben akkor sem ($p=0,3112$), ha az első indukciós kezelésre negatívvá váló 11 betegnél hasonlítottuk össze a különböző kezdeti WT1 expresszióval rendelkező betegek (5 enyhe WT1, 6 erős WT1 expresszió) túlélését. Hasonló eredményt kaptunk mind a 11 CR-be került WT1 negatívvá váló beteg DFS-nek összehasonlításakor is ($p=0,3674$).

Annál a 31 betegnél, akik WT1 pozitivitása a cut-off érték felett maradt az első indukciót követően is, az expresszió 1 nagyságrenddel történő csökkenése (7 beteg) nem befolyásolta a teljes túlélést, az 1 log-al nem csökkenő WT1 expressziót mutató betegekhez (24 beteg) képest ($p=0,9228$). DFS-ben sem volt szignifikáns különbség ($p=0,2254$). Ugyanígy, a kezelést követően is WT1 pozitív betegek között az expresszió 2 loggal történő csökkenése (3 betegnél csökkent, 4 betegnél nem) sem befolyásolta a teljes ($p=0,5186$) és a betegségmentes túlélést ($p=0,0648$) sem. Összességében az OS és DFS javulásában tehát nem az expresszió csökkenésnek, hanem csak a kezelés után kialakuló WT1 negativitásnak (küszöbérték alá csökkenő expresszióknak) van döntő szerepe.

A DLBCL-es betegek WT1 expressziója

Nem találtunk összefüggést a kezdeti WT1 pozitivitás és a betegség jellemzői, így a klinikai stádium, IPI score és a B tünetek jelenléte között sem.

A WT1 pozitív és WT1 negatív betegek OS és DFS eredményeit hasonlítottuk össze. A kezdetben WT1 gén negatív 17 beteg teljes túlélése (median: 131 hét, tartomány: 5-414 hét) szignifikánsan jobb volt ($p=0,0475$), mint a 8 WT1 pozitív betegé (median 103 hét, tartomány: 40-224). A WT1

negatív betegek kétéves túlélési valószínűsége 68,8%, míg a WT1 pozitív betegeké csak 37,5% volt.

A kezelés mellett az összes betegből 17 (68%) került CR-be, hatan (24%) PR-be és két beteg (8%) terápia refrakternek bizonyult. A WT1 expresszió megoszlását tekintve a 8 WT1 pozitív betegből 5 (a WT1 pozitívak 63%-a) CR-be, kettő (a WT1 pozitívak 25%-a) PR-be került és egy beteg (a pozitívak 12%-a) bizonyult terápia refrakternek. A 17 WT1 negatív betegek közül 12 (a WT1 negatívak 70%-a) került CR-be, 4 (a negatívak 24%-a) PR-be, és 1 beteg (a negatívak 6%-a) refrakter maradt. A vizsgálati idő során elhalálozott 14 betegből 7 tartozott a WT1 pozitív betegek közé, 7 beteg pedig a WT1 negatív betegek közé.

A betegségmentes túlélések között szignifikáns különbség volt a WT1 expresszió függvényében ($p=0,0004$). A WT1 pozitív betegek remisszió tartama (medián: 22 hét, tartomány: 11-204 hét) jelentősen rövidebb volt, mint a WT1 negatív betegeké (medián 113 hét, tartomány: 66-152 hét).

A kezdetben észlelt WT1 expresszió jelenléte mellett vizsgáltuk annak kezelést követő változását is. Külön néztük a kezelés előtt és utána is WT1 negatív, illetve végig WT1 pozitív betegek mellett a megelőzően WT1 gént nem exprimáló, majd a kezelés alatt WT1 pozitívvá váló 2 beteg teljes túlélését is. Ugyan a kis betegszám csak óvatos következtetéseket tesz lehetővé, de a kezelés során WT pozitívvá váló betegek túlélése, ugyanúgy mint a végig WT1 pozitívaké szignifikánsan rosszabb, mint a végig WT1 negatív betegeké ($p=0,006$), és különösen rossz prognózisra utal.

