

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| Rövidítések jegyzéke | 2. oldal |
| 1. Bevezetés | 5. oldal |
| 2. Irodalmi áttekintés | 7. oldal |
| 2.1. A WT1 gén | 7. oldal |
| 2.1.1. A WT1 gén szerepe az embrionális fejlődésben | 7. oldal |
| 2.1.2. A WT1 gén szerepe az egészséges felnőtt szervezetében | 9. oldal |
| 2.1.3. A WT1 gén kettős szerepe | 9. oldal |
| 2.1.4. A WT1 gén a daganatos betegségekben | 10. oldal |
| 2.1.5. A WT1 gén immunterápiás vonatkozásai | 11. oldal |
| 2.2. A heveny myeloid leukémia | 12. oldal |
| 2.3. A diffúz nagy B sejt lymphoma | 19. oldal |
| 3. Célkitűzések | 22. oldal |
| 4. Anyagok és módszerek | 23. oldal |
| 4.1. Laboratóriumi módszerek | 23. oldal |
| 4.2. Kontroll minták | 24. oldal |
| 4.3. Statisztika | 25. oldal |
| 5. Eredmények | 26. oldal |
| 5.1. Az AML-es betegek WT1 expressziója | 26. oldal |
| 5.1.1. WT1 expresszió az AML felismerésekor | 28. oldal |
| 5.1.2. A WT1 expresszió változása az első indukciós kezelést követően | 31. oldal |
| 5.1.2.1. Az indukciós kezelés utáni három betegcsoport túlélése a WT1 expresszió változásától függően | 33. oldal |
| 5.1.2.2. Kezelési eredmények betegcsoportonként az első indukciót követően és a követés végén | 35. oldal |
| 5.1.2.3. Esetismertetések – nem APL-es betegek | 36. oldal |
| 5.1.2.4. Az APL-es betegek esetismertetése | 40. oldal |
| 5.1.3. A WT1 génexpresszió mértékének hatása a prognózisra | 41. oldal |
| 5.2. A DLBCL-es betegek WT1 expressziója | 44. oldal |
| 6. Megbeszélés | 53. oldal |
| 6.1. A Wilms tumor gén és az AML kapcsolata | 53. oldal |
| 6.1.1. A Wilms tumor gén expressziója AML-es betegeinkben | 53. oldal |
| 6.1.2. A génexpresszió meghatározása | 54. oldal |
| 6.1.3. A leukémiás betegek klinikai jellemzői | 55. oldal |
| 6.1.4. A betegség felismerésekor észlelt WT1 expresszió | 55. oldal |
| 6.1.5. A WT1 expresszió változása az indukciót követően | 56. oldal |
| 6.2. A WT1 gén és a DLBCL kapcsolata | 58. oldal |
| 6.2.1. Mintavétel DLBCL-es betegek esetén | 59. oldal |
| 6.2.2. A perifériás vérben észlelt WT1 génexpresszió lehetséges magyarázatai | 59. oldal |
| 6.2.3. A DLBCL-es betegek WT1 expressziós eredményei | 60. oldal |
| 7. Új megállapítások | 62. oldal |
| 8. Összefoglalás | 63. oldal |
| 9. Summary | 64. oldal |
| 10. Tárgyszavak | 65. oldal |
| 11. Köszönetnyilvánítás | 66. oldal |
| 12. Irodalomjegyzék | 67. oldal |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|---------|--|
| aaIPI | age adjusted IPI (életkorhoz adaptált nemzetközi prognózis osztályozási rendszer) |
| ABC | activated B cell (aktivált B sejt) |
| ABL | Abelson leukémia vírus onkogén 1 |
| AIDA | antraciklin + idarubicin |
| ALCL | anaplastic large-cell lymphoma (anaplasztikus nagy-sejtes lymphoma) |
| ALK | anaplasztikus lymphoma kináz |
| ALL | akut limphoid leukémia (heveny lymphoid leukémia - fehérvérűség) |
| AML | akut myeloid leukémia (heveny myeloid leukémia) |
| APL | akut promyelocitás leukémia (heveny promyelocitás leukémia) |
| APSCT | autologus peripheral stem cell transplantation (autológ perifériás őssejt átültetés) |
| ASXL1 | additional sex comb like transcriptional regulator 1 (kiegészítő fésű-szerű transzkripció regulátor 1 fehérje) |
| ATO | arsenic-trioxide (arzén-trioxid) |
| ATRA | all-trans retinoic acid (csupa-transz retinsav) |
| BCL-6 | B cell lymphoma protein 6 (B sejt lymphoma fehérje 6) |
| BITE | bispecific T-cell engager (bispecifikus elkötelezett T-sejt) |
| CBP | CREB binding protein (CREB-kötő fehérje) |
| CCAAT | citozin-citozin-adenozin-adenozin-timidin szekvencia |
| CD | cluster of differentiation (differenciálódási antigén) |
| CEBPA | CCAAT binding protein α (CCAAT kötő fehérje α) |
| CML | chronic myelogenous leukemia (krónikus myeloid leukémia) |
| CMR | complete metabolic remission (komplett metabolikus remisszió) |
| CR | complete remission (komplett remisszió) |
| CREB | cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (ciklikus adenozin-monofoszfát reszponzív elemet kötő fehérje) |
| CT | computer tomográfia |
| Ct | cycle threshold (ciklus küszöb) |
| CTLA-4 | cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (citotoxikus T lymphocytá asszociált fehérje 4) |
| CTLs | cytotoxic T-lymphocytes (citotoxikus T lymphocyták) |
| DFS | disease free survival (betegségmentes túlélés) |
| DIC | disseminated intravascular coagulation (diszeminált intravaszkuláris koaguláció) |
| DLBCL | diffuse large B-cell lymphoma (diffúz nagy B-sejtes lymphoma) |
| DNMT3 | DNS metil-transzferáz 3 gén |
| DNS | deoxiribonukleinsav |
| E1a | adenoviral early region 1A protein (adenovírus korai régió 1A fehérje) |
| EBV | Ebstein-Barr vírus |
| ETO | eight-twenty-one gene (821 gén) |
| EVII | ecotropic virus integration site 1 protein (ecotropic vírus integrálódó fehérje 1) |
| FAB | French-American-British (francia-amerikai-angol osztályozási rendszer) |
| FLAGIDA | fludarabine-cytosine-arabioside-GCSF-idarubicine (fludarabin-citozin-arabinozid-GCSF-idarubicin) |
| FLT3 | fms like tyrosine kinase (fms szerű tirozin-kináz) |
| GA101 | obinutuzumab |
| GAPDH | gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz |

| | |
|-----------|--|
| GC | germinális centrum |
| GEP | gene expression profiling (génexpresszió elemzés) |
| GVHD | graft versus host disease (graft versus host betegség) |
| HAM | high dose cytosine-arabinoside and mitoxantrone (nagy dózsisú citozin-arabinozid és mitoxantron) |
| HGB | hemoglobin |
| HHV8 | humán herpesz vírus 8 |
| HLA | humán leukocita antigén |
| IDA | idarubicin |
| IDH1/IDH2 | izocitrát dehidrogenáz 1/2 |
| IGEV | ifoszfamid + gemcitabin + vinorelbin |
| IPI | International Prognostic Score (nemzetközi prognózis osztályozási rendszer) |
| IRF8 | interferon regulatory factor 8 (interferon reguláló faktor 8) |
| ITD | internal tandem duplikáció |
| IVLBCL | intravascular large B-cell lymphoma (intravasculáris nagy B-sejtes lymphoma) |
| JM | juxtamembrán |
| KIT | CD117 receptor tirozin-kináz |
| KTS | lizin-treonin-szerin tripeptid szekvencia |
| LDH | laktát dehidrogenáz |
| MALT | mucosa associated lymphoid tissue (nyálkahártyához kötött nyirokszövet) |
| MCL | mantle cell lymphoma (köpenysejtes lymphoma) |
| MDS | myelodysplastic syndrome (myelodysplasiás szindróma) |
| MGG | May-Grünwald Giemsa festés |
| MLL | mixed lineage-leukemia (kevert sejtvonalas leukémia gén) |
| MLL-PTD | MLL partial tandem duplication (MLL gén részleges tandem duplikáció) |
| MRD | minimal residual disease (minimális reziduális betegség) |
| mRNS | messenger ribonukleinsav |
| mTOR | mammalian target of rapamycin (emlős rapamycin célfehérje) |
| MUD | matched unrelated donor (HLA identikus „nem-rokon” donor) |
| MUM1 | multiple myeloma oncogene 1 (multiplex myeloma onkogén 1) |
| NHL | nem-Hodgkin lymphoma |
| NOS | not otherwise specified (másként nem osztályozható) |
| NPM1 | nucleophosmin gén |
| ORR | overall response rate (teljes válaszadás aránya) |
| OS | overall survival (teljes túlélés) |
| PBL | plazmablastos lymphoma |
| PCLBCL | primer cutan large B-cell lymphoma (primer cutan nagy B-sejtes lymphoma) |
| PD1 | programmed cell death 1 protein (programozott sejthalál 1 fehérje) |
| PDL1 | programmed cell-death ligand 1 (programozott sejthalál ligand 1) |
| PEL | primer effúzionális lymphoma |
| PET-CT | pozitron emissziós tomográfia-komputertomográfia |
| PHF6 | PFD finger protein 6 (PFD ujj fehérje 6) |
| PMBL | primer mediastinal B-cell lymphoma (primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma) |
| PML/RARA | promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α (promyelocytás leukémia/retinoidsav receptor α) |
| PR | parciális remisszió |
| PTCL | peripheral T-cell lymphoma (perifériás T-sejtes lymphoma) |

| | |
|---------|--|
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (quantitatív reverz transzkripció polimeráz lánreakció) |
| R-BEAM | rituximab + etopozid + citozin arabinozid + melphalan |
| RA/RXR | retinoic acid/retinoic X receptor α (retinsav/retinoid X receptor α) |
| R-CHOP | rituximab + ciklofoszfamid + hidroxidaunorubicin + oncovin + prednisolon |
| R-DHAP | rituximab + dexamethason + citozin arabinozid + cisplatin |
| R-ICE | rituximab + ifoszfamid + carboplatin + etopozid |
| RNS | ribonukleinsav |
| RTK | receptor tirozin-kináz |
| RUNX1 | runt-related transzkripció faktor 1 |
| SGI110 | guadecitabine (hypometiláló szer) |
| SLE | szisztémás lupus erythematosus |
| SOX9 | SRY box 9 protein (SRY doboz 9 fehérje) |
| SRY | sex-determining region of Y (nemet meghatározó régió az Y kromoszómán) |
| T/HRBCL | T-cell/histiocita rich B-cell lymphoma (T-sejt/histiocita gazdag B-sejtes lymphoma) |
| TAA | tumor associated antigen (tumor asszociált antigén) |
| TET2 | metilcitozin dehidrogenáz 2 gén |
| TK | tyrosine kinase (tirozin-kináz) |
| TKD | tirozin-kináz domén |
| TP53 | tumor protein 53 |
| VOD | veno-occlusive disease (veno-okkluzív betegség) |
| WAGR | Wilms tumor, aniridia, gonadoblastoma, mentális retardáció szindróma |
| WHO | World Health Assotiation (Egészségügyi Világszervezet) |
| WT1 | Wilms tumor 1 |
| Z-BEAM | zevalin + BCNU carmustin + etopozid + citozin arabinozid + melphalan |

1. Bevezetés

A WT1 gént először 1990-ben izolálták gyermekkorban előforduló vese eredetű daganatból, a Wilms tumorból (Gessler M, 1990). Kezdetben tumorszupresszor génként tartották számon, azonban mára már ismert, hogy onkogénként is szerepet játszik bizonyos rosszindulatú betegségek, például a heveny leukémiák kialakulásában (Huff V, 2011). Több tanulmány próbálta feltárni a gén működését, amint onkogénként vagy tumorszupresszorként fejti ki hatását, de a mechanizmus teljesen a mai napig nem ismert, feltehetően az adott sejttípustól függően a WT1 fehérje funkciója különböző kofaktorokhoz kötődve módosulhat (Sugiyama H, 2010). Ismert, hogy a génnek szerepe van az egyedfejlődésben, fiziológiásan az embrionális szervezet számos sejtje mutat WT1 expressziót. Átmeneti embrionális WT1 expressziót követően később már nem, vagy csak kismértékű expressziója mutatható ki egészséges felnőttek bizonyos szöveteiben. Felnőttkorban a podocyták normális működésének fennmaradását biztosítja, és részt vesz a hemopoiesis szabályozásában is (Hastie ND, 2012).

Az utóbbi évtizedben a kutatók mellett a klinikusok figyelme is a WT1 gén felé fordult. A 90-es évektől több, klinikusokból álló munkacsoport vizsgálta a gén szerepét szolid tumorokban (Hastie ND, 1993). Ismert, hogy jelentősége van az onkogenesisben emlő-, tüdő-, vastagbél-, és hasnyálmirigyrák esetén is, de pontos szerepe még nem tisztázott. A WT1 gén felfedezését követően már két évvel közölték, hogy heveny leukémiákban és myelodysplasiás szindrómában egyaránt kimutatható expressziója a betegek többségében. Bár a pathogenezisben szerepe elfogadott, pontos funkciója nem ismert. AML-ben (heveny myeloid leukémiában) kezdetben fontos prognosztikai markernek tartották, mely nagy expressziós szint mellett rossz prognózisra utal. Mára ez a nézet sokat változott, ellentmondásos eredmények jelennek meg az irodalomban, de elmondható, hogy a kezdeti WT1 expresszió nem jár feltétlenül rövidebb túléléssel. A betegek követése során a WT1 gén meghatározás ennek ellenére jól alkalmazható, felhasználható a remisszióba került betegeknél a minimális reziduális betegség monitorozásában (Candoni A, 2011; Miyawaki S, 2010; Di Grazia C, 2016; Rossi G, 2016). Annak ellenére, hogy a WT1 gén és a leukémiák kapcsolatát számos kutatás és klinikai vizsgálat igazolta, a WT1 génexpresszió jelenlétét a malignus lymphomák esetén kevésbé vizsgálták, így erről alig áll adat rendelkezésünkre. A WT1 gén jelenléte a lymphomák kialakulására is hatással lehet, ennek részletei azonban nem ismertek (Drakos E, 2005). Mind a szolid daganatokban, mind a malignus hematológiai kórképekben számos tanulmány vizsgálja a WT1 gén ellenes antitesttel történő vakcináció lehetőségeit, akár más gyógyszerekkel kombinációban, leukémiában akár őssejt transzplantációt követően használva, de az eddig publikált eredmények még nem alkalmasak egyértelmű hosszútávú következtetések levonására (Brayer J, 2015; Di Stasi A, 2015; Casalegno-

Garduno R, 2016). A jövőben birtokunkba kerülő WT1-gyel kapcsolatos új ismeretek, terápiás eredmények remélhetően utat nyitnak a malignus betegségek kezelésében történő jelentős javulásnak.

Összességében tehát elmondható, hogy a gén legtöbb funkciója a mai napig nem teljesen tisztázott, az ismert mechanizmusok részletei is további vizsgálatokat igényelnek. Ismereteink bővülésével a felnőtt és gyermekkori leukémiák és lymphomák prognózisának meghatározásában, követésében és kezelésében lehet szerepe a WT1 gén pontosabb megismerésének.

Munkánk során vizsgáltuk a klinikánkon AML-el és DLBCL-el kezelt betegek perifériás vérmintáinak WT1 expresszióját, az expresszió és a betegek túlélésének kapcsolatát, illetve a WT1 gén alkalmazhatóságát a remisszióban lévő betegek relapszusának igazolására és előrejelzésére.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *WT1* gén

A *WT1* gént 1990-ben izolálták gyermekkori vesedaganatban – Wilms tumorban – szenvedő gyermek mintájából (Gessler M, 1990). A gén a 11-es kromoszóma rövid karján (11p13) helyezkedik el. Tíz exonból áll, egy cink-ujj fehérjét kódol, mely transzkripciós faktorként a DNS-hez kötődve meghatározott gének aktivátora vagy szupresszora lehet (Madden SL, 1991). A *WT1* funkciója különböző sejtekben bizonyos transzkripciós kofaktor fehérjék jelenlététől függ, mint például a CBP (CREB-kötő fehérje), vagy az E1a fehérje (Essafi A, 2011). A gén által kódolt fehérje minden gerinces élőlényben megtalálható, többértű funkciója a 36 ismert izoformájának is köszönhető (Hohenstein P, 2006). Egy, a gén 9. exona által kódolt szakaszának ismerten szerepe van a fehérje működésében, ez alapján jelen van, vagy kimarad a fehérjéből egy lizin-treonin-szerin (KTS) tripeptid szekvencia (Hohenstein P, 2006). A KTS pozitív és KTS negatív fehérje izoformák aránya a különböző szövetekben konstans módon 2:1 (Wagner KD, 2003). Magának a KTS tripeptidnek döntően az RNS-hez való kötődésben lehet szerepe (Ladomery M, 2003), a fehérje KTS pozitív izoformájának emellett feltehetően az RNS-ek sejtmagba történő szállításában (nukleáris exportjában) és átírásában (transzláció) is funkciója van (Bor YC, 2006). A *WT1* fehérje tehát nem csak transzkripciós faktorként működik, hanem fehérje-fehérje és fehérje-RNS kapcsolatok révén szerepe van a poszttranszkripciós szabályozásban is, melyben döntő jelentősége a *WT1* KTS pozitív izoformájának van (Morrison AA, 2008). A többi izoprotein formához eddig nem sikerült konkrét funkciót társítani (Wagner KD, 2003).

2.1.1. A *WT1* gén szerepe az embrionális fejlődésben

A korai embrionális fejlődés során számos szövetben jelenik meg *WT1* expresszió (vesék, gonádok, lép, csontvelő, tüdő, szív, erek, bél, simaizom, gerincvelő) (Dennis SL, 2002), míg születést követően nem, vagy csak az urogenitalis rendszerben, a központi idegrendszerben és a hematopoiesisben szerepet játszó szövetekben észlelhető minimális mennyiségű expressziója (Chau YY, 2012).

Az urogenitalis rendszer fejlődése

A WT1 gén elengedhetetlen az embrionális vese fejlődésében (Kreidberg JA, 1993). A fejlődés során a maradandó vese (metanephros) WT1 expressziója szerepet játszik a nem differenciált mesenchymalis sejtek epithelialis átalakulásában (tranzíció). Ez az epithelialis átalakulás szükséges a nephronok kialakulásához (Davies JA, 2004). A mesenchymalis sejtek átalakulása nélkül (knockout egerekben) a nephronok teljes hiánya észlelhető (Essafi A, 2011). A WT1 expressziójának zavara vese fejlődési rendellenességhez, akár Wilms tumor kialakulásához is vezethet (Guo JK, 2002). Emellett a vese működésének fenntartásában is feltételezik a gén szerepét, a glomerulusok podocytaiban felnőttkorban is észlelhető expressziója alapján (Guo JK, 2002).