Lényeges különbség látszik a három betegcsoport remissziót elért eseteinek DFS eredményeiben is. A kezelés során WT1 negatív betegek jelentősen jobb betegségmentes túléléssel rendelkeztek, mint a WT1 pozitív, vagy a kezelés során pozitívvá váló betegek ($p=0,0002$).

Megbeszélés

A Wilms tumor gén és az AML kapcsolata

Már két évvel a gén felfedezését követően igazolták onkogén funkcióját, bár pontos szerepe a leukémiák kialakulásában nem tisztázott. Korábban az AML felismerésekor mért nagy WT1 expressziót rossz prognosztikai jelnek tekintették. A frissebb adatok ellentmondásosak, döntően nem találtak jobb túlélést a kezdeti WT1 negatív betegek esetében sem. Ezzel egyező eredményeket kaptunk mi is. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a génexpresszió kemoterápiát követő kimutathatósága esetén rosszabb a DFS és OS. A WT1 génexpresszió jelentőségét az MRD követésében látjuk. A kezelés utáni WT1 pozitivitás MRD pozitivitást, és gyakoribb relapszust jelez.

A Wilms tumor gén expressziója AML-es betegeinkben

Gazdag irodalmi háttérismeret áll rendelkezésünkre a leukémiás betegek WT1 expressziójának csontvelőből történő vizsgálatáról, de kevés az olyan adat, amely szerint a perifériás vérminta alkalmasabb lehet a génexpresszió vizsgálatára, mivel a csontvelői pluripotens őssejtek 1-2%-a által normálisan is exprimált gén okozta „háttérzaj” mértéke kisebb, a perifériás vérminta pedig invazív beavatkozás nélkül nyerhető, mind a betegektől, mind az egészséges kontroll önkéntesektől. Mi a korábban ritkábban használt módszert alkalmazva, a betegek perifériás vérmintáit elemeztük. Kezdetben párhuzamos vizsgálatokat is végeztünk egyidejűleg vett csontvelő és perifériás vérmintákból, és a mért eredmények jól korreláltak egymással, és ezt az irodalom is megerősíti. Megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban az egészséges egyének perifériás vérében is volt kimutatható (küszöbérték alatti) WT1 expresszió, ugyanúgy, mint az irodalomban, ahol egészséges egyének 30-40%-ának perifériás vérében igazoltak WT1 aktivitást.

A génexpresszió meghatározása

Az irodalomból ismertetett vizsgálatokban a WT1 mRNS szintjének logaritmikus csökkenését (változását) vizsgálták a betegek terápiás válaszában tükrében. Vizsgálatunkban a WT1 génexpresszió küszöbértékét elsőként határoztuk meg a GAPDH referenciagénre normalizálva. Az egészséges kontrollcsoporttól vett minták WT1 expressziója alapján a WT1 pozitívitas küszöbértékét 0,1-nél határoztuk meg. Ezt az egység nélküli számot használtuk a betegek WT1 expressziójának kifejezésére, így a küszöbérték segítségével meghatározhatóvá váltak a WT1 pozitív és WT1 negatív betegek. Mivel a betegekben talált WT1 expresszió mértéke széles skálán mozogott, megállapítottunk egy második küszöbértéket is az erősen pozitív, magas WT1 expresszióknak (10,0).

A leukémiás betegek klinikai jellemzői

A leukémiás betegek 88,33%-ban igazoltuk a betegség felismerésekor a WT1 génexpresszió jelenlétét. Ez az arány megfelel az irodalomban ismertetett eredményeknek. Nem volt összefüggés a FAB altípus, a csontvelői blastos infiltráció, a kezdeti perifériás fehérvérsejt szám, a karyotípus, az FLT3 pozitívitas, a NPM1 negatívitas és a WT1 expresszió megjelenése és mértéke között. Hasonló eredmények ismeretesek a nemzetközi, nagyobb betegszámú tanulmányok eseteiben is.