A WT1 gén expressziója a gonádok fejlődése során is kimutatható az ováriumok és a herék körüli epithelialis sejtrétegben és a gonadalis mesenchymában (Parenti R, 2014). Az Y kromoszómán helyezkedik el az SRY gén, melynek jelenlétében férfi irányú fejlődés indul meg. Az SRY gén expresszióját más génekkel (pl. SOX9) összhangban a WT1 gén is befolyásolja (Guo JK, 2002).

A szív és erek fejlődése

A szív embrionális fejlődése során erős WT1 expresszió mutatható ki (Parenti R, 2013). Igazolták a WT1 gén szerepét a myocytá sejtek proliferációjának szabályozásában és a coronaria erek kialakulásában is (Moore AW, 1999; Scholz H, 2005). A szív mellett a fejlődő erek endotheliumában is kimutatható, újabb adatok szerint a daganatok vascularizációjában is közrejátszik (Trindade F, 2011). Lezajlott myocardialis infarktust követően pedig a neovascularizációban is van szerepe (Wagner KD, 2003).

A tüdő és légutak fejlődése

A gén részt vesz a mellhártyát képző mesothelium kialakulásában (Que J, 2008). Knockout egerekben WT1 génexpresszió hiányában tüdő fejlődési rendellenességek, kóros tüdőlebeny fúzió alakul ki (Loo CK, 2012).

Egyéb szervek és szövetek fejlődése

A WT1 gén expressziója a korai gestációs hetekben kimutatható a mesothelium sejtjeiben, így feltehetően részt vesz a peritoneum és a hasúri szerveket borító serosus hártya kialakításában (Parenti R, 2013). Fontos a máj fejlődése során, a májsejtek fejlődését a RA/RXR α (retinsav/retinoid X receptor α) útvonalon keresztül regulálja (Ijpenberg A, 2007). Erős WT1 expresszió mutatható ki

embrionális korban a harántcsíkos izmokban, mely a 20. gesztációs hétre eltűnik (Parenti R, 2015). Az agy és gerincvelő ependymalis sejtjei is mutatnak WT1 expressziót. Bár a mechanizmus nem ismert, de a génnek szerepe lehet az agykéreg, gerincvelő és a perifériás idegek fejlődésében egyaránt (Parenti R, 2014).

2.1.2. A WT1 gén szerepe az egészséges felnőtt szervezetében

Az embrionális korban számos sejt rendelkezik WT1 expresszióval, ez alapján a gén fontos szerepét feltételezik az organogenezisben. Az expresszió a fejlődés során megszűnik, egészséges felnőtt szervezetben csak kevés szervben vagy szövetben mutatható ki, de az ismert adatok arra utalnak, hogy bizonyos sejtek kis mennyiségű WT1 expressziója szükséges azok élettani funkciójának fenntartásához. (Mundlos S, 1993). A felnőtt vese podocytaiban több tanulmány is igazolta jelenlétét, feltehetően szerepe a normális funkció fenntartásában lehet, defektusa esetén glomerulonephritis kialakulását észlelték (Guo JK, 2002). A gonádok Sertoli és granulosa sejtjeiben, a mesotheliumban, valamint a csontvelői sejtek - a haemopoetikus őssejtek – kb. 1%-ban is észlelhető még génexpresszió (Guo JK, 2002; Chau YY, 2012). Annak ellenére, hogy a tumorok vascularizációjában feltételezik szerepét, valamint myocardialis infarktust követő regeneráció során is mérhető WT1 génexpresszió, az egészséges kardiovaszkularis rendszerben nem sikerült a gén kifejeződését alátámasztani (Trindade F, 2011). Egér kísérletekben WT1 deléció indukálását követően tíz napon belül súlyos glomerulosclerosis, lép és exogén pancreas atrófia, gyors csont-és zsírszövet csökkenés és vérképzési zavarok alakultak ki (Chau YY, 2011).

2.1.3. A WT1 gén kettős szerepe

A Wilms tumor megismerését követően a WT1 gén tumorszupresszor géneként került leírásra, később pedig – elsősorban a leukemogenesis kapcsán – onkogén szerepe is nyilvánvalóvá vált (Huff V, 2011). Működésének megértéséhez a nephrogenesis, a hematopoesis, illetve a Wilms tumor és a leukémiák, szolid daganatok genetikájának megismerése vezethet. Wilms tumor esetén a gén működésének kiesése vonhatja magával a daganat kialakulását, míg leukémia vagy más szolid daganat esetén inkább a kóros génexpresszió állhat az onkogenezis hátterében (Huff V, 2011). A WT1 gén kétirányú hatása feltehetően a jelen lévő kofaktoroktól, a kapcsolt gének működésétől, az adott sejtípustól és a differenciálódás fokától függően alakul ki, és így viselkedik tumorszupresszorként vagy onkogénként (Sugiyama H, 2010).

2.1.4. A WT1 gén a daganatos betegségekben

Wilms tumor/nephroblastoma

Bár a WT1 gén, mint tumorszupresszor gén felfedezése a Wilms tumorhoz köthető, deléciója csak a tumorok 20%-ban mutatható ki (Huff V, 2011; Smith MA, 2014; Huang JL, 2015). Több gyermekkorban vagy fiatal felnőttkorban felismerésre kerülő szindróma is ismert, melyekben előfordul a vesék Wilms tumora, így a WT1 génnek ezen szindrómák kialakulásában is szerepe lehet. Ilyen a WAGR szindróma (Wilms tumor, aniridia, gonadoblastoma és mentális retardáció), ahol ismert genetikai háttér a 11p13 kromoszóma heterozigóta deléciója (Akagi T, 2015). Szintén a WT1 gén mutációja igazolódott a Wilms tumorra és urogenitalis abnormalitással járó Denys-Drash, ill. gonadoblastomával és veseelégtelenséggel járó Frasier szindróma esetén is (Huff V, 1996; Koziell A, 2000).

Szolid daganatok

Az utóbbi évtizedben több kutatócsoport is foglalkozott a felnőttkori daganatok és a WT1 gén lehetséges összefüggéseivel (Parenti R, 2015). Nem ismert az a mechanizmus, amellyel a gén az adott daganat kialakulásához vezet, de a tumoros angiogenesisben és metasztázis képzésben szerepe felmerül (Trindade F, 2011). Több mesothelium eredetű daganat esetén feltételezhető a WT1 gén szerepe, mint például a mesotelioma, ovárium tumorok, vagy a Sertoli sejtes daganatok (Zhao C, 2007). Over expressziója rhabdomyosarcoma esetén is leírásra került (Salvatorelli L, 2011), emellett emlőrákban (Qi XW, 2015), colorectalis rákban (Miyata Y, 2015), pancreas carcinomában (Takakura K, 2015) és nem-kissejtes tüdőrákban (Wang X, 2013) is igazolták expresszióját, bár a daganatok kialakulásában játszott szerepe ezekben az esetekben sem ismert. Colorectalis és emlődaganatokban, valamint nem-kissejtes tüdőrák esetén prognosztikai szerepe bizonyított (Qi XW, 2015).

Malignus hematológiai kórképek

A rosszindulatú hematológiai betegségek közül AML-ben vizsgálták leggyakrabban a WT1 jelentőségét és prognosztikai értékét. A gén felfedezése után már két évvel igazolták fokozott expresszióját AML-ben és ALL-ben (heveny lymphoid leukémiában) szenvedő betegek mintáiban (Miwa H, 1992). A leukémia patogenezisében szerepe ugyan elfogadott, de ennek molekuláris részletei nem tisztáztak. Egy lehetséges magyarázat szerint a WT1 blokkolja az interferon reguláló faktor 8 (IRF8) expresszióját, mely tumorszupresszorként szerepel a leukemogenesisben (Vidovic K, 2010). Egerekben és in vitro, humán leukémás sejtekkel végzett vizsgálatok alapján igazolható, hogy a

hemopoetikus pluripotens őssejtek kis százalékban (1-1,2%) szintén exprimálják a WT1 gént. Ezek érés közbeni down-regulációja normális szövet-specifikus sejt differenciálódást eredményez, míg ha ez a down reguláció elmarad – feltehetően más genetikai eltérések közbenjárásával – további proliferáció és daganatos transzformáció alakul ki (Hosen N, 2002). Ezen kívül bizonyos AML szubtypusokban, ahol igen alacsony a WT1 expresszió, a tumorszuppresszor hatás abszolút, vagy relatív csökkenése, illetve kiesése is szerepet játszhat a leukemogenezisben (Heesch S, 2010).

A korai tanulmányokban nem volt egyértelmű a WT1 prognosztikai szerepe AML-ben (Gaiger A, 1998). Jelenleg a legtöbb szerző egyetért abban, hogy nem a diagnóziskor észlelt WT1 pozitivitásnak van döntő prognosztikai értéke (Noronha SA, 2009; Mossallam GI, 2013; Yi-Ning Y, 2015). A remissziót elért betegek minimális reziduális betegségének (MRD) követésében viszont hasznos marker (Candoni A, 2011; Shibasaki Y, 2015; Malagola M, 2016; Rossi G 2016). A WT1 expressziója ugyanis az életkortól, az AML altípustól és citogenetikai rizikócsoporttól független paraméterként jelezheti a relapszust. (Cilloni D, 2004; Rossi G, 2016). Arra vonatkozóan azonban nincsenek teljesen egyértelmű adatok, hogy az újonnan megjelenő expresszió mértéke befolyásolja-e a kiújuló betegség agresszivitását. Kevés tanulmány meghatározta ugyan a kóros expresszió küszöbértékét, az e fölötti expresszió relapszus mértékére gyakorolt hatását nem tudták egyértelműen alátámasztani (Polak J, 2012).

Gyermekekori és felnőttkori ALL-ben is vizsgálták a gén szerepét, de prognosztikai markerként nem találták egyértelműen használhatónak, mivel több nagy esetszámú tanulmány sem észlelt szignifikáns túlélésbeni különbséget a gént exprimáló és nem exprimáló betegek között (Sadek HA, 2011).

Myelodysplasiában (MDS) szenvedő betegeknél is igazolták a WT1 génexpresszió jelenlétét, amelynek egyéb, egy-, vagy többvonalas citopéniával járó kórkép differenciál diagnosztikájában is szerepe lehet (Baba M, 2015). Idegen donoros őssejt átültetést követően pedig a relapsus monitorozásában is igazoltan hasznos (Yoon JH, 2015).

A WT1 lymphomákkal való kapcsolatáról kevés adat áll rendelkezésre. WT1 expressziót igazoltak Hodgkin lymphomában (Vadasz Z, 2012), valamint Burkitt lymphomában, DLBCL-ben és ALCL-ben (anaplasztikus nagy-sejtes lymphomában) is, de az expresszió prognosztikai értékét még nem vizsgálták (Drakos E, 2005).

2.1.5. A WT1 gén immunterápiás vonatkozásai

Bár a WT1 gén kezdetben tumorszuppresszorként vált ismertté, később onkogén szerepe is elfogadottá vált (Sugiyama H, 2005). In vitro kísérletekben humán daganatsejtek növekedését gátolták

a WT1 gén ellenes antisense oligomerekkel (Yamagami T, 1996). Ezen kísérletek alapja az a feltevés volt, hogy a leukémiás blast sejtek és a szolid daganatsejtek magas WT1 expressziója megfelel tumor asszociált antigénnek (TAA), mely WT1 specifikus citotoxikus T sejt (CTLs) választ indukálhat. Egér kísérletekben a WT1 specifikus citotoxikus T sejtek elpusztították a WT1 expressziót mutató daganatszövetet (Gao L, 2003). Ezen vizsgálatok alapján felmerül a WT1 ellenes immunitás lehetséges szerepe is. Egy 2009-ben publikált nemzetközi vizsgálat 75 antigént vizsgált abból a célból, hogy meghatározzák a tumorelles terápia ideális targetjeit (Cheever MA, 2009). Az antigének több jellemzőjét hasonlították össze, úgymint specificitás, immunogenitás és expressziós szint. Bár egyik antigén sem felelt meg tökéletesen az összes vizsgálati szempontnak, az antigének között felállított rangsor első helyén a WT1 állt.

Az első fázis I klinikai vizsgálat 2001-ben indult. AML-ben, MDS-ben, emlő- és tüdőrákban szenvedő betegeknél végeztek hatékony immunterápiát, WT1 ellenes vakcinációt (Oka Y, 2004). Jelentős WT1 expresszió csökkenés volt elérhető az MRD pozitív remisszióba került AML-es, tüdő-, ill. emlőrákban szenvedő betegekben. MDS-ben súlyos leukopenia alakult ki, az azonos dózisban adott immunterápia mellett (Oka Y, 2004). Ezek alapján elmondható, hogy az egyébként egészséges vérképzéssel rendelkező betegek (szolid daganatok esetén) WT1 vakcinációja kellőképpen biztonságos volt, de a sérült vérképzéssel járó MDS esetén alacsonyabb dózisban alkalmazandó a WT1 peptid vakcináció (Oka Y, 2003). További vizsgálatok történtek az elmúlt években glioblastomában, vesesejtes carcinomában, myeloma multiplexben is. Gyermekkori rhabdomyosarcomában is sikeresen alkalmaztak már WT1 ellenes immunterápiát (Sugiyama H, 2010). Több vizsgálat történt 2004 és 2016 között AML-es betegek WT1 ellenes immunizációjával kapcsolatban, ahol a vakcinával kezelt betegek OS-nek hónapokkal történő javulását tapasztalták (Brayer J, 2015; Di Stasi A, 2015; Casalegno-Garduno R, 2016). Emellett feltételezhető, hogy szintetikus WT1 analóg peptidok előállításával, a WT1 immunizáció checkpoint inhibitor (CTLA-4 vagy PD1 gátlók) kezelés kiegészítésével (Brayer J, 2015), vagy bispecifikus T-sejt engager (BiTE) antitestekkel (Dao T, 2015) a jövőben tovább javuló eredmények érhetőek el, ami a kezelés széles körű alkalmazásához vezethetne.

2.2. A heveny myeloid leukémia

A heveny myeloid leukémia (AML) a WHO 2000-es definíciója szerint a myeloid blast sejtek klonális, heveny lefolyású proliferációja (>20%) a csontvelőben, vérben, esetleg más szövetekben (Vardiman JW, 2002). A kóros hemopoetikus őssejtek fokozott proliferációja, és differenciálódási képességük elvesztése eredményezi a leukémiás blast sejtek felszaporodását. A betegség 50 éve gyógyíthatatlan volt, napjainkban kemoterápiával és őssejt átültetéssel a 60 évnél fiatalabb betegek kb.

40%-a, a 60 évnél idősebb betegek 5-15%-a gyógyítható meg, vagy lehet tartós túlélő (Marcucci G, 2011). Az AML klinikai tüneteit a csontvelői elégtelenség, azaz a neutrophil granulocyták, a thrombocyták és a vörösvérsejtek hiánya eredményezi. Ezek következtében a betegeknél anémia, fertőzések és vérzékenység észlelhető. Diagnosztikájában a klasszikus csontvelő és perifériás vérkép morfológia, valamint a mennyiségi vérkép vizsgálata mindenkor elengedhetetlen. AML esetében a csontvelőben a myeloblastok aránya eléri, vagy meghaladja a 20%-ot. A blast sejtek antigénjeinek áramlási citometriai vizsgálata ma nélkülözhetetlen, melynek során az ún. myeloid markerek (CD13; CD14; CD33; CD34; CD117 és citoplazmatikus myeloperoxidase) mellett a lymphoid markerek (pl. CD3 és CD7) jelenléte, vagy hiánya is vizsgálandó. A prognózis előrejelzéséhez és a kezelés megválasztásához, az őssejt átültetés szükségességének megítéléséhez is elengedhetetlen a kromoszóma eltérések citogenetikai elemzése és a molekuláris genetikai módszerek is egyre nagyobb szerephez jutnak (Marcucci G, 2011; Copelan EA, 2015).

Az AML osztályozása hosszú évekig (1985-2001) az ún. French-American-British (FAB) morfológiai alapú beosztáson alapult. Ezt váltotta az új évezred elején a WHO klasszifikációja (**1. táblázat**), melynek revíziója már molekuláris markerekkel egészíti ki az AML klasszifikációját (Arber DA, 2016).

Ez utóbbi különbözik a FAB-tól: a blast határértéket 20%-ra csökkentette a csontvelőben; figyelembe veszi az AML-t megelőző myelodysplasiát, myeloproliferatív betegséget, vagy citosztatikus kezelést, realizálja a dysplasia jelentőségét. Bizonyos nem random citogenetikai és molekuláris eltéréseknek (pl. t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16) és 11q23) külön kategóriát alkot, és új morfológiai altípusokat is leír, így a jelzett genetikai eltéréseknek meghatározó prognosztikai jelentőséget ad. Ezzel előrevetíti, hogy a genetika és a molekuláris genetika egyre nagyobb jelentőségűvé válik (Milligan DW, 2006).

1.táblázat Az akut myeloid leukémia WHO szerinti osztályozása (2016)

| Akut myeloid leukémia visszatérő genetikai eltérésekkel |
|--|
| AML, t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 |
| AML, inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 |
| APL (heveny promyelocitás leukémia) , PML-RARA |
| AML, t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A |
| AML, t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 |
| AML, inv(3)(q21.3q26.2) vagy t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM |
| AML, (megakaryoblastos) t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 |
| Provizórikus entitások: AML, BCR-ABL1 |
| AML, NPM1 mutáció |
| AML, biállélikus CEBPA mutáció |
| Provizórikus entitások: AML, RUNX1 mutáció |
| |
| Akut myeloid leukémia myelodysplasiával társuló változásokkal |
| |
| Terápiához társuló myeloid neoplasiák |
| |
| „Másként nem osztályozható” AML, FAB-osztályozás |
| |
| AML minimálisan differenciált |
| AML érés jelei nélkül |
| AML érési jelekkel |
| AML myelomonocytás |
| AML monoblastos, monocytás |
| AML erythroid, erythroblastos |
| AML megakaryoblastos |
| Akut basophil leukémia |
| Akut panmyelosis myelofibrosissal |
| |
| Myeloid sarcoma |
| |
| Myeloid proliferáció Down szindrómához kötötten |
| |
| Átmeneti abnormális myelopoiesis |
| Down szindrómához asszociált myeloid leukémia |
| |
| Bizonytalan sejteredetű akut myeloid leukémia |
| |
| Differenciálatlan akut leukémia |
| Kevert fenotípusú akut leukémia, t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 |
| Kevert fenotípusú akut leukémia, t(v;11q23.3); MLL |
| Kevert fenotípusú akut leukémia, B/myeloid, NOS |
| Kevert fenotípusú akut leukémia, T/myeloid, NOS |

A kromoszóma eltéréseik alapján a betegek kedvező, intermedier I, intermedier II és kedvezőtlen csoportba sorolhatóak (**2. táblázat**) (Mrózek K, 2012). Emellett a frissen diagnosztizált AML-es beteg prognózisát alapvetően a beteg életkora, általános állapota, a folyamat primer vagy szekunder jellege, a genetikai eltérések, az indukciós kezelésre adott válasz és az elért remisszió mélysége határozzák meg (Juliusson G, 2009). Az életkor nagyon fontos tényező, a 60 év feletti betegek kezelésének eredményei és életkilátásai lényegesen kedvezőtlenebbek, mint a fiatalabbaké. A fenti tényezőkön kívül a kezdeti fehérvérsejt szám, CD34 pozitivitás és MRD prognosztikai szerepét is ismerjük (Sekeres MA, 2004).

2.táblázat Az AML prognosztikai csoportosítása citogenetika és molekuláris markerek alapján

| |
|--|
| <u>jó prognózis</u> |
| t(8;21)(q22;q22) |
| inv(16)(p13.1q22) vagy t(16;16)(p13.1;q22) |
| NPM1 mutáció FLT3-ITD nélkül (normál karyotípus) |
| CEBPA mutáció (normál karyotípus) |
| <u>intermedier I prognózis</u> |
| NPM1 és FLT3-ITD mutáció (normál karyotípus) |
| vad típusú NPM1 és FLT3-ITD (normál karyotípus) |
| vad típusú NPM1 FLT3-ITD nélkül (normál karyotípus) |
| <u>intermedier II prognózis</u> |
| t(9;11)(p22;q23), MLLT3-MLL |
| citogenetikai eltérések, melyek nem jó, vagy a rossz prognosztikusak |
| <u>rossz prognózis</u> |
| inv(3)(q21q26.2) vagy t(3;3)(q21;q26.2) |
| t(6;9)(p23;q34) |
| t(v;11)(v;q23) |
| -5 vagy del(5q) |
| -7 |
| abnl(17p) |
| komplex karyotípus eltérés |

A leggyakoribb prognosztikai jelentőséggel bíró molekuláris markerek a következők (Celalettin U, 2006):

FLT3 (Fms-like tirozin-kináz)

Az FLT3 gén egy III-as típusú tirozin-kináz aktivitással bíró receptor génje, ami a 13-as kromoszómán helyezkedik el. Normális esetben fontos szerepet játszik a hemopoesis korai lépéseinek, a vérbépző őse-, és progenitor sejtek proliferációjának, differenciálódásának és apoptózisának szabályozásában. Nakao és mtsai közölték először 1996-ban az FLT3 gén JM domain-jének internal tandem duplikációját (ITD). Ezt később többen igazolták, előfordulási aránya AML-ben 20-30%-nak adódott (Small D, 2006). Az ITD-n kívül a kináz domain pontmutációi is ismertek, melyek gyakorisága 10% körüli. Az FLT3 ITD-vel rendelkező AML-es betegek betegségmentes túlélése (DFS) és teljes túlélése (OS) szignifikánsan rosszabb, mint a mutációval nem rendelkezőké (Port M, 2014). Normál karyotípus mellett észlelt FLT3 ITD pozitívitás esetén allogén őssejt transzplantáció javasolt, bár transzplantációt követően is nagyobb ezekben a betegekben a relapszus aránya. Az utóbbi években nagy érdeklődés alakult ki az FLT3 ITD mutációt célzó FLT3 inhibitor gyógyszerek irányába (pl. sorafenib), melyek új terápiás lehetőséget jelenthetnek, főleg kombinációban a kezelés javulását eredményezhetik.

NPM1 (nucleophosmin 1)

A NPM1 egy foszfoprotein, melynek szerepe van a riboszóma biogenezisében, mitózis során a centroszóma duplikációjában, sejtproliferációban és apoptózisban. Leggyakoribb mutációja egy négy bázispárból álló inszerció, mely normál karyotípus esetén 50-60%-ban észlelhető, így a leggyakoribb mutáció AML-ben. Mutációjának jelenléte jó prognózist jelöl. (Port M, 2014)

CEBPA (CCAAT enhancer binding protein)

A CEBPA egy transzkripciós faktor, amely a neutrophil sejtek differenciálódásában játszik szerepet. Mutációja normál karyotípus esetén kb 10%-ban észlelhető, jó prognózist mutat (Port M, 2014).

KIT

KIT tirozin-kináz receptor, mely a sejtek proliferációjában és a differenciálódásban játszik szerepet. Az összes akut myeloid leukémiás eset 2-14%-ban észlelhető mutációja, mely rossz prognózisra utal (Yohe SJ, 2015).

MLL (mixed lineage leukemia/lysine-specific methyltransferase)

Az MLL gén 4-14%-ban mutált és rossz prognózissal társul (Gole B, 2015).

WT1 (Wilms Tumor gén)

AML-ben 4-11%-ban igazolt mutációja, melyet kezdetben egyértelműen kedvezőtlen prognosztikai markernek tartottak, azonban ezt a későbbi vizsgálatok már nem támasztották alá egyértelműen (Yi-Ning Y, 2015; Rampal R, 2016; Toogeh G, 2016). Az over expresszió – amely az AML-es betegek 73-93%-ban kimutatható – az MRD vizsgálatára és a relapszus előrejelzésére alkalmazható (Cilloni D, 2004; Owen C, 2010; Candoni A, 2011; Casalegno-Garduno R, 2016; Malagola M, 2016; Rossi G 2016). A WT1 gén mutációja és expressziója közötti összefüggés a mai napig nem tisztázott. A leukémiákat tekintve sem a fokozott WT1 expresszió nem jár feltétlenül a WT1 gén mutációjával, míg az sem szükségszerű, hogy a WT1 mutációja esetén fokozott génexpresszió jelenjen meg. Heesch és mtsai (2010) T-ALL-ben a kis, vagy hiányzó WT1 expresszió mellett csak egy betegnél észlelték a WT1 gén egyidejű mutációját, mely inkább azt támasztaná alá, hogy a fokozott génexpresszióval nem rendelkező betegekben nem jellemző a gén mutációja sem. Ugyanakkor kínai szerzők adatai szerint a WT1 gén mutációját hordozó betegekben a WT1 expressziós szintje ugyan emelkedett volt a kontrollhoz képest, de mégis kisebb, mint WT1 gén vad típusával bíró AML-es betegekében (Luo CK, 2014).

Egyéb, rutinszerűen még nem vizsgált molekuláris markerek a TET2, TP53, RUNX1, PHF6, IDH1, IDH2, ASXL1, MLL-PTD, DNMT3, EVI1. A prognózis további pontosításában a génexpressziós profil (GEP) vizsgálata is segítségünkre lehet hamarosan.

A felnőttkori AML optimális kezelése 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 túléléssel és a teljes túlélés időtartamával jellemezhetjük (Milligan DW, 2006).

Az indukciós kezelés legelterjedtebb formája a standard "3+7" protokoll: daunorubicin (Dauno) vagy idarubicin (IDA) 3 napig, illetve cytozin arabinozid (araC) tartós infúzióban 7 napon át. Egy vagy két "3+7" indukciós kezeléssel a 60 évesnél fiatalabb betegekben 50-80%-ban érhető el CR (Yanada MG, 2008).

A remisszióba került betegeknél további kezelésre van szükség, melynek célja a leukémiás sejtpopuláció további csökkentése. A kezelésnek ezt a fázisát konszolidációnak nevezzük. Konszolidáció történhet konvencionális kemoterápiával, vagy allogén, ritkán autológ hemopoetikus őssejt transzplantációval. Az allogén őssejt átültetés elsősorban a betegek genetikai eltérésein alapuló rizikó besorolásától, a terápiás választól, és a transzplantációhoz kötődő, egyedileg meghatározott rizikóbecsléstől függ (Sorrer ML, 2014; Armand P, 2014). Intenzív konszolidációs kemoterápiaként a 60 évesnél fiatalabb betegek esetén kettő - négy ciklus nagy dózisú araC kezelésre (2000-3000 mg/m²) van szükség (Byrd JC, 2004). Jó prognózisú fiatal betegek esetén 60-70%-os gyógyulási arány érhető el. Azoknál a betegeknél, akiknél konvencionális kemoterápia mellett nem várható tartós remisszió – elsősorban az intermediér és rossz prognózisú 60 évesnél fiatalabb betegek esetén, ahol nagy a relapszus esélye - CR-ben végzett allogén hemopoetikus őssejt átültetésre kell törekedni (Koreth J, 2009). Sajnos az eljárás korai halálozása nem csekély (20-30%), és a graft versus host betegség (GVHD) következtében kialakult késői mortalitás sem elhanyagolható. Fontos azonban megjegyezni, hogy a GVHD-nak antileukaemiás effektusa is van (Kolitz JE, 2006). Donornak a HLA-identikus testvér az ideális. Ennek hiányában HLA-identikus idegen donortól származó őssejtekkel (matched unrelated donor – MUD), esetleg köldökzsinórvérből nyert őssejtekkel történhet meg a transzplantáció (Ballen KK, 2012). Új lehetőségként, sürgető transzplantáció, vagy nem megfelelő idegen donor esetén kísérő betegségekkel nem rendelkező fiatal betegeknél felmerül a haploidentikus őssejt transzplantáció lehetősége is (Ciurea SO, 2015).

Jó biológiai állapotú 70-75 év alatti betegekben a fiataloknál alkalmazott teljes dózisú kezelés, vagy csökkentett adagú citosztatikus indukciós („3+7” protokoll) és konszolidációs (nagy dózisú araC) kezelés javasolt (Sanford D, 2015). Idősebb, vagy jelentős komorbiditással rendelkező betegek esetén alkalmazható redukált intenzitású kemoterápia, ami viszont növeli a relapszus lehetőségét. Rossz általános állapot, súlyos kísérő betegségek esetében palliatív kezelésként csak sejtszám csökkentés (pl. orális IDA, hydroxyurea, kis dózisú araC), vagy újabban hypometiláló szerek (decitabine, azacitidine), nukleozid analóg (sapacitabine) adása elfogadott, elsősorban klinikai tanulmány keretein belül (Dombret H, 2015).

A relapszusba került betegek kezelésében a nagy dózisú araC és a korábitól eltérő antraciklin kombinációja (pl. mitoxantrone + nagy dózisú araC=HAM - vagy fludarabin + IDA+ nagy adag araC = FLAGIDA) kerül leggyakrabban alkalmazásra. Remisszió elérhető, de az legtöbbször rövid.

A refrakter betegek és a relapszusba kerültek, de a frissen felismert betegek kezelésére is számos újabb ígéretes készítmény van vizsgálat alatt: tirozin-kináz (FLT3 és KIT) gátlók, IDH1 és IDH2 inhibitorok, második generációs hypometiláló szerek (Issa JP, 2015; Ravandi F, 2015; Sarkaria SM, 2014). A vosaroxin topoizomeráz II gátló és a monoklonális antitestek (anti-CD33, anti-CD123) érdemelnek még említést (Gasiorowski RE, 2014; Lynn RC, 2015; Ravandi F, 2015).

A kemoterápiával azonos fontosságú a szupportív kezelés, amely a szövődmények kivédését célozza (Milligan DW, 2006).

Az akut promyelocytás leukémiát a kóros promyelocyták felhalmozódása, a diffúz intravasculáris coagulatio, a 15 és 17-es kromoszómák közötti reciprok transzlokáció, és a PML/RAR α molekuláris genetikai eltérés jelenléte jellemzi. Leggyakrabban kombinált kezelést (ATRA + antraciklin) alkalmazunk, mely a betegek többségében tartós remissziót eredményez. Konzolidációra antraciklin (vagy antraciklin és araC kombináció) használatos ATRA-val kombinálva, emellett 1-2 évig tartó fenntartó kezelés (3 havonta ATRA+ tartós antimetabolit citosztatikumok) is javasolt. A relapszus kezelésében az arzén trioxid a leghatékonyabb gyógyszer, relapszus estén is a betegek 80%-ban remissziót eredményezhet. Az ATO (arzén-trioxid) kezelést követő második remisszióban autológ őssejt transzplantáció jön szóba (Alimoghaddam K, 2014).

2.3. A diffúz nagy B-sejtes lymphoma

A diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) a felnőttkor leggyakoribb malignus lymphoid daganata. A non-Hodgkin lymphoma incidenciája 15-20/100 000 fő évente Európában, amelynek mintegy harmada DLBCL (Martelli M, 2013).

A DLBCL 2016-os WHO klasszifikációja a **3. táblázat**ban látható. Mindegyik alcsoportja több morfológiailag, vagy klinikailag különböző betegségtípust tartalmaz. A DLBCL leggyakoribb formája a DLBCL NOS, mely centroblastokból és immunoblastokból álló lymphoid daganat (Swerdlow SH, 2016).

3.táblázat A DLBCL WHO szerinti klasszifikációja (2016)

| |
|---|
| Diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) „másként nem osztályozható” NOS |
| <i>Csíracentrum B-sejt eredetű</i> |
| <i>Aktivált B-sejt eredetű</i> |
| T-sejt/histiocita gazdag B-sejtes lymphoma (T/HRBCL) |
| Primer központi idegrendszeri DLBCL |
| Primer cután DLBCL (PCLBCL), lábra lokalizálódó „leg type” DLBCL |
| EBV pozitív DLBCL "másként nem osztályozható" NOS |
| EBV pozitív mucocutan fekély |
| DLBCL krónikus gyulladással |
| Lymphomatoid granulomatosis |
| Primer mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma (PMBL) |
| Intravasculáris nagy B-sejtes lymphoma (IVLBCL) |
| ALK (anaplasztikus lymphoma kináz) pozitív nagy B-sejtes lymphoma |
| Plasmablastos lymphoma (PBL) |
| Primer effúzionális lymphoma (PEL) |
| HHV8 pozitív DLBCL "másként nem osztályozható" NOS |
| Nagy malignitású B-sejtes lymphoma, MYC és BCL2 és/vagy BCL6 pozitivitással |
| Nagy malignitású B-sejtes lymphoma, "másként nem osztályozható" NOS |
| B-sejtes lymphoma, nem osztályozható, DLBCL-re és klasszikus Hodgkin lymphomára jellemző eltérésekkel |

A diagnózis alapja a nyirokcsomó biopszia és ennek szövettani vizsgálata. A szövettani vizsgálat mellett képalkotó (pl. mellkas röntgen, hasi ultrahang, CT, PET-CT) és laboratóriumi vizsgálatok is szükségesek a betegség kiterjedtségének megítélése. A vizsgálatokkal lehetséges a betegség stádiumának meghatározása (Carbone PP, 1971), melynek ma már a PET-CT a legfontosabb része. A DLBCL stádiumbesorolása az Ann Arbor rendszer alapján történik.

Az egyénre szabott kezelés meghatározásához szükséges a beteg IPI (International Prognostic Index) alapján történő rizikó besorolása (Shipp M, 1993). Az IPI öt prognosztikai tényező (életkor, stádium, LDH, általános állapot, extranodalis érintettség) alapján négy különböző rizikó csoportot (kis, kis-intermedier, nagy-intermedier, nagy) hoz létre, melynek a kezelésben van jelentősége. Használatos az életkorra igazított rizikó besorolás (aaIPI) is. A hagyományos prognosztikai markerek mellett az utóbbi években az ún. interim PET-CT-nek (általában a 4. kemoterápiás ciklust követő PET-CT vizsgálat a kezelésre kialakult nyirokcsomó aktivitás és kiterjedés csökkenésének megítélése) van prognosztikai jelentősége, mivel felismerhetőek a nem jól reagáló esetek (Seam P, 2007). A WT1 gén expressziójáról lymphomás betegek esetén már jelent meg közlemény 2005-ben és 2013-ban, de a gén kifejeződés prognosztikai értékét még nem vizsgálták (Drakos E, 2005).

A nem kiterjedt DLBCL esetek progresszió mentes túlélése 80-85%-os, míg a kiterjedt betegséggel rendelkezőké 50%-os (Martelli M, 2013). A DLBCL-es betegek kezelése alapvetően az

R-CHOP protokoll adásával indul, a beteg általános biológiai állapotát és a betegség kiterjedését is figyelembe véve. Szoros követés mellett, a terápiás választ figyelve alapvetően egyénre szabottan szükséges a kezelés megválasztása, az esetleges dóziscsökkentés, intenzifikálás, vagy terápia váltás mérlegelése (Schmitz N, 2012). Elsősorban relapszus, de akár egyénre szabottan rossz prognózis esetén autológ őssejt átültetés javasolt intenzív kemoterápiával elért CR-t követően (Pfreundschuh M, 2008; Vitolo U, 2009).

A DLBCL kezelésének fegyvertára bővült az utóbbi években, elsősorban tanulmányok keretein belül. Az új szerek önmagukban, vagy a standard R-CHOP kemoterápiás protokollal kombinálva alkalmazhatóak (Martelli M, 2013). Az immunmoduláló szerek (imidek) közül alkalmazható a lenalidomide (Fang C, 2015; Vitolo U, 2014), az mTOR inhibitor temsirolimus és everolimus (Merli M, 2015; Barnes JA, 2013), a proteaszóma gátló bortezomib, hiszton deacetiláz inhibitor vorinostat és az angiogenesis gátló bevacizumab, vagy az antiCD20 monoklonális antitest, GA101 (Elstrom RL, 2012; Alduaij W, 2011). A bruton kináz gátló ibrutinib alkalmazásával refrakter vagy relabáló betegekben 37%-os remissziós arány érhető el (Wilson WH, 2015). További tapasztalatok várhatóak a PD-1 elleni antitest (nivolumab, pembrolizumab), és a CD19 és CD3 ellenes bispecifikus antitest (Bite), a blinatumomab alkalmazásával is (Boussiotis VA, 2015; Nagorsen D, 2012).

3. Célkitűzések

Klinikai vizsgálatunk során a Humán genetikai Intézettel kollaborációban vizsgáltuk AML-ben és DLBCL-ben a WT1 expresszió megjelenését és jelentőségét. A vizsgálat elején megfogalmazott 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-es beteganyagunkban 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-es betegek esetén a WT1 expresszió megbízhatóan vizsgálható-e perifériás vérből?
6. A DLBCL-es betegek WT1 expressziójának van-e prognosztikai jelentősége?

4. Anyagok és módszerek

Vizsgálatunkat 2006. október és 2014. októbere között folytattuk. Összesen 60 AML-es, és 53 non-Hodgkin lymphomás beteg vett részt a vizsgálatban. A lymphomás betegek között 25 DLBCL-es, 8 MCL-es (köpenysejtes lymphomás), 9 PTCL-es (perifériás T-sejtes lymphoma), 2 Burkitt lymphomás, 2 MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lymphomás és 7 heveny lymphoid leukaemiás (B-ALL-es) volt. Jelen dolgozatban a 25 DLBCL-ben és a 60 AML-ben szenvedő beteg adatait ismertetjük.