A betegség felismerésekor észlelt WT1 expresszió

A leukémia felismerésekor a WT1 negatív betegek két éves túlélés valószínűsége, a teljes túlélési, és a betegségmentes túlélési eredményei egyaránt kedvezőbbek voltak, mint a WT1 pozitívaké, de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Így mi nem találtuk prognosztikai jelentőséget az AML felismerésekor észlelt nagyobb WT1 expresszióknak, és az újabb irodalmi adatok is erre utalnak.

A WT1 expresszió változása az indukciós kezelést követően

A kezdeti WT1 pozitivitást mutató betegek esetén az indukciós kezelést követően észlelt WT1 expresszió küszöbérték alá csökkenése minden esetben CR kialakulásával járt együtt. A betegség felismerése óta WT1 negatív, illetve a kezelés hatására negatívvá váló betegeket együtt értékelve szignifikánsan jobb OS-t és DFS-t észleltünk.

Az első indukciós kezelésre kialakuló WT1 negativitás jelentőségének megítélésére a vizsgált betegeket három csoportra osztottuk. A betegség felismerése óta WT1 pozitív és WT1 negatív betegek mellett külön vizsgáltuk a kezdetben WT1 pozitív, de kezelést követően negatívvá váló betegeket. Ezek alapján szignifikánsan a legjobb OS túléléssel a kezdetben WT1 expressziót mutató, de az első indukció hatására negatívvá váló betegek rendelkeztek.

A három betegcsoport eltérően reagált az első indukciós kezelésre. A végig negatív betegcsoportból 42% került CR-be, és ők később is végig remisszióban maradtak (DFS görbe 100 %). Ezzel szemben a kezdetben WT1 pozitív, majd negatívvá váló betegek mindegyike CR-be került az első indukció után, de a követés során 45%-uk relabált. A végig pozitív betegek első indukciós kezelésre adott válasz aránya és az esetlegesen kialakult remisszó időtartama is a legkedvezőtlenebb volt.

Eredményeink összhangban állnak a WT1 gén leukemogenezisben feltételezett kettős szerepét vázoló modellel is, mely szerint a kemoterápiára WT1 negatívvá váló esetekben (ahol a kialakult remisszió tartósnak bizonyult) feltehetően a WT1 gén onkogén hatása szűnik meg, esetleg a tumorszupresszor aktivitása közelíthet az élettanihoz. Az alapján, hogy a kezdetben is küszöbérték alatti WT1 expressziót mutató, negatívnak tekintett betegek is reagálhatnak rosszul a kezelésre (nem alakul ki CR), elképzelhető, hogy ezekben az esetekben a fiziológiásan jelen lévő tumorszupresszor aktivitás esik ki, és ezt az indukciós kezelés nem mindig korrigálja. A

feltehetően végig gén aktivitást (onkogén hatást) mutató WT1 pozitív betegek jelentős része pedig nem, vagy rosszul reagált a kemoterápiára.

Számos tanulmány ismerteti, hogy a CR-be került betegek esetén a kezelés után észlelt nagy WT1 érték kedvezőtlen, hangsúlyozva az indukciós kezelés utáni fokozott WT1 szint prognosztikai szerepét. A mi vizsgálatunkban a végig, kezelést követően is WT1 pozitív csoport (a 0,1-nek meghatározott küszöbérték feletti WT1 expresszió) kedvezőtlen eredményei is ugyanezt jelenthetik.

Vizsgálatainkban a kezdetben WT1 pozitív betegek esetén az expresszió kezelést követő egy, illetve két nagyságrendbeli csökkenése sem volt prognosztikai értékű a túlélés tekintetében, amennyiben a WT1 expresszió a kóros tartományban maradt, azaz, ha nem csökkent a küszöbérték alá.