A DLBCL-es betegek diagnózisa minden esetben nyirokcsomó szövettani vizsgálatán alapult. A klinikai stádium besorolást az Ann Arbor rendszer szerint végeztük, a betegek rizikó szerinti besorolása a klinikánkon rutinszerűen alkalmazott IPI score rendszer szerint történt. Az AML-es betegek diagnózisa a vércép, a csontvelő morfológiai, áramlási citometriai és citogenetikai vizsgálatán alapult. A WT1 expresszió kimutatására perifériás vérből vettünk mintát. A betegek vizsgálata során a betegség felismerésekor és az első indukciót követően történt vérvétel. A külön ismertetett esetek követése során vérvétel emellett a kezelést követően kialakult remisszió időszakában és relapszus esetén is történt. A betegek megfelelő követését, az esetleges relapszus időben történő felismerését képalkotó vizsgálatok (pl. CT, PET-CT) és laboratóriumi vizsgálatok (pl. vércép, csontvelő morfológia, áramlási citometria, citogenetika) segítették. Vizsgálatunk megkezdése előtt a betegek írásbeli beleegyezésüket adták az Orvosok Világszövetsége Helsink Deklarációjában foglaltaknak megfelelően.

4.1. Laboratóriumi módszerek

A betegektől levett perifériás vérminták feldolgozását, az mRNS izolálást és a vizsgált gének expresszióinak qRT-PCR-al történő meghatározását a Humángenetikai Intézetben dolgozó kollégáink –elsősorban Dr. Buglyó Gergely – végezték el.

Az mRNS izolálásához a betegek vérmintáit PAXgene Blood RNA Tube csövekbe vettük le. Az mRNS 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 génnek több izoformája is ismert, melyek biológiai funkciója is különbözik. Az általunk használt assay a gén egy olyan szakaszát detektálja, mely minden genetikai variánsban jelen van (Polak J, 2013). A WT1 gén kifejeződésének számszerű meghatározásához szükség volt egy olyan referenciagénnel, mely konstans és magas expressziót mutat. Kísérleteinkben endogén kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) gént alkalmaztuk. A GAPDH gén a nemzetközi

irodalomban is alkalmazott ún. endogén kontroll gén, mivel expressziója nem mutat eltérést az egészséges és a neoplastikus szövetekben (Mazrouei S, 2012). Az irodalomban előforduló másik három referencia gén (ABL gén, béta-aktin és murine leukemia onkogén 1) nem rendelkezik kimutatható előnnyel a GAPDH génnel szemben. Számításainkhoz nem a kapott „Ct” ciklus küszöbértéket használtuk, hanem mindkét gén expressziójának mértékét először 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. Ezt követően a vizsgált WT1 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. Ezzel elkerülhető a különböző minták eltérő RNS koncentrációja és az ez alapján mért eltérő Ct értékek torzító hatása. A legtöbb esetben a minták RNS koncentrációja 200-511 ng/ μ L között volt, de ezzel a módszerrel igen alacsony RNS koncentrációk (1 ng/ μ L) esetében is megbízható eredményeket kaptunk.

4.2. *Kontroll minták*

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. Meghatároztuk a kontroll csoport egyéneinek WT1 expresszióját. 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 százalékhoz 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 expressziós szintek széles skálán mozogtak (0,0077-239,0), megállapítottunk egy második küszöbértéket is a magas WT1 expresszióknak (10,0). A küszöbérték segítségével meghatározhatóvá váltak a WT1 pozitív és WT1 negatív betegek. A génexpresszió mértéke a betegség progressziója, vagy eredményes kezelése során nőtt, csökkent, illetve normalizálódott, vagy nem változott.

4.3. Statisztika

Az adatok statisztikai analíziséhez a MedCalc software-t használtuk (12.4.0 verzió). A teljes túlélés idejét hetekben adtuk meg, mely a diagnózistól a vizsgálati időszak végéig, vagy a beteg haláláig tartó időt jelentette. A betegség mentes túlélést a remisszió kialakulásától a relapszusig, haláláig, vagy a vizsgálati idő végéig tartó hetek számában határoztuk meg. Az emelkedett WT1 expressziót mutató és nem mutató betegek esetén a túlélési görbéket a Kaplan-Meier módszer segítségével ábrázoltuk. A görbék összehasonlítását long-rank teszttel végeztük, mellyel a túlélési görbék közötti szignifikáns különbségeket fejeztük ki.

5. Eredmények

5.1. Az AML-es betegek WT1 expressziója

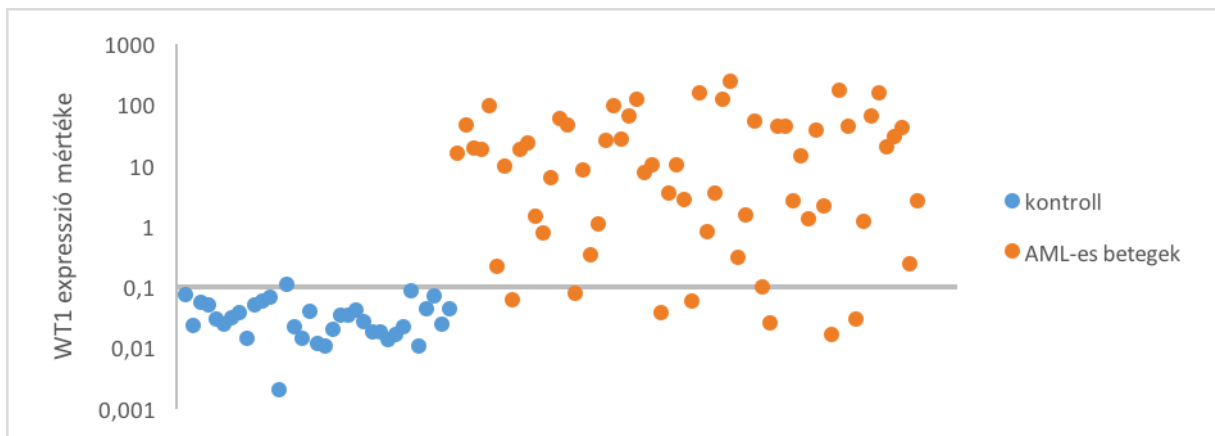
A vizsgálati idő alatt 60 AML-es beteget követtünk (a medián követési idő 37 hét volt). A betegek adatait a **4. táblázat** tartalmazza. A 28 férfi és 32 nőbeteg medián életkora 57,5 év volt, 19 - 80 év szélső értékekkel. 41 betegnek (68%) de novo, míg 19-nek (32%) szekunder heveny leukémiája volt. A FAB klasszifikáció alcsoportjai közül legnagyobb arányban a myelomonocytás (M4) leukémia fordult elő (35%). A szekunder AML esetén nem minden esetben volt meghatározható a FAB klasszifikáció szerinti beosztás. A betegség felismerésekor észlelt csontvelői infiltrációt jelző myeloblast arány medián értéke 70% volt, a csontvelői érintettség tartománya 25-100% között mozgott. A diagnózisakor talált medián fehérvérsejt szám 10,05 G/l, (0,52-310 G/l) volt. Kis fehérvérsejt számot legtöbbször szekunder leukémiák (megelőző MDS) esetén láttunk. A betegek kromoszóma vizsgálatát csak négy esetben nem lehetett értékelni. A leggyakoribb prognosztikai alcsoportnak az intermedier rizikó csoport bizonyult (a betegek 61%-a), hasonló arányban az irodalmi adatokhoz (Marcucci G, 2011; Mrózek K, 2012). A vizsgált betegek 32%-a rossz prognózisúnak, míg 7%-a jó prognózisúnak bizonyult. A molekuláris markerek közül rutinszerűen az FLT3 mutációját vizsgáltuk. A betegek 70%-ban, azaz 42 esetben került sor erre a vizsgálatra. A vizsgált betegek 19%-a hordozott heterozigóta ITD mutációt, 7%-ban pedig TKD mutációt észleltünk. A NPM1 vizsgálata viszonylag kevés betegnél történt meg (technikai okok miatt). A vizsgált 24 betegből 21%-ban volt észlelhető a mutáció jelenléte. A betegek diagnózist követő elsőként választott indukciós kezelése 60 éves életkor alatt „7+3” protokoll szerint történt. A 60 évnél idősebb betegek kuratív célú, vagy redukált dóziszú indukciós kezelésben, kis dóziszú kemoterápiában, vagy palliatív kemoterápiás kezelésben részesültek, a kísérőbetegségeket és általános állapotot is figyelembe véve. Összesen 51 beteg kapott teljes, vagy redukált dóziszú indukciós kezelést, 9 beteg pedig palliatív kemoterápiában részesült. Három t(15;17) transzlokációval rendelkező APL-es beteg AIDA (ATRA + idarubicin) protokoll szerinti indukciót kapott. A remisszióba került betegek konszolidációs kezelése nagy dóziszú araC volt. Refrakter esetben elsősorban FLAGIDA, vagy HAM kezelést adtunk (8, ill 2 beteg). A követési idő végére a 60 betegből 14 (23%) volt életben, 46 beteg elhalálozott. A 60 évnél fiatalabb 36 beteg közül 13-an (a 60 évnél fiatalabbak 36%-a) éltek a vizsgálati időnk befejezésekor. A 24 idős beteg közül csak egy beteg (a 60 évnél idősebbek 4%-a) maradt életben.

4.táblázat Az AML-es betegek klinikai adatai

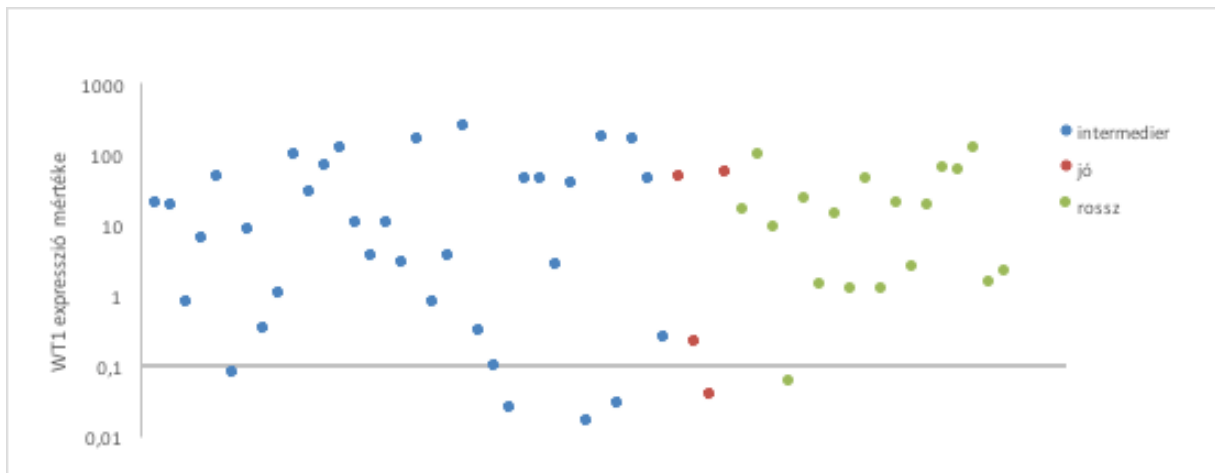
| | |
|---|-------------------------|
| Vizsgált betegek (betegszám, %) | 60 (100) |
| Férfi | 28 (46) |
| Nő | 32 (54) |
| Férfi/nő arány | 0.875 |
| Medián életkor (évek, tartomány) | 57,5 (19-80) |
| Medián csontvelői blast arány diagnóziskor (% , tartomány) | 70 (25-100) |
| Medián perifériás fvs szám diagnóziskor (G/l, tartomány) | 10,05 (0,52-310) |
| AML típusa (betegszám, %) | 60 (100) |
| De novo | 41 (68) |
| szekunder - MDS talaján | 19 (32) |
| FAB altípusok (betegszám, %) | 49 (100) |
| M0 | 8 (16) |
| M1 | 7 (14,5) |
| M2 | 10 (20,5) |
| M3 | 3 (6) |
| M4 | 17 (35) |
| M5 | 4 (8) |
| M6 | 0 (0) |
| M7 | 0 (0) |
| FLT3 mutáció (betegszám, %) | 42 (100) |
| ITD mutált | 8 (19) |
| TKD mutált | 3 (7) |
| Negatív | 31 (74) |
| Npmc mutáció (betegszám, %) | 24 (100) |
| Pozitív | 5 (21) |
| Negatív | 19 (79) |
| Karyotípus vizsgálat (betegszám, %) | 56 (100) |
| Jó prognózis | 4 (7) |
| t(15;17) | 3 |
| t(8;21) | 1 |
| Intermedier prognózis | 34 (61) |
| Rossz prognózis | 18 (32) |
| 1. kemoterápiás kezelés eredménye (betegszám, %) | 60 (100) |
| Komplett remisszió | 25 (42) |
| Parciális remisszió | 14 (23) |
| Refrakter | 10 (17) |
| Meghalt | 11 (18) |
| 1. indukciós kezelésre adott válasz a WT1 expresszió függvényében (életben lévő betegek) | 49 |
| Diagnóziskor és indukció után is WT1 negatív (7 beteg) | |
| Komplett remisszió | 3 |
| Parciális remisszió | 4 |
| Diagnóziskor és indukció után is WT1 pozitív (31 beteg) | |
| Komplett remisszió | 11 |
| Parciális remisszió | 10 |
| Refrakter | 10 |
| Diagnóziskor WT1 pozitív, kezelést követően WT1 negatív (11 beteg) | |
| Komplett remisszió | 11 |

5.1.1. WT1 expresszió az AML felismerésekor

Az AML diagnózisakor a 60 betegből 53 esetében (88,33%) igazolódott WT1 pozitivitás, melynek medián értéke 10,25 (0,216-239,0) volt (**1. ábra**). A WT1 expresszió az egészségesekben 0,002-0,109 közötti értéket mutatott (**1. ábra**). A betegség felismerésekor észlelt fehérvérsejt szám, a csontvelői blastok aránya és a diagnóziskor mért WT1 expresszió mértéke között a Kruskal-Wallis próba elvégzésével sem volt igazolható statisztikailag összefüggés. Az irodalmi adatok szerint ez nem váratlan. Ennek magyarázata az lehet, hogy a qRT-PCR segítségével igen kis mennyiségben exprimálódó géntermék is azonosításra kerül, és annak ellenére, hogy ugyan a gén expressziója döntően a daganatos sejt jelenlététől függ, nincs egyenes arányosság a daganatsejtek mennyisége és a WT1 expresszió mértéke között (Owen C, 2010). Nem találtunk összefüggést a WT1 pozitivitás, az expresszió mértéke és a de novo, vagy szekunder kezdet, az életkor és az egyik legfontosabb prognosztikai faktor, a citogenetika (**2. ábra**) vonatkozásában sem (**5. táblázat**).



1.ábra A WT1 expresszió az egészséges kontroll csoportban és a betegekben az AML felismerésekor ($p < 0,0001$)



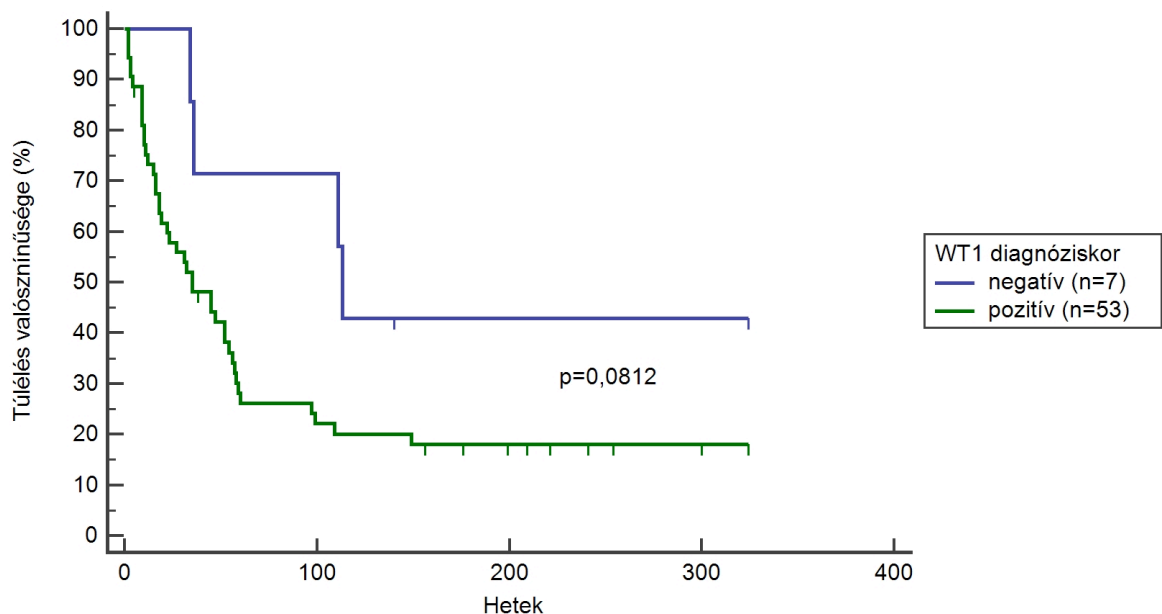
2. ábra A kezdeti WT1 expresszió mértéke a karyotípus alapján prognosztikai csoportokba sorolt AML-es betegeinknél ($p=0,498$)

5. táblázat Az AML-es betegek adatai a kezdeti WT1 expresszió függvényében

| | WT1 pozitív | WT1 negatív |
|--|-------------|-------------|
| Vizsgált AML-es betegek (betegszám) | 53 | 7 |
| AML kezdete ($p=1,0$) | | |
| De novo | 36 | 5 |
| Szekunder | 17 | 2 |
| Életkor ($p=0,698$) | | |
| 60 év felett | 21 | 2 |
| 60 év alatt | 32 | 5 |
| Karyotípus ($p=0,684$) | | |
| Jó prognózis | 4 | 0 |
| Intermediér prognózis | 30 | 4 |
| Rossz prognózis | 15 | 3 |
| Nem értékelhető | 4 | 0 |

A túlélési eredményeket megnézve a kezdetben WT1 negatív 7 beteg teljes túlélésének mediánja 113 hét (34-324 hét), a kétéves teljes túlélés valószínűsége 57% volt. Ezzel szemben a kezdetben WT1 pozitív 53 beteg teljes túlélésének medián értéke 35 hét (2-324 hét), a kétéves teljes

túlélés valószínűsége 20% volt. A diagnóziskor WT1 gént nem exprimáló 7 beteg teljes túlélése jobb, mint a WT1 pozitív 53 betegé, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,0812$) (3. ábra). Az első kemoterápiás kezelés során elhalálozott 11 beteg WT1 pozitív volt.



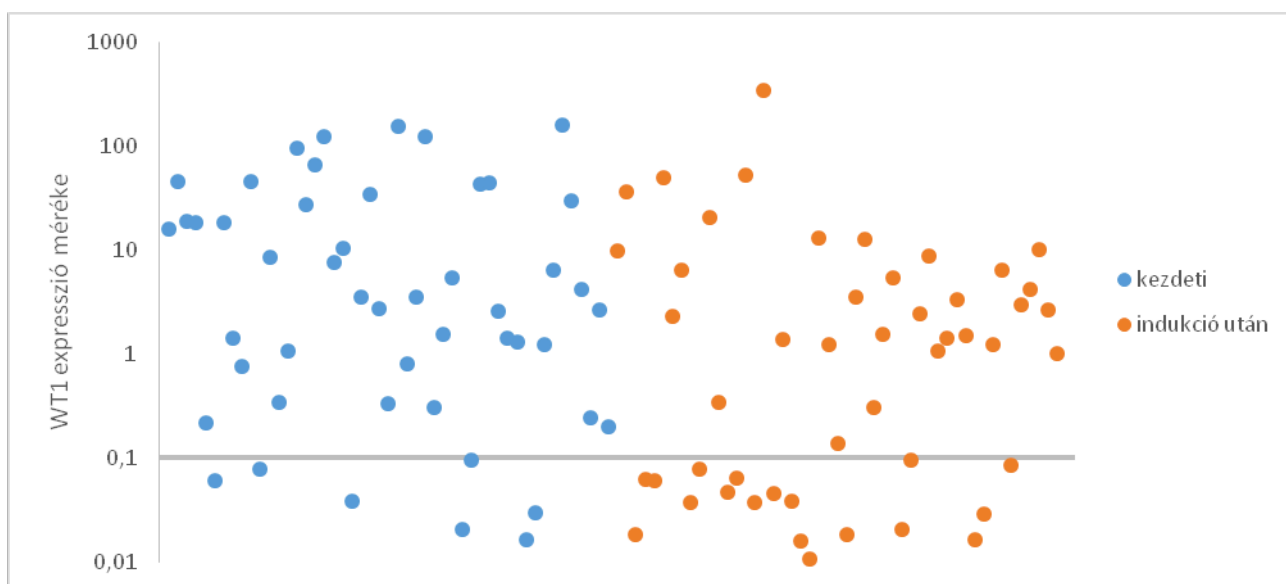
3.ábra A betegség felismerésekor WT1 negatív és WT1 pozitív betegek teljes túlélése

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 nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,1232$), de a kis betegszám miatt betegségmentes túlélési görbe releváns statisztikai információt egyébként sem adhat.

Hasonló eredményeket kaptunk akkor is, ha csak a 41 de novo AML-es betegnél hasonlítottuk össze az 5 kezdetben WT1 negatív és 36 kezdetben WT1 pozitív beteg teljes túlélését ($p=0,1174$), és a közülük CR-be került 3 WT1 negatív és 19 WT1 pozitív eset betegségmentes túlélését ($p=0,134$). A különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak.

5.1.2. A WT1 expresszió változása az első indukciós kezelést követően

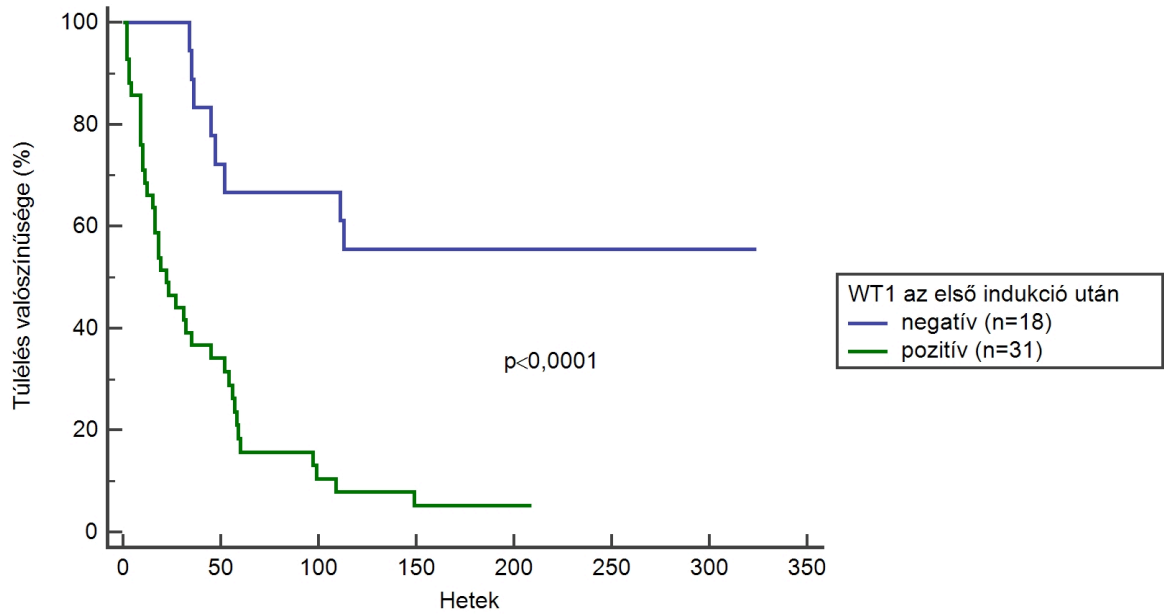
Az első kezelést követően 49 beteg volt életben, közülük mindenki indukciós kezelésben részesült. A WT1 génexpresszió ismételt vizsgálatára ezen 49 beteg esetén kerülhetett sor (**4. ábra**). A kezelést követően, a vérkép rendeződése után mintegy 8-14 nappal történt a vérvétel, a csontvelő vizsgálatával párhuzamosan.



4.ábra A WT1 expresszió változása az indukciós kezelést követően ($p=0,002$)

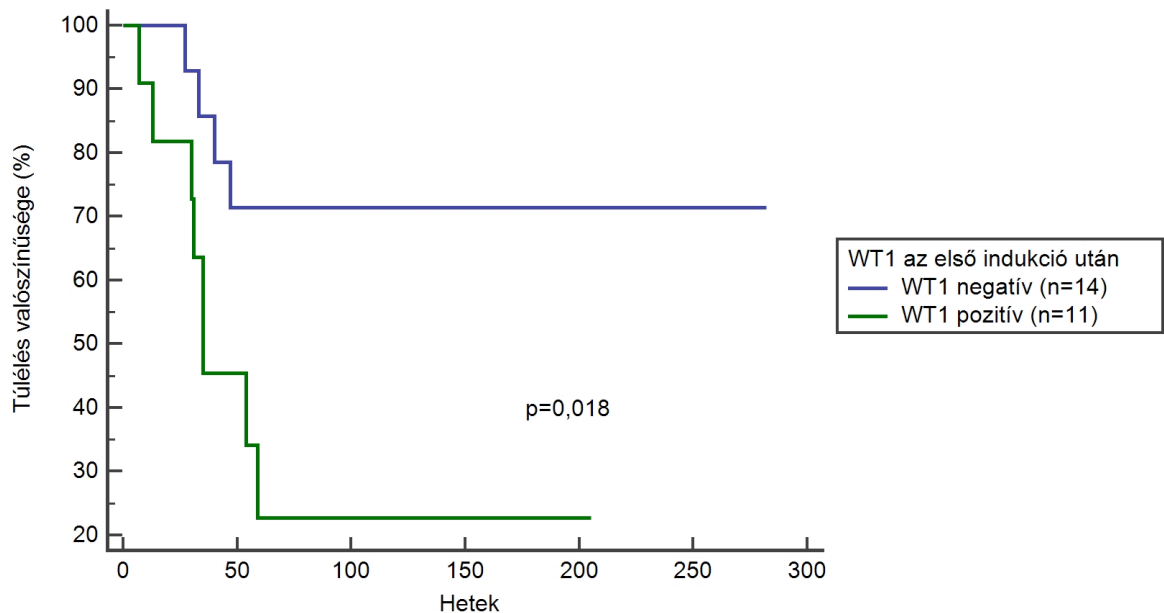
Az első indukciós kezelést követően WT1 pozitív betegek gén expressziójának mértéke csökkent (median 3,53-ról ill. 1,22-re) (**4. ábra**). A kezdeti 7 WT1 negatív beteg mellett még 11 vált WT1 negatívvá. Így összesen 18 betegnek volt az indukció után küszöbérték alatti (azaz normális), 31 betegnek küszöbérték feletti, és közöttük csak öt betegnek 10 fölötti magas WT1 értéke, a kezdeti 34 erősen pozitív WT expresszióval rendelkező beteggel szemben.

Először az indukciót követően életben lévő 49 beteg közül a kezelés után WT1 negatív 18 beteg és a WT1 gént végig exprimáló 31 beteg adatát vetettük össze. A teljes túlélést összehasonlítva szignifikáns eltérés volt kimutatható ($p<0,0001$) (**5. ábra**). 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.



5. ábra Az első indukciót követően WT1 negatív és WT1 pozitív betegek teljes túlélése

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 (**6. ábra**).



6. ábra Az első indukciót követően CR elért WT1 negatív és WT1 pozitív betegek betegségmentes túlélése

5.1.2.1. 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 ezután az első indukciót követően életben lévő 49 beteget három csoportra osztottuk. Ennek a három csoportnak az OS és DFS eredményeit is összehasonlítottuk.

Az első csoport az indukció előtt és után is WT1 negatív (a kezdeti WT1 medián értéke 0,0294) maradt, ide 7 beteg tartozott, DFS csak 3 betegnél volt számítható, akik komplett remisszióba kerültek.

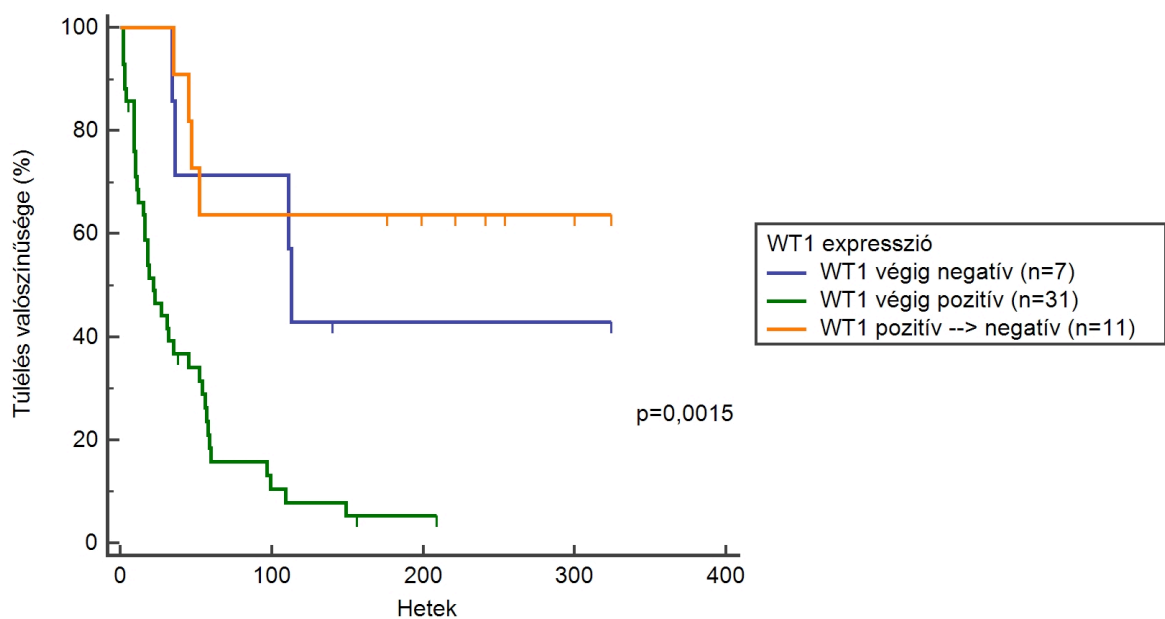
A második csoportba a végig WT1 pozitív betegek kerültek. Ezen esetek kezdeti WT1 expressziójának mediánja 18,3 volt, ami ugyan minden esetben csökkent, de nem került a küszöbérték alá az indukciót követően sem. Ide 31 beteg tartozott, CR 11 betegnél alakult ki, DFS náluk számítható.

A harmadik csoportba azok a betegek kerültek, akik diagnóziskor WT1 pozitívnak bizonyultak (az expresszió mediánja 7,66), de az első indukció után WT1 negatívvá váltak. Összesen 11 beteg WT1 expressziója csökkent a küszöbérték alá. CR alakult ki mind a 11 betegnél.

A harmadik betegcsoport (az indukciós kezelésre negatívvá válók) kezdeti WT1 értékeinek mediánja lényegesen kisebb volt, mint a végig pozitívaké. Irodalmi adatok PML-ben és T-ALL-ben az enyhe (náluk közepes, „intermediér”) WT1 expressziót mutató betegek túlélését jobbnak találták, még a WT1 expressziót nem mutató betegeknél is (Heesch S, 2010; Hecht A, 2015). Vizsgáltuk, hogy a kezelésre WT1 negatívvá váló betegek esetén a küszöbérték alá csökkenő WT1 szint, vagy a diagnóziskor észlelt enyhe WT1 expresszió szerepe lehetett-e fontosabb a túlélés tekintetében. Ennek vizsgálatához mind a 11 WT1 negatívvá váló beteghez hozzárendeltünk egy-egy végig WT1 pozitív beteget, akik kezdeti WT1 értéke (WT1 medián: 6,4) legközelebb esett az adott WT1 negatívvá válóéhoz (WT1 medián: 7,66). Emellett figyelembe vettük az életkort (WT1 végig pozitívak mediánja 46 év, a WT1 negatívvá válók életkorának mediánja 41 év) és a leukémia de novo vagy szekunder (10-10 de novo és 1-1 szekunder eset) jellegét is. Ezen két betegcsoport teljes túlélését hasonlítottuk össze. A 11 "illesztett" végig pozitív beteg túlélése szignifikánsan rosszabb volt ($p=0,0278$), mint a 11 WT1 negatívvá váló betegé. Mivel a kezdeti WT1 érték a 11 végig pozitív betegcsoportban lényegében azonos volt a WT1 negatívvá válókkal, ez az eredmény azt támasztja alá, hogy nem a kezdeti WT1 mennyisége a döntő, hanem az, hogy a kezelés után a gén expressziójának szintje a küszöbérték alá csökken-e.

A log-rank teszt elvégzésével szignifikáns különbséget észleltünk a három betegcsoport OS eredményei között ($p=0,0015$) (7. ábra). 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 tartós WT1 expressziót mutató betegek túlélési görbéje szignifikánsan ($p=0,0001$) rosszabb volt a másik két csoport OS-étől (7. ábra).

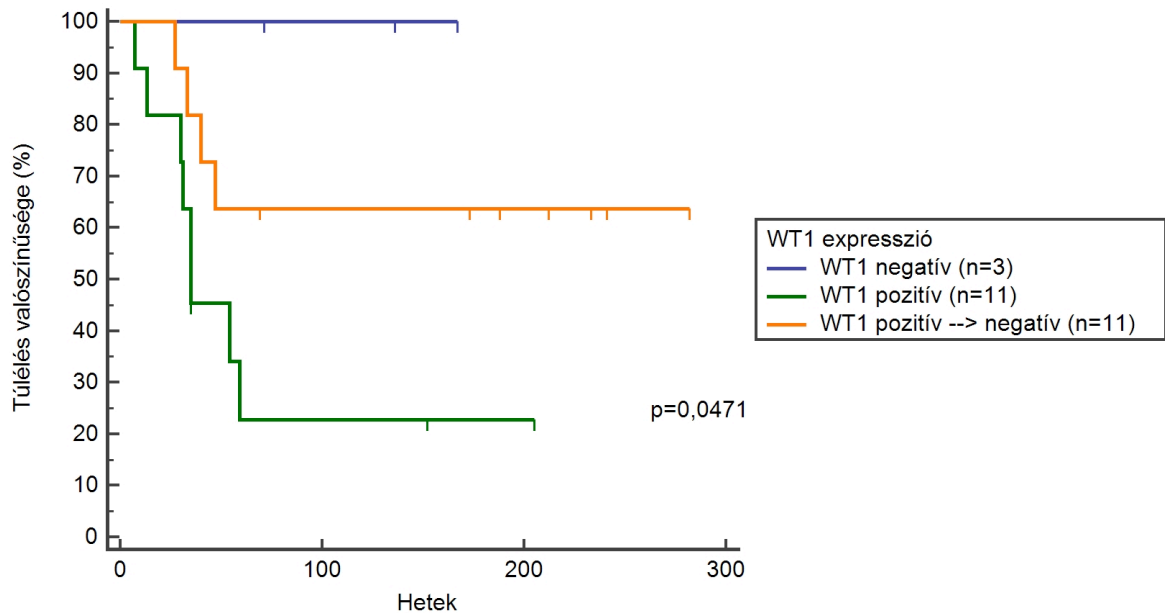
A WT1 negatívvá váló, illetve a tartósan WT1 negatív betegek túlélési valószínűségének görbéje 2 év után kb. 63, illetve 42%-nál vízszintessé vált, és a vizsgálat lezárásáig nem változott, amely tartós remisszióra utalhat.



7.ábra Kezdetből WT1 negatív, végig WT1 pozitív és kezdetben WT1 pozitív, majd indukció után negatívvá váló betegek teljes túlélése

A betegségmentes túlélést tekintve (8. ábra) - bár a betegszám kicsi, ezért releváns klinikai információ csak korlátozottan vonható le - jól elkülönül a három görbe, és a DFS görbék is szignifikánsan különböznek egymástól ($p=0,0471$). A legjobb betegségmentes túlélés a végig WT1 negatív betegcsoportnál észlelhető, ez 100%-os valószínűségű, mivel a három komplett remisszióba került beteg tartósan remisszióban is maradt (medián 167 hét, 71-167 hét). A kezdetben WT1 pozitív,

majd negatívvá válók (11 beteg) DFS értéke is közel 65%-os (medián 192 hét, 27-282 hét). A legrosszabb DFS érték (27%) a végig WT1 expressziót mutató 11 betegnél észlelhető (medián 73, 7-205 hét).