Az első indukciós kezelésre WT1 negatívvá váló 11 beteg közül relapszusba került négy esetben a WT1 expresszió ismételt a küszöbérték felé emelkedett. Az irodalom alapján az emelkedő WT1 expresszió akár hetekkel megelőzheti a klinikai relapszust. APL-es betegünkben a WT1 szint emelkedésének elmaradása sokat segített a relapszus kizárásában.

A mi munkánk is igazolja, hogy a WT1 génexpresszió meghatározása és követése hatékony eszköz lehet heveny leukémiás betegeink MRD vizsgálatára. Ez összhangban van a nemzetközi kutatócsoportok vizsgálataival is. Az expresszió növekedése pedig a relapszus korai jele lehet.

A WT1 gén és a DLBCL kapcsolata

Munkánk tervezése során az első kérdést a mintavétel módja jelentette. Az irodalomban ismert, hogy szövettani mintából immunhisztokémiai módszerrel kimutatható a WT1 gén expressziója, de az ismételt mintavételek már nehézkesek. Vizsgálatunkkal arra kerestünk választ, hogy meghatározható-e a perifériás vérből kezelés előtt és után a WT1 génexpresszió qRT-PCR segítségével. Dolgozatunk írásakor nem rendelkezünk irodalmi adattal arra nézve, hogy mi az oka az NHL-ben

szenvedő betegek perifériás vérmintáiban észlelt fokozott WT1 expresszióknak. Feltehetően a keringésben megjelenő, fokozott WT1 expressziót mutató kóros sejtek jelenléte adhatja meg erre a választ.

A DLBCL-es betegek WT1 expressziói

A betegek 32%-ban igazolódott WT1 pozitivitás. A kis betegszám ellenére a WT1 pozitivitás aránya megfelel a kevés NHL-ről szóló tanulmány nyirokcsomó mintáiból nyert adatainak. Az eltérő mintavételi módszer mellett észlelt hasonló WT1 expresszió arra utal, hogy DLBCL esetén nem szükségszerű a nyirokcsomóból WT1 expresszió vizsgálata, elegendő a perifériás vérből vett minta a betegség követésére.

Sem a kezdeti tumortömeg, sem a klinikai stádium, az életkor, az IPI score, vagy a B tünetek jelenléte és WT1 expresszió között nem találtunk összefüggést.

Szignifikáns különbség volt észlelhető a kezdeti fokozott WT1 expressziót mutató és nem mutató betegek teljes túlélése között. Feltehetően a rosszabb prognózissal járó WT1 pozitivitás esetén több kóros, malignus sejt kerülhet a keringésbe, valószínűleg agresszívabb betegséggel állhatunk szemben.

A kemoterápiás kezelés eredményeként CR-be került WT1 negatív esetek betegségmentes túlélése is szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint az eredetileg CR-be került, de továbbra is WT1 pozitív betegeké. Bár a vizsgált betegek közül a WT1 pozitívak nagyobb arányánál alakult ki CR, a remisszió időtartama (és a teljes túlélés is) jelentősen rövidebbnek bizonyult és a halálhoz vezető ok leggyakrabban a lymphoma progressziója volt. Ez felvetheti, hogy a kezdetben WT1 pozitív betegeknél akár intenzívebb indukciós kezelésre, korai autológ őssejt transzplantációra vagy más támadáspontú kezelésre lenne szükség.

Két, kezdetben WT1 negatív betegnél a kemoterápiás kezelés során megjelenő WT1 expresszió a betegség szokatlanul gyors progressziójával és

relapszusával járt. Ugyan két betegből nem lehet definitív következtetéseket levonni, de ezen esetek nagyon rossz túlélési eredményei felhívják a figyelmet arra, hogy ezt a kérdést tovább kell vizsgálni, mert a standard immunokemoterápia minden bizonnyal kiegészítésre, vagy módosításra szorul ezekben az esetekben.