8. ábra Az első indukciót követően CR-ben lévő végig WT1 negatív, végig WT1 pozitív és kezdetben WT1 pozitív, majd indukcióra negatívvá váló betegek betegségmentes túlélése

5.1.2.2. 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 legjobb DFS görbe). A 4 PR-be került beteg nem volt életben a követés végén.
- A 31 betegből, 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 tartósan WT1 pozitív 31 beteg esetén volt a legrosszabb a remissziós ráta, emellett a közülük indukció után 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

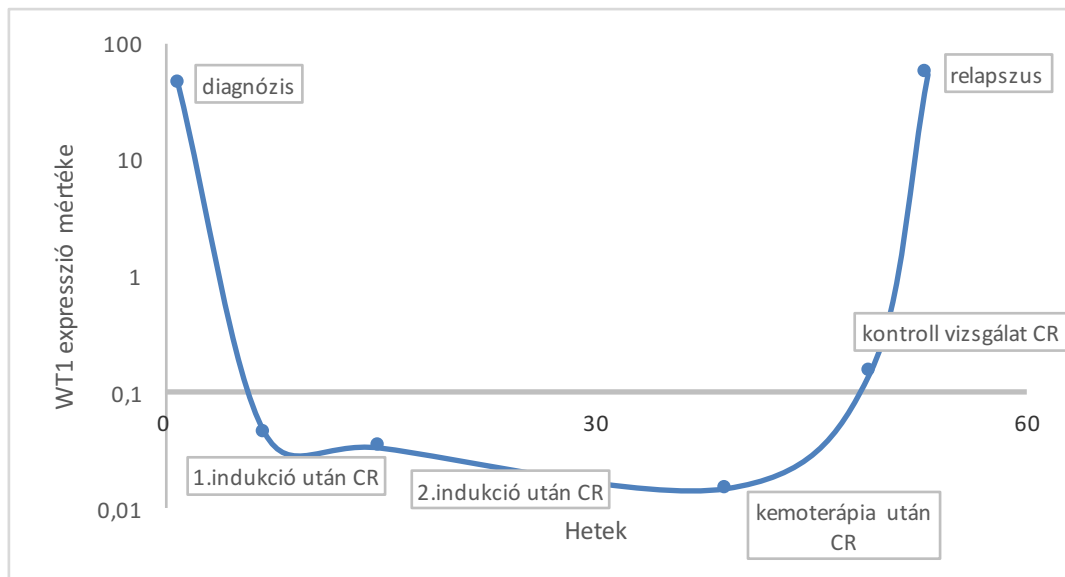
4 volt életben, és közülük csak ketten (25%) voltak még mindig remisszióban. A többi, első indukcióra CR-be nem került 20 betegből a vizsgálat végével egy sem volt életben.

- 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 betegekétől, 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. Két relapszusba került beteg az alapbetegség progressziója miatt halt meg. Egy fiatal férfi allogén őssejt átültetést követően infektív szövődmények miatt halt meg, egy beteg pedig a vélt gyógyulás miatt nem jelentkezett kontroll vizsgálatokon. Mindhárom APL-es betegben CR alakult ki.

5.1.2.3. Esetismertetések – nem APL-es betegek

1. Egy 59 éves nőbetegnél 2007-ben feltehetően MDS talaján kialakult, nagy induló fehérvérsejt számmal (212,4 G/l) és közel 100%-os csontvelői leukémiás infiltrációval járó AML került felismerésre. Az ekkor mért WT1 érték 43,8 volt. Az első „7+3” indukciós kezelést követően a szokásos vizsgálatokkal CR alakult ki, a WT1 expresszió pedig a küszöbérték alá csökkent

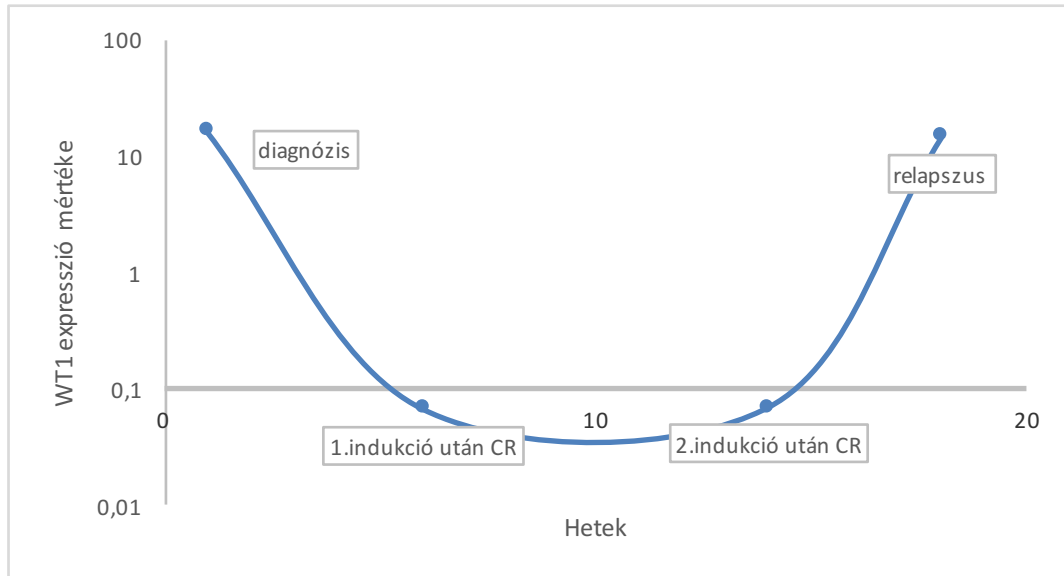
(0,045). Ezt követően a beteg még egy indukciós kezelésben részesült. A második ciklus kemoterápia után is CR-ben volt, a WT1 expresszió továbbra is küszöbérték alatti volt (0,0335). A beteg négy ciklus nagy dózisu araC konszolidációs kezelést kapott. Tíz héttel a kemoterápia befejezése után (a csontvelő citológiai képe és áramlási citometria alapján) a beteg változatlanul komplett remisszióban volt. A WT1 értéke ekkor szintén normális (0,015) volt, majd újabb 10 hetet követően 0,149-re emelkedett. További 4 héttel később a WT1 expresszió mértéke fokozódott (53,9). A csontvelő vizsgálata (morfológia és áramlási citometria) ekkor még mindig remissziót jelzett, majd 2 héttel később hirtelen állapotromlás és növekvő fehérvérsejt szám, relapszus igazolódott. Ezt csontvelő vizsgálat is megerősítette (60% blast). FLAGIDA protokollal sem sikerült ismételt remissziót, vagy javulást elérni, és a remissziót követően öt hónappal a beteg meghalt. A halál oka thrombocytopenia következtében kialakult agyvérzés volt (**9. ábra**).



9. ábra Az első eset követése során mért WT1 expresszió

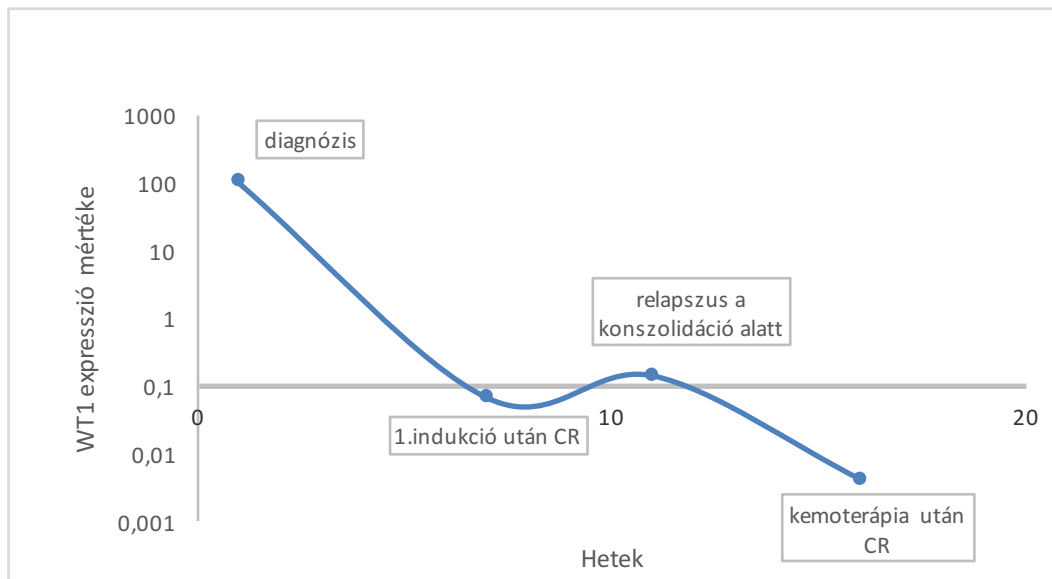
2. Egy 65 éves nőbetegnél kezdeti WT1 pozitivitással (16,1) és 100%-os csontvelői infiltrációval járó AML M4 igazolódott. Indukciós kezelést („7+3”) követően a csontvelő morfológia és az áramlási citometria egyaránt CR-t igazolt. A WT1 expresszió a cut-off érték alá csökkent (0,0662). Újabb indukciós kezelését követően ismét cut-off érték alatti expresszió igazolódott (0,0689). Három héttel későbbi kontroll során a kezelés folytatása előtt, klinikailag tünetmentes állapotban, jó vérkép mellett a WT1 expresszió mértékének növekedését észleltük (14,3). Az ekkor végzett csontvelő vizsgálata relapszust igazolt (25% blast). Protokoll váltás (FLAGIDA) mellett döntöttünk. Bár a beteg a kezelést jól tolerálta, a kemoterápiát követő

elhúzódó cypopenia időszakában súlyos tüdőgyulladás alakult ki, mely végül, egy hónappal a relapszus észlelését követően a beteg halálát okozta (**10. ábra**).



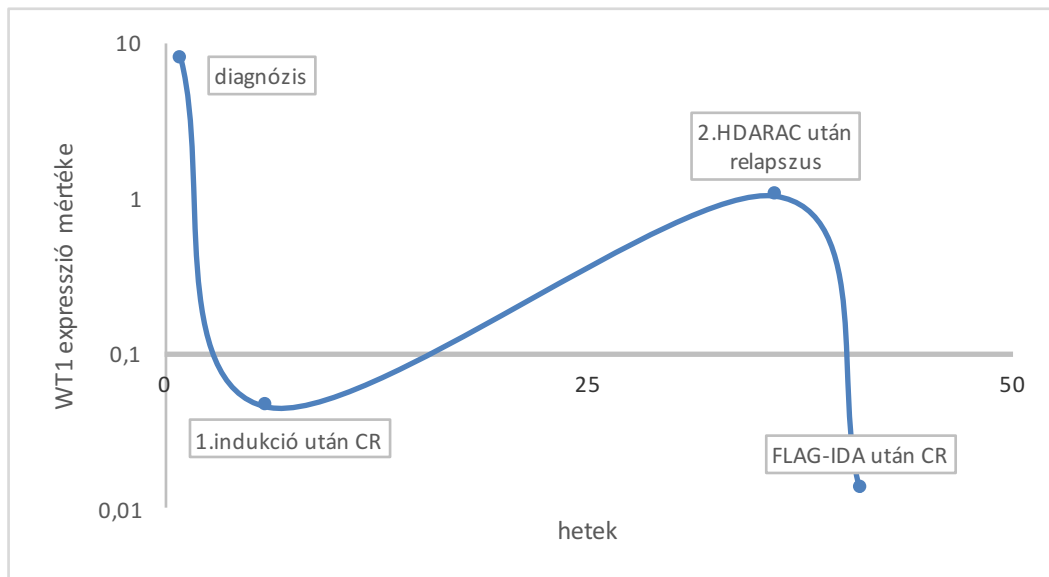
10. ábra A második eset követése során mért WT1 expresszió

- Egy 25 éves férfibetegünknel közel 40%-os blast aránnyal és nagy WT1 expresszióval (97,5) jellemezhető AML M5 igazolódott. Az első „7+3” indukciós kezelést követően CR alakult ki, és WT1 negatívvá vált (0,0641). Kezelése zavartalanul folytatódott, majd a második konszolidációs nagy dózisu araC kemoterápiát követően két héttel történt kontroll során ismét WT1 pozitívitás volt kimutatható. Szerény mértékű WT1 expresszió (0,137) mellett a csontvelő morfológiai és áramlási citometriai vizsgálata egyaránt kezdődő relapszusra utalt (10% myeloblast a csontvelőben). Salvage (FLAGIDA) kezelés mellett ismét CR alakult ki, a WT1 expresszió mértéke pedig újra a cut-off érték alá csökkent (0,004). A beteg sikeres idegdonoros őssejt transzplantációra került, de három hónappal a transzplantációt követően tüdőgyulladás, majd gombaszepszis miatt elhalálozott (**11. ábra**).



11. ábra A harmadik eset követése során mért WT1 expresszió

4. Egy 51 éves férfibetegnél M4 altípusú, 80%-os csontvelői infiltrációt okozó, WT1 pozitív (7,66) AML igazolódott. Az első „7+3” indukciót követően kialakult CR mellett a WT1 expresszió is cut-off érték alá csökkent (0,0454). Hat hónappal a diagnózist követően, a második nagy dózisú konszolidációs kezelés után két héttel magas perifériás fehérvérsejt számmal járó, nagy csontvelő infiltrációt (60% blast) okozó relapszus jelentkezett, mely során a WT1 expresszió is emelkedett (1,03). Mentő protokoll (FLAGIDA) mellett cut-off érték alá csökkenő WT1 expresszió (0,0132) és CR alakult ki, de a beteg ezután kezelését önkéntesen megszakította a vélt gyógyulás miatt, és klinikánkon a későbbiekben nem jelentkezett (**12. ábra**).



12. ábra A negyedik eset követése során mért WT1 expresszió

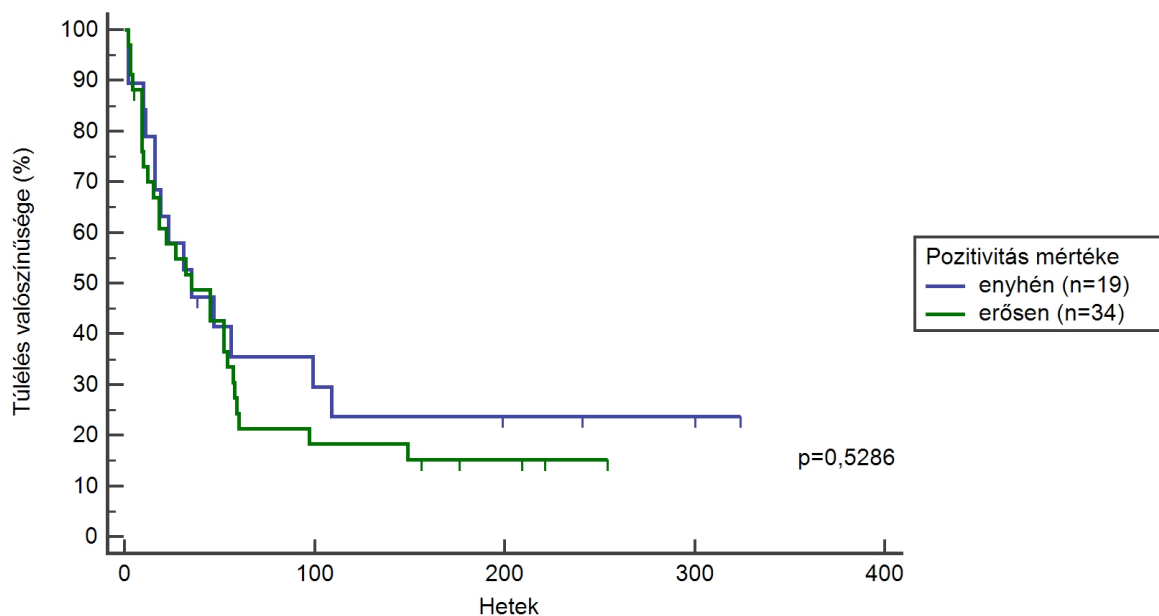
5.1.2.4. Az APL-es betegek esetismertetése

A három APL-es beteg közül ketten bizonyultak betegségük felismerésekor WT1 pozitívnak. Egy 54 éves férfi betegünkönél jelentős csontvelő-infiltrációval (70%) jellemezhető AML M3 és WT1 pozitívítás (0,216) igazolódott. AIDA kezelést követően CR-be került, WT1 expressziója a cut-off érték alá csökkent (0,0627), azaz WT1 negatívvá vált, mely a konsolidációs és fenntartó kezelés során is megmaradt (0,0229, majd 0,0308). Egy 46 éves nőbetegnél a diagnózis idején magas WT1 expresszió (55,0), 50%-os csontvelői érintettség és súlyos DIC (diszeminált intravaszkuláris koaguláció) képében jelentkező APL igazolódott. Kezelését (AIDA) követően CR-be került, WT1 negatívvá (0,021) vált, majd relapszus jelentkezett, ezzel párhuzamosan ismételten emelkedő WT1 expresszióval (0,164). Arzén trioxiddal kiegészített kezelését követően molekuláris remisszióban (negatív PML/RARA PCR és WT1- 0,0324) autológ őssejt átültetést végeztünk. Három hónappal a transzplantációt követő kontroll vizsgálaton emelkedő fehérvérsejt szám és a csontvelő morfológiai képe felvetette relapszus lehetőségét, de a WT1 érték negatív (0,042) maradt. Ismételt vizsgálatok leukemoid reakció mellett szóltak, lecsengő fehérvérsejtszám mellett rendeződő csontvelői képpel és a WT1 negativitással. A leukemoid reakció oka infekció, vagy a növekedési faktor adásának mellékhatása lehetett. A beteg tartósan CR-ben és molekuláris remisszióban van. Egy 40 éves férfibeteg kezdeti WT1 negativitás (0,038) mellett 50%-os csontvelői érintettséggel kapott indukciós kezelést, a további kemoterápiás ciklusok alatt végig komplett remisszióban maradt WT1 negativitás

mellett. Mindhárom beteg esetén tartós CR alakult ki, két esetben a kezdeti WT1 pozitivitást követően a CR elérésével párhuzamosan a WT1 expresszió is tartósan a cut-off érték alá csökkent.

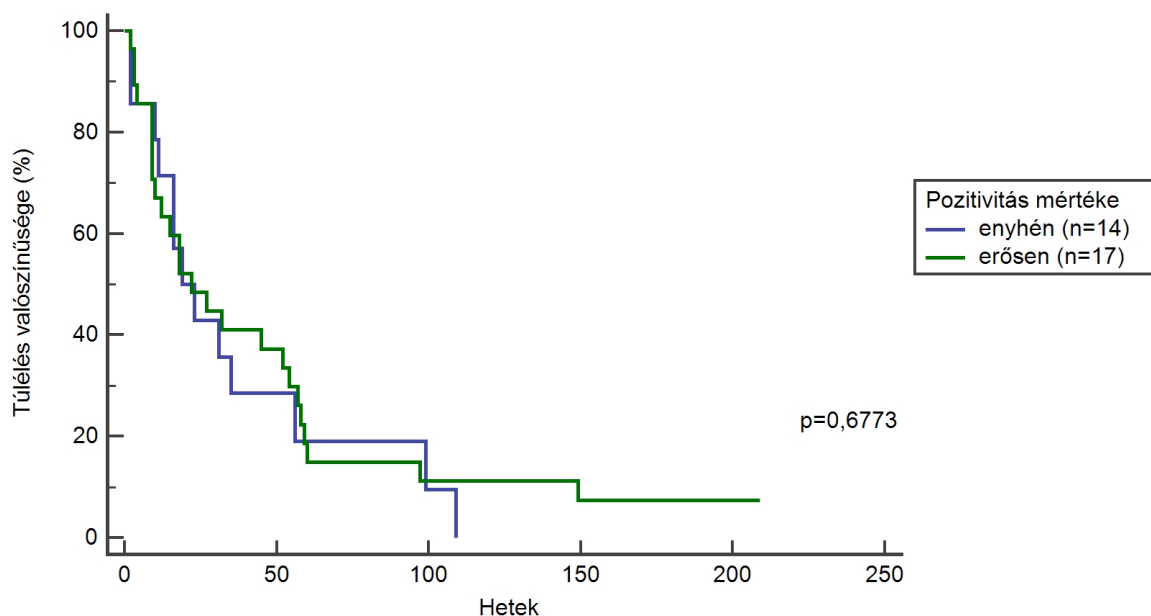
5.1.3. A WT1 génexpresszió mértékének hatása a prognózisra

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 Kaplan-Meier görbén ábrázolva a betegek teljes túlélése hasonló volt, a log-rank teszt segítségével sem találtunk szignifikáns eltérést a két betegcsoport OS túlélési görbéje között ($p=0,5286$) (13. ábra). A közülük CR-be került 8 enyhén pozitív és 14 erősen pozitív beteg DFS görbéi sem mutattak eltérést ($p=0,4719$).



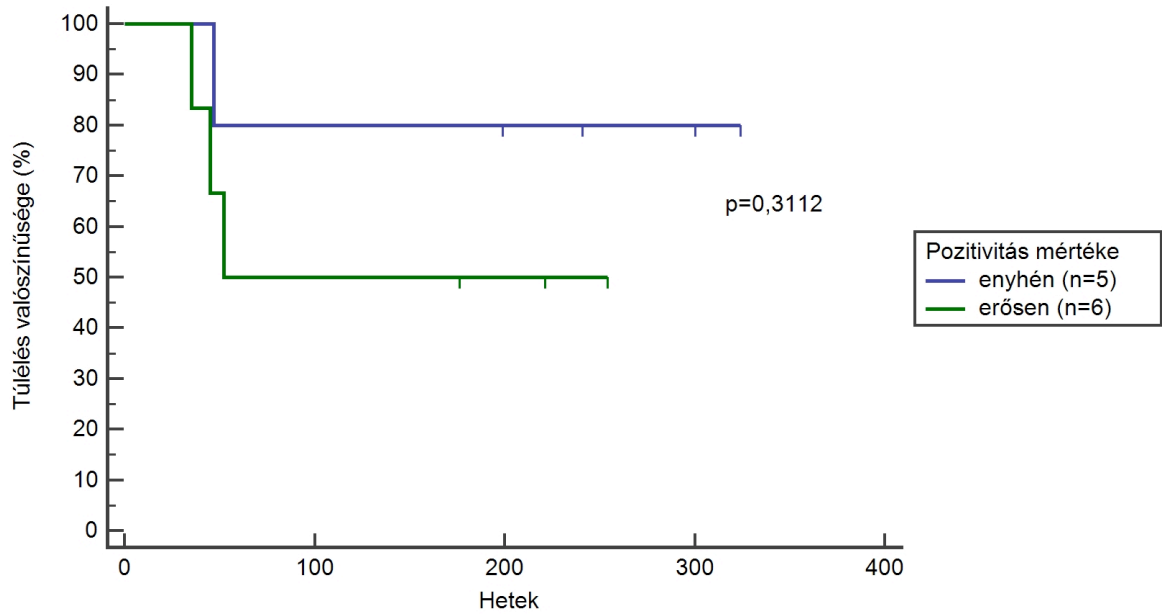
13. ábra A diagnózis idején enyhén pozitív és erősen WT1 pozitív betegek teljes túlélése

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 ($p=0,6773$) (14. ábra). A DFS a kis betegszám miatt (összesen 11 beteg: 2 enyhén WT1 pozitív, 9 erősen WT1 pozitív) klinikai relevanciát nem mutat ($p=0,401$).



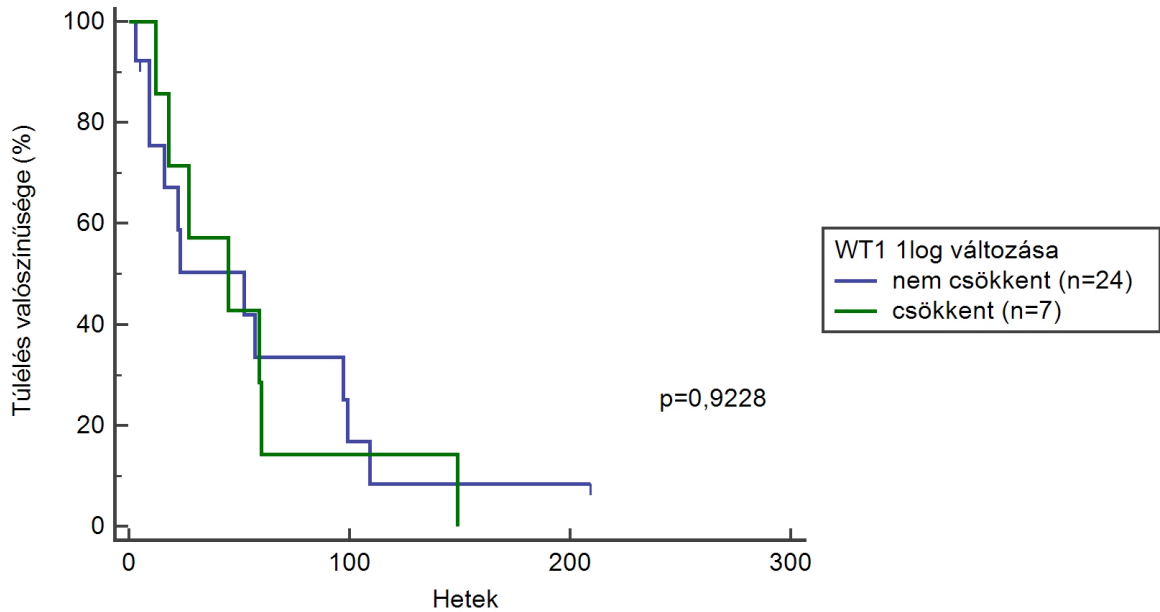
14. ábra Az első indukció után tartósan WT1 pozitív betegek esetén észlelt teljes túlélés valószínűsége enyhén pozitív és erősen pozitív WT1 expresszió esetén

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 (**15 ábra**). Hasonló eredményt kaptunk mind a 11 CR-be került WT1 negatívvá váló beteg DFS-nek összehasonlításakor is ($p=0,3674$).



15. ábra Az első indukciót követően WT1 negatívvá váló 11 beteg esetén az enyhe kezdeti WT1 expressziót és erős WT1 expressziót mutató betegek teljes túlélése

Annál a 31 betegnél, akik WT1 pozitívítása 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 ($p=0,9228$) (16. ábra). DFS-ben sem volt szignifikáns különbség ($p=0,2254$), a kis betegszám (összesen 11 beteg, 3 betegnél csökkent, 8 betegnél nem) miatt a túlélési görbe klinikailag nem releváns. 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 expresszió) van döntő szerepe.



16. ábra Az indukciót követően tartósan WT1 pozitív 31 beteg várható teljes túlélésének valószínűsége a WT1 expresszió mértékének csökkenése függvényében

5.2. A DLBCL-es betegek WT1 expressziója

Összesen 25 DLBCL-ben szenvedő beteg adatát dolgoztuk fel, a medián követési idő 116 hét volt. Tizenhét férfi (68%) és 8 (32%) nőbeteget kezeltünk. A betegek medián életkora 54 év volt, életkoruk tartománya pedig 24-77 év. A DLBCL diagnózisa minden esetben szövettani vizsgálaton alapult, elsősorban az érintett nyirokcsomóból. Öt esetben, amikor a kóros nyirokcsomó mellett extranodális érintettség is felmerült, a nyirokcsomón kívül érintett szervből vett minta (egy esetben nyelvgyök biopszia, egy esetben orbitába törő szövetszaporulat, három esetben gyomor biopszia) igazolt DLBCL-t. Klinikai centrumként számos városból érkeztek kezelésre betegek, akik szövettani vizsgálatát az adott kórházban végezték, ez magyarázza a hiányos szövettani altípus meghatározást (2 csíracentrum, 4 aktivált B-sejt eredetű altípus, 2 szürke zóna lymphoma ismert), valamint az átlagosnál lényegesen nagyobb számú magas rizikójú és kiterjedt betegséggel rendelkező esetet. A kezelés előtti stádium besorolás alapján kiterjedt, IV. klinikai stádiumú betegség 10 esetben (40%), III. stádium 9 esetben (36%), I. és II. stádium összesen 2 (8%), illetve 4 (16%) betegnél igazolódott. Extranodális érintettséget az összes betegből 5 esetben (20%), míg mediastinalis bulky tumort 5 betegnél (20%) észleltünk. Az IPI score alapján 15 beteg (60%) tartozott a magas rizikóval rendelkezők közé. B tünet 16 betegnél (64%) volt észlelhető. A kezelés megválasztásánál a betegség kiterjedése, a beteg biológiai állapota és életkora volt meghatározó. Összesen 13 beteg (52%) részesült a kemoterápia

mellett lokális irradiációban is. Tizenkét beteg (48%) csak kemoterápiát kapott. A diagnózist követően elsőként választott kezelés az R-CHOP protokoll volt, a kemoterápiás ciklusokat 14 vagy 21 naponta ismételtük. PET-CT-vel követtük a betegeket, nem megfelelő terápiás válasz esetén salvage kezelésre váltottunk. Ilyen esetben betegeink leggyakrabban DHAP, ICE vagy IGEV protokoll szerinti kezelésben részesültek, rituximab kiegészítéssel. Tizenhét beteg (68%) részesült autológ őssejt átültetésben. Transzplantáció történt a nagy rizikójú, rossz prognózisú, kiterjedt tumortömeeggel induló betegeknél, akiknél nagy volt a relapszus valószínűsége, vagy akiknél kezelésük során progressziót észleltünk. Az őssejtgyűjtésre jó terápiás válasz, lehetőség szerinti komplett remisszió esetén került sor. A leggyakrabban alkalmazott őssejt mobilizáló protokoll az R-DHAP volt. A betegek kondicionálása transzplantáció előtt R-BEAM, vagy Z-BEAM protokollnak megfelelő kemoterápia adásával történt. A 17 beteg esetén a transzplantációra a diagnózistól számítva átlagosan egy-másfél éven belül került sor intézetünkben. A kemoterápia mellett 17 beteg (68%) került remisszióba, parciális remisszió 6 (24%) betegnél alakult ki, míg kettő beteg (8%) eleve terápia refrakternek volt tartható. A vizsgálati idő végével 11 beteg (44%) volt életben. Az elhalálozott 14 betegből (56%) 10-en alapbetegségük progressziója, ketten szepszis, egy beteg akut veseelégtelenség és egy beteg transzplantációt követő veno-okkluzív betegség miatt hunyt el. A betegek adatai a **6. és 7. táblázatban** láthatóak.

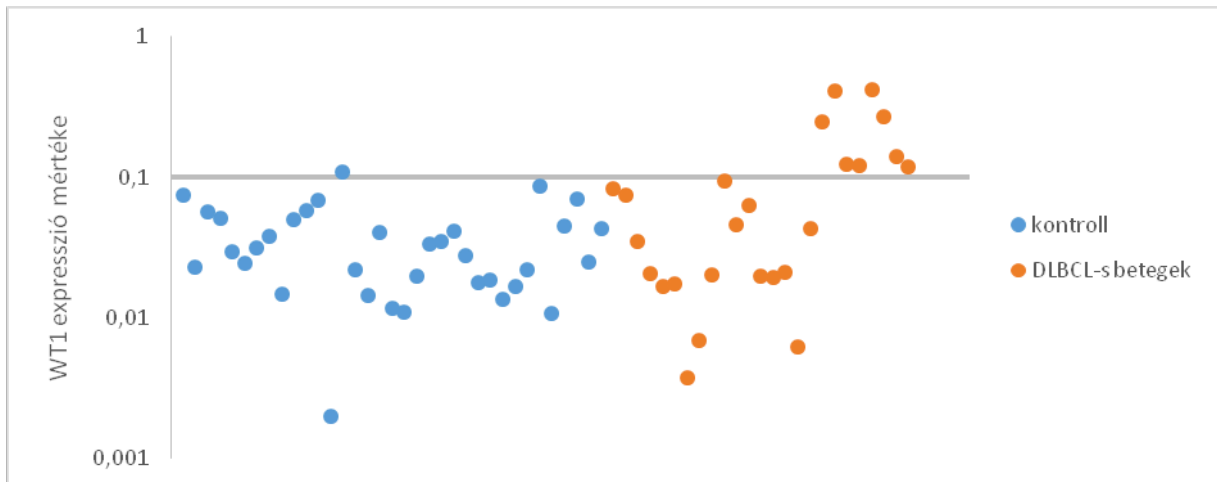
6.táblázat *A DLBCL-es betegek klinikai jellemzői*

| | |
|---|-------------------|
| Vizsgált betegek (betegszám, %) | 25 (100) |
| Férfi | 17 (68) |
| Nő | 8 (32) |
| Férfi/nő arány | 2,125 |
| | |
| Medián életkor (évek, tartomány) | 54 (24-77) |
| | |
| B tünetek (betegszám, %) | |
| Volt | 16 (64) |
| Nem volt | 9 (36) |
| | |
| Stádium (betegszám, %) | |
| I | 2 (8) |
| II | 4 (16) |
| III | 9 (36) |
| IV | 10 (40) |
| | |
| Bulky tumor | 5 (20) |
| Extranodalis érintettség | 5 (20) |
| | |
| IPI score (betegszám, %) | |
| Kis rizikó | 3 (12) |
| Kis intermedier rizikó | 7 (28) |
| Nagy intermedier rizikó | 6 (24) |
| Nagy rizikó | 9 (36) |
| | |
| Terápia (betegszám, %) | |
| Kemoterápia | 12 (48) |
| Kemoterápia és lokális irradiáció | 13 (52) |
| | |
| Autológ transzplantáció (betegszám, %) | |
| Történt | 17 (68) |
| Nem történt | 8 (32) |
| | |
| Terápiás válasz (betegszám, %) | |
| Komplett remisszió | 17 (68) |
| Parciális remisszió | 6 (24) |
| Terápia refrakter | 2 (8) |
| | |
| Halál oka (betegszám, %) | 14 (56) |
| Alapbetegség progressziója | 10 (40) |
| Szepszis | 2 (8) |
| Akut veseelégtelenség | 1 (4) |
| VOD | 1 (4) |

7. táblázat A DLBCL-es betegek klinikai jellemzőinek megoszlása a WT1 expresszió függvényében

| | WT1 pozitív betegek száma (%) | WT1 negatív betegek száma (%) |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Összesen | 8 (100) | 17 (100) |
| Stádium (p=0,7425) | | |
| I | 0 (0) | 2 (12) |
| II | 2 (25) | 2 (12) |
| III | 2 (25) | 7 (41) |
| IV | 4 (50) | 6 (35) |
| Bulky (p=0,5201) | 1 (12) | 4 (24) |
| Extranodalis (p=0,6681) | 2 (25) | 3 (18) |
| IPI score (p=0,4439) | | |
| Kis rizikó | 2 (25) | 1 (6) |
| Kis intermedier rizikó | 1 (12) | 6 (35) |
| Nagy intermedier rizikó | 2 (25) | 4 (24) |
| Nagy rizikó | 3 (38) | 6 (35) |
| B tünet (p=0,3171) | | |
| Volt | 4 (50) | 12 (71) |
| Nem volt | 4 (50) | 5 (29) |
| Kezelés (p=0,3195) | | |
| Kemoterápia | 5 (62) | 7 (41) |
| Kemo és sugárterápia | 3 (38) | 10 (59) |
| Autológ transzplantáció (p=0,6068) | | |
| Történt | 6 (75) | 11 (65) |
| Nem történt | 2 (25) | 6 (35) |
| Terápiás válasz (p=0,8373) | | |
| Komplett remisszió | 5 (63) | 12 (70) |
| Parciális remisszió | 2 (25) | 4 (24) |
| Refrakter beteg | 1 (12) | 1 (6) |
| Elhalálozás oka (p=0,8013) | | |
| Progresszió | 7 (88) | 7 (41) |
| Szepszis | 6 (75) | 4 (24) |
| Akut veseelégtelenség | 1 (12) | 1 (6) |
| Akut veseelégtelenség | 0 (0) | 1 (6) |
| Veno-okklúzív betegség | 0 (0) | 1 (6) |

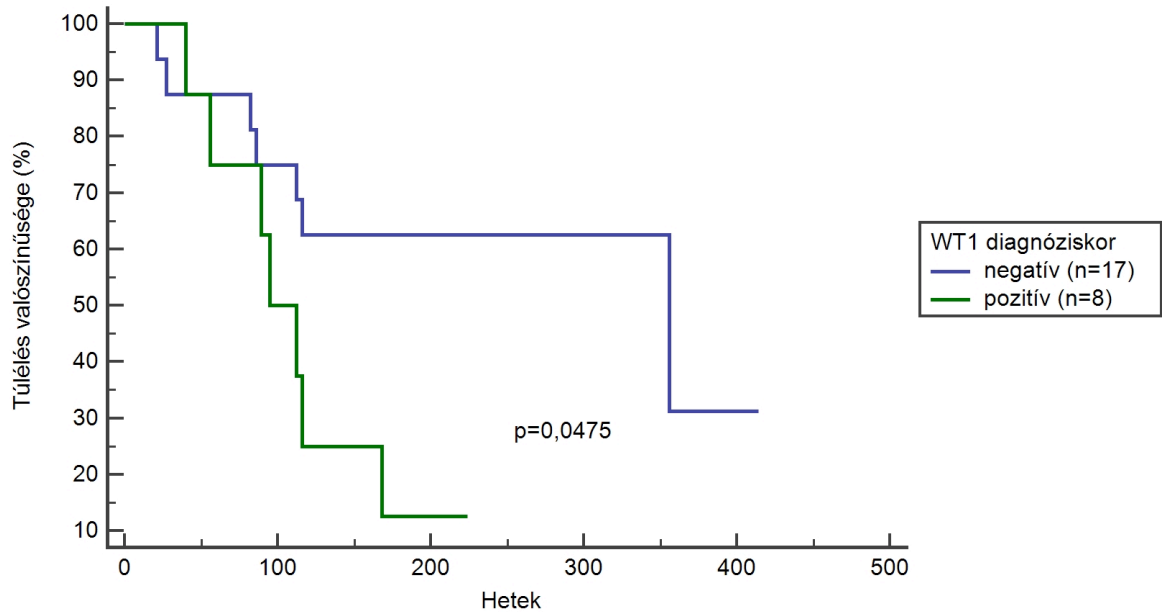
Kezdeti WT1 pozitívítást a 25 betegből 8 esetében (32%) tudtunk kimutatni (**17. ábra**).