Összességében adataink arra utalnak, hogy a WT1 génnek az akut leukémiák mellett a DLBCL patogenezisében is szerepe lehet, ami valószínűleg a WT1 gén onkogén funkciójával függene össze. Eredményeink szerint a fokozott expresszió kimutatása a betegség pontosabb prognosztizálására, a kezelés monitorozására és a korai relapszus előrejelzésére egyaránt alkalmazható a DLBCL-ben szenvedő betegekben, melynek terápiás vonzata is lehet. Ha a sorozatos MRD vizsgálatok progresszív betegséget igazolnak, akár kezdeti WT1 pozitivitás esetén is felmerülhet a kezelés intenzifikálása, akár az első CR-ben összejt transzplantáció lehetősége is. A későbbiekben akár immunterápiás fegyverként is használható lehet a betegség kezelésében. Mindehhez nagyobb betegszámú vizsgálatokra lenne még szükség.

Új megállapítások

1. Először határoztuk meg a WT1 expresszió küszöbértékét saját metodikánkkal perifériás vérben, egészséges kontroll minták és a GAPDH endogén referenciagén segítségével, mely fölött az eredményeket kórosnak tekintettük. A WT1 pozitivitás küszöbértéke 0,1, az erős WT1 pozitivitás küszöbértékét 10,0-nél adtuk meg.
2. Először igazoltuk magyar AML-es betegcsoport esetén, hogy a kezdeti WT1 negatívnak tartott csoport túlélése ugyan kedvezőbb, de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.
3. Igazoltuk, hogy a kezelés hatására negatívvá váló (azaz molekuláris remisszióba kerülő) AML-es betegek túlélése szignifikánsan jobbnak

bizonyult a végig WT1 pozitív és a kezdettől WT1 negatív betegeknél is.

4. A tartósan WT1 negatív AML-es betegek indukciós kezelésre adott kedvező válasz aránya kisebb, de ha CR alakult ki, akkor nem észleltünk relapszust.
5. AML-es betegeknél a küszöbérték felett maradó WT1 expresszió egy, illetve két log csökkenése nem befolyásolja a túlélést.
6. DLBCL-ben a WT1 expressziót elsőként vizsgáltuk perifériás vérből. Az irodalomból ismert nyirokcsomóból történt mintavétellel azonos előfordulási gyakoriságot találtunk.
7. DLBCL-ben a kezdeti fokozott WT1 expresszió nincs összefüggésben a beteg jellemző egyéb prognosztikai paraméterekkel (életkor, klinikai stádium, IPI score, B tünetek).
8. Fokozott WT1 expressziót nem mutató DLBCL-es betegek teljes és betegségmentes túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult.
9. Kezelést követően a kórossá váló WT1 expresszió az AML-hez hasonlóan DLBCL-ben is relapszusra utal, így a WT1 expresszió meghatározása MRD megállapítására és monitorozására ebben a kórképben is alkalmas.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Rejtő Lászlónak köszönöm pótolhatatlan segítségét, hosszú éveken át tartó támogatását és folyamatos ösztönzését, mely lehetővé tette a dolgozat elkészülését.

A Humángenetikai Intézet részéről köszönettel tartozom Dr. Bíró Sándor professzor úrnak támogatásáért, munkánk ellenőrzéséért. Szerzőtársamnak Dr. Buglyó Gergelynek, akivel közösen dolgozva születtek meg a vizsgálati eredmények, külön köszönet a minták génexpresszióinak meghatározásáért. Kosztolányi Katalinnak a minták feldolgozásában nyújtott segítségével.

Köszönöm munkatársaimnak, a minták vételében élen járó kolléganők – Kerecsenyiné Hevér Márta, Gyáni Ágnes, Kiss Zsuzsanna, Kovács Ferencné, Dr. Baráthné Szikora Éva – folyamatos segítségét.

A vizsgálat folyamatának, a cikkek elkészültének és a dolgozat megírásában nyújtott támogatását köszönöm Dr. Udvardy Miklós és Dr. Illés Árpád professzor uraknak.

Nem utolsó sorban, az értekezés nem készülhetett volna el szerető családom feltétel nélküli támogatása, ösztönzése és segítsége nélkül. Köszönöm férjemnek Dr. Jóna Ádámnak, kislányomnak Panninak, Édesanyámnak. Édesapámnak külön kiemelve szeretném megköszönni szakmai támogatását és folyamatos ellenőrző munkáját.



Nyilvántartási szám: DEENK/29/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ujj Zsófia
Neptun kód: D1MQO4
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ujj, Z.**, Buglyó, G., Udvardy, M., Beyer, D., Vargha, G., Biró, S., Rejtő, L.: WT1 Expression in Adult Acute Myeloid Leukemia: assessing its Presence, Magnitude and Temporal Changes as Prognostic Factors.
Pathol. Oncol. Res. 22 (1), 217-221, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-0002-0>
IF: 1.94 (2015)
2. **Ujj, Z.**, Buglyó, G., Udvardy, M., Vargha, G., Biró, S., Rejtő, L.: WT1 Overexpression Affecting Clinical Outcome in Non-Hodgkin Lymphomas and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia.
Pathol. Oncol. Res. 20 (3), 565-570, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-013-9729-7>
IF: 1.855

További közlemények

3. Telek, B., Rejtő, L., Batár, P., Miltényi, Z., Reményi, G., Simon, Z., **Ujj, Z.**, Mezei, G., Szász, R., Kiss, A., Udvardy, M., Illés, Á.: Az akut myeloid leukaemia gyógyszeres kezelése: Jelenlegi lehetőségek, jövőbeli kilátások.
Orvosi Hetilap. 157 (22), 843-848, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30433>
IF: 0.291 (2015)
4. **Ujj, Z.**, Jóna, Á., Udvardy, M., Tornai, I., Kiss, A., Telek, B., Szász, R., Reményi, G., Ilonczai, P., Illés, Á., Rejtő, L.: Hepatitis B virus reactivation in a patient with follicular lymphoma treated with fludarabine and rituximab containing immuno-chemotherapy.
Research. 1, 796-801, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.13070/rs.en.1.796>



5. Selmeczi, A., Udvardy, M., Illés, Á., Telek, B., Kiss, A., Batár, P., Reményi, G., Szász, R., **Ujj, Z.**, Márton, A., Ujfalusi, A., Hevessy, Z., Pinczés, L., Bedekovics, J., Rejtő, L.: Heveny myeloid leukaemiás betegek kezelésével szerzett tapasztalataink (2007-2013).
Orv. Hetil. 155 (17), 653-658, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29884>
6. Jóna, Á., Miltényi, Z., **Ujj, Z.**, Garai, I., Szilasi, M., Illés, Á.: Late pulmonary complications of treating Hodgkin lymphoma: bleomycin-induced toxicity.
Expert Opin. Drug Saf. 13 (10), 1291-1297, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2014.946901>
IF: 2.911
7. Telek, B., Rejtő, L., Kiss, A., Batár, P., Reményi, G., Szász, R., **Ujj, Z.**, Udvardy, M.: A felnőttkori heveny myeloid leukaemia korszerű kezelése.
Orv. Hetil. 153 (7), 243-249, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29304>
8. Rejtő, L., Méhes, L., Kiss, A., Telek, B., Batár, P., Reményi, G., Szász, R., **Ujj, Z.**, Udvardy, M.: Fenntartó kezelés myeloma multiplexben autológ perifériás őssejtátültetés után - eredményeink.
Hematol. Transzfuziol. 44 (1), 30-33, 2011.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,997

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 3,795

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.02.17.