17. ábra Az egészséges kontroll csoport és a DLBCL-es betegek kezdeti WT1 expressziója ($p=0,003$)

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

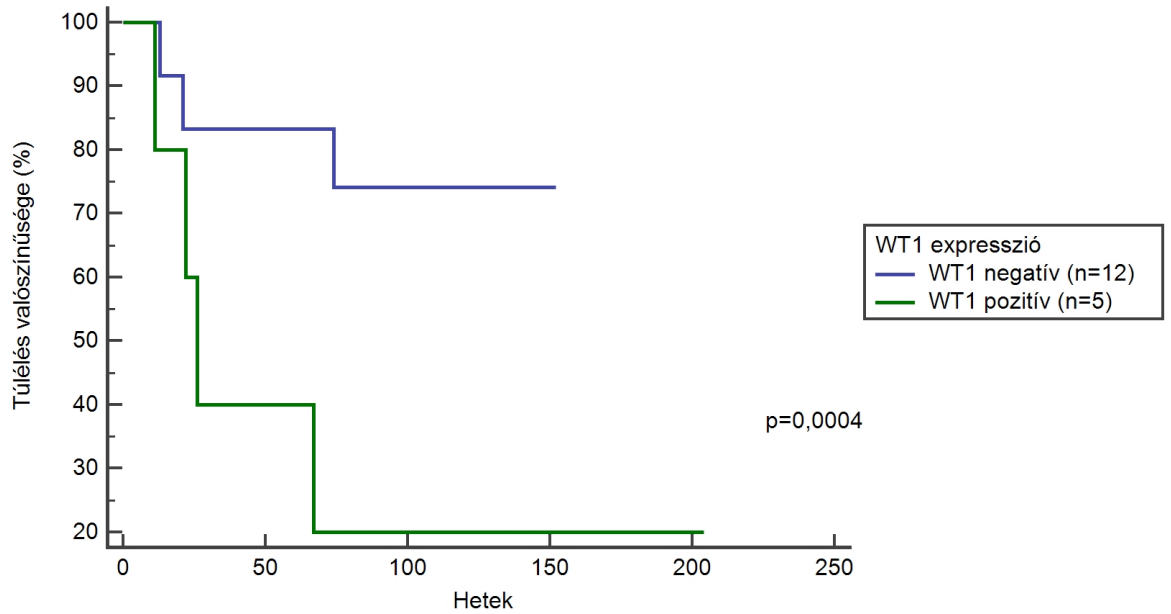
A kezdeti WT1 expresszió és kórlefordulás kapcsolatát túlélési görbék segítségével vizsgáltuk. A WT1 pozitív és WT1 negatív betegek OS és DFS eredményeit is összehasonlítottuk. A kezdetben WT1 gén negatív 17 beteg teljes túlélése (median: 131 hét, tartomány: 5-414 hét) szignifikánsan jobb volt ($p=0,0475$), mint a 8 WT1 pozitív betegé (median 103 hét, tartomány: 40-224) (**18. ábra**). A WT1 negatív betegek kétéves túlélési valószínűsége 68,8%, míg a WT1 pozitív betegeké csak 37,5% volt.



18.ábra A kezdetben WT1 negatív, illetve WT1 pozitív DLBCL-es betegek teljes túlélésének valószínűsége

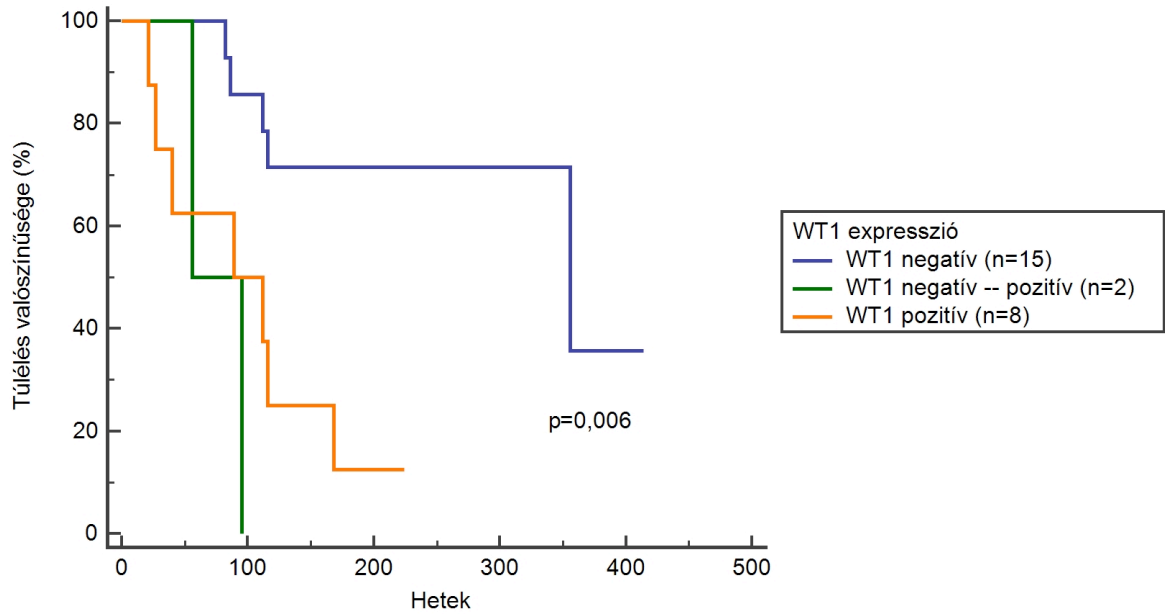
A kezelés mellett az összes betegből 17 (68%) került CR-be, hatan (24%) PR-be és két beteg (8%) terápia refrakternek bizonyult. A WT1 expressziós megoszlásukat tekintve a 8 WT1 pozitív betegből 5 (a WT1 pozitívak 63%-a) CR-be, kettő (a WT1 pozitívak 25%-a) PR-be került és egy beteg (a pozitívak 12%-a) bizonyult terápia refrakternek. A 17 WT1 negatív beteg 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 ($p=0,0004$). 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) (**19. ábra**).



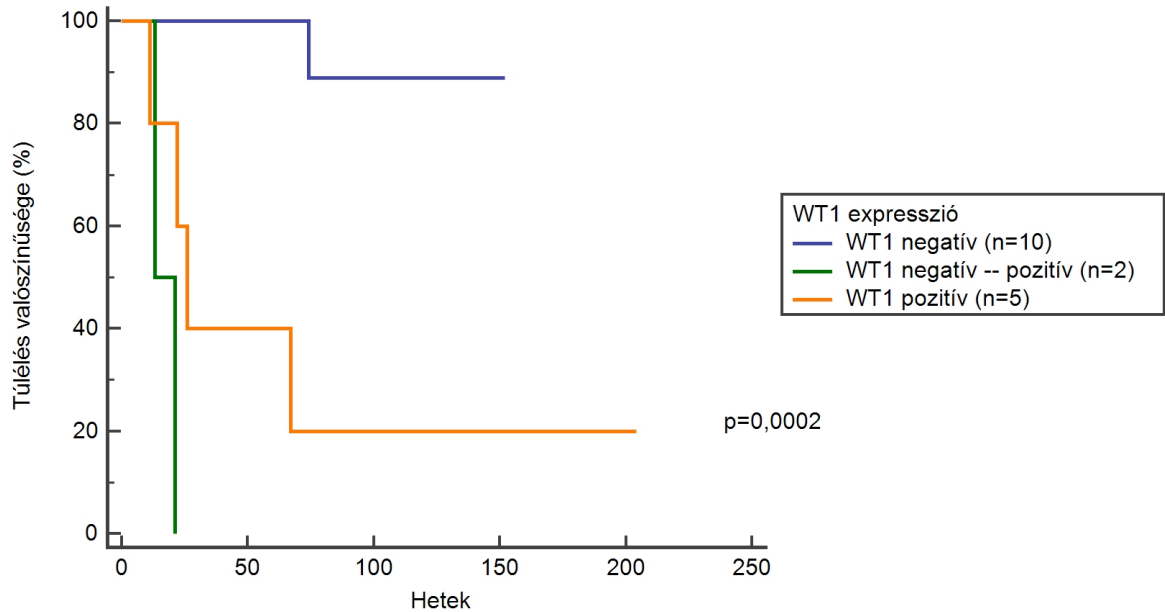
19. ábra A kezdetben WT1 negatív, illetve WT1 pozitív DLBCL-es betegek betegségmentes túlélése

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 WT1 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 (**20. ábra**).



20. ábra A teljes túlélés valószínűsége a végig WT1 negatív, a kezdetben negatív, majd kezelés során pozitívvá váló betegek, és a végig WT1 pozitív betegek esetén

A kis betegszám ellenére ugyanúgy lényeges különbség látszik a három betegcsoport remissziót elért eseteinek DFS eredményeiben is (**21. ábra**). A kezelés során WT1 negatív betegek jelentősen jobb betegségmentes túléléssel rendelkeztek, mint a WT1 pozitív, vagy a kezelés során pozitívvá váló betegek ($p=0,0002$).



21. ábra A kezelést követően remisszióba került, kezdetben WT1 pozitív, kezdetben WT1 negatív és a kezelés során pozitívvá váló esetek betegségmentes túlélése

A kezdetben WT1 negatív, majd kezelésük során WT1 pozitívvá váló két beteg esetét röviden külön is ismertetjük:

- Egy 54 éves nőbeteg kezdeti WT1 negativitás (0,002) mellett hat ciklus R-CHOP kemoterápia után PET-CT-vel igazolt CMR-be került. Kiterjedt betegsége miatt Z-BEAM kondicionálás után autológ őssejt átültetés történt. Nyolc héttel a transzplantációt követően újonnan megjelent, légzési panaszokat okozó mellkasi bulky tumor és nagy hasi nyirokcsomó konglomerátumok jelezték a betegség gyors relapszusát. Az ekkor történt mintavétel WT1 pozitivitást (0,139) igazolt. Mentő kezelés indult (R-IGEV és lokális mellkasi irradiáció), de a beteg állapota rapidan hanyatlott, heveny légzési elégtelenség tünetei között, alapteregségének progressziója következtében elhalálozott.
- Egy 50 éves, kezdetben WT1 negatív (0,0019) férfibetegnél hat ciklus R-CHOP kezelést követően PET-CT-vel igazolt komplett metabolikus remisszió alakult ki. A kemoterápia befejezése után nyolc héttel azonban újonnan megjelenő pericardialis és pleurális folyadékgyülem háttérben alapteregségének progressziója igazolódott. Ekkor nagy WT1 expressziót (226,0) észleltünk, a beteg mentő kemoterápiás protokollok alkalmazásában részesült (R-DHAP, majd R-IGEV), de életét további kemoterápiás kezeléssel sem sikerült megmenteni, és hat héttel a relapszust követően a beteg elhalálozott.

6. Megbeszélés

6.1. A Wilms tumor gén és az AML kapcsolata

Már két évvel a gén felfedezését követően igazolták onkogén funkcióját, bár pontos szerepe a leukémiák kialakulásában a mai napig sem tisztázott. Korábban az AML felismerésekor kimutatható nagy WT1 expressziót rossz prognosztikai jelnek tekintették (Miwa H, 1992; Bergmann L, 1997). A frissebb adatok ellentmondásosak, az irodalomból ismert eredmények döntően nagyobb része nem talált szignifikánsan jobb túlélést a kezdeti WT1 negatív betegek esetében sem (Noronha SA, 2009; Gianfaldoni G, 2010; Mossallam GI, 2013; Rossi G, 2016). Ezzel egyező eredményeket kaptunk mi is. Vizsgálataink emellett arra utalnak, hogy a génexpresszió kemoterápiát követő kimutathatósága esetén a DFS és OS egyaránt rosszabb. A WT1 génexpresszió jelentőségét az MRD követésében látjuk. A WT1 pozitív MRD pozitívást, és gyakoribb relapszust jelez (Candoni A, 2011; Casalegno-Garduno R, 2016; Malagola M, 2016; Rossi G, 2016). Számos vizsgálat elemzi fontosságát az őssejt átültetést követően észlelhető expresszióknak, mint az MRD kimutatás eszközének is (Candoni A, 2011; Casalegno-Garduno R, 2016; Di Grazia C, 2016; Rossi G, 2016). Emellett ígéretes immunológiai fegyver lehet a leukémiák hatékonyabb kezelésében is (Casalegno-Garduno R, 2016).

6.1.1. A Wilms tumor gén expressziója AML-es betegeinkben

Tanulmányomban 60 AML-es és 25 DLBCL-es beteg adatát dolgoztuk fel, az adatokat 2006. október és 2014. október között gyűjtöttük.

Gazdag irodalmi háttérismeret áll rendelkezésünkre a leukémiás betegek WT1 expressziójának csontvelőből történő vizsgálatáról (Ostergaard M, 2004; Gray JX, 2012; Andersson C, 2012; Polak J, 2013; Cilloni D, 2009). Van azonban olyan irodalmi adat is, 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. Ezzel pedig jobb (akár egy nagyságrenddel nagyobb) szenzitivitás érhető el (Cilloni D, 2008). Megjegyzendő azonban, 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 (Ostergaard M, 2004). Emellett a perifériás vérminta pedig invazív beavatkozás nélkül nyerhető, mind a betegektől, mind az egészséges önkéntesektől, akik mintáit

kontrollként használtuk fel. Vizsgálatunk során a korábban ritkábban használt módszert alkalmazva, a betegek perifériás vérmintáit elemeztük. Megjegyzendő, hogy bár az „Anyagok és módszerek” fejezetben nem került leírásra, de kezdetben párhuzamos vizsgálatokat is végeztünk egyidejűleg vett csontvelő és perifériás vérmintákból, és a mért eredmények jól korreláltak egymással, és ezt az irodalom is megerősíti (Ostergaard M, 2004).

6.1.2. A génexpresszió meghatározása

Az irodalomból ismert vizsgálatokban a WT1 mRNS szintjének logaritmikus csökkenését (változását) vizsgálták a beteg terápiás válaszában tükrében, ezzel jellemezve a génexpresszió csökkenésének, vagy növekedésének túlélésre gyakorolt hatását (Gianfaldoni G, 2010; Renneville A, 2009; Rossi G, 2016). Vizsgálatunkban a WT1 génexpresszió küszöbértékét elsőként határoztuk meg a GAPDH referenciagénre normalizálva. Ennek segítségével numerikusan definiáltuk a WT1 negatív, enyhén, valamint erősen WT1 pozitív betegeket. Így elemeztük a terápiát követő génexpresszió változás jelentőségét.

A perifériás vérmintából meghatározott WT1 expressziót egy endogén referenciagénre normalizáltuk. Az ismert referenciagének (GAPDH, ABL, béta-aktin és murine leukemia onkogén 1) közül a GAPDH gént használtuk fel. Irodalmi adatok alapján egyik referenciagén sem nyújt előnyt a másikkal szemben kontroll géneként alkalmazva (Ogawa H, 2004; Ostergaard M, 2004; Cilloni D, 2008; Cilloni D, 2009; Noronha SA, 2009; Willasch AM, 2009; Gray JX 2012; Polak J, 2012). A génexpresszió mértékét a GAPDH expresszió ismeretében értékeltük, meghatároztuk az 10000 GAPDH mRNS-re jutó WT1 mRNS molekula mennyiségét.

Az irodalomban nincs a WT1 expresszió numerikusan egyértelműen megadott küszöbértéke. Vizsgálatunkban a küszöbértéket az egészséges kontrollcsoporttól vett minták GAPDH-hoz viszonyított WT1 expressziója alapján határoztuk meg, a WT1 pozitivitás a kontroll minták 97,5 percentiliséhez tartozó érték (0,108) kerekítése 0,1-re. A küszöbértékét 0,1-nek adtuk 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 mért WT1 expressziós szintek széles skálán mozogtak, megállapítottunk egy második küszöbértéket is az erősen pozitív, magas WT1 expresszióknak (10,0). Alapul véve a matematikai számításainkat, az általunk vizsgált betegek és a hozzájuk tartozó WT1 expressziós értékek elemzése igazolta, hogy a statisztikailag megadott 0,1-es expressziós határ valóban megbízhatóan elkülöníti a WT1 expressziót ezen érték alatt, illetve e felett expresszáló betegek túlélését, progressziójának és relapszusának valószínűségét.

6.1.3. A leukémiás betegek klinikai jellemzői

A vizsgálati idő alatt a betegek 41%-a került CR-be, és a vizsgálat befejeztével életben lévő betegek aránya 23% volt.

A 60 leukémiás betegből 53 esetén (88,33%) igazoltuk a betegség felismerésekor a WT1 génexpresszió jelenlétét. Ez az expressziós arány megfelel az irodalomban ismertetett eredményeknek is, amely az általunk használt metodika helyességére utal (Cilloni D, 2009; Ostergaard M, 2004).

Nem volt összefüggés a FAB altípus, a csontvelői blastos infiltráció mértéke, vagy a kezdeti perifériás fehérvérsejt szám és WT1 expresszió megjelenése és mértéke között. Ugyanígy, a többi ismert rossz prognosztikai tényező jelenléte sem korrelált a gén expressziójával (rossz prognózisú karyotípus, FLT3 pozitivitás vagy NPM1 negativitás). Hasonló eredmények ismeretesek a nemzetközi, nagyobb betegszámú tanulmányok eseteiben is, nem találtak összefüggést a diagnóziskor észlelt WT1 expresszió, a FAB altípusok, ill. a klasszikus cytogenetiai prognosztikai csoportok között sem (Ishikawa Y, 2011).

6.1.4. A betegség felismerésekor észlelt WT1 expresszió

A leukémia felismerésekor a WT1 negatív betegek teljes túlélésének medián értéke és a kétéves túlélés valószínűsége egyaránt kedvezőbb volt, mint a WT1 pozitívaké. Bár a WT1 negatív betegek teljes és betegségmentes túlélési eredményei jobbak voltak, a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak (OS: $p=0,0812$; DFS: $p=0,1232$). A betegség felismerésekor észlelhető WT1 expresszió mértéke és annak prognózisra gyakorolt hatása vitatott. Korábban a WT1 fokozott expressziójával járó eseteket egyértelműen kedvezőtlennek tartották (Miwa H, 1992; Bergmann L, 1997). Mi nem találtuk prognosztikai jelentőségét az AML felismerésekor észlelt nagyobb WT1 génexpresszióknak, és az újabb irodalmi adatok is erre utalnak (Mossallam GI, 2013; Gianfaldoni G, 2010). A korábbiakkal ellentétben egyes szerzők a nagy WT1 expressziót mutató AML-es betegek esetében akár jobb túlélést is találtak (Migliano M, 2011). APL-ben és T-sejtes ALL-ben a kezdeti nagy WT1 érték volt a legkedvezőtlenebb, ezt követte a kicsi vagy hiányzó WT1 expresszió és mindkét kórképben a közepes mértékű expresszió esetén találták a legjobbnak a CR arányt és a túlélést (Heesch S, 2010; Hecht A, 2015). Ezek a nem egy irányba mutató, sokszor ellentmondó adatok utalhatnak arra is, hogy a metodikából fakadó eltérések mellett a WT1 szerepe a különböző alcsoportba tartozó AML-es betegek leukemogenezisében eltérő lehet (Ostergaard M, 2004). Feltevések szerint magyarázhatja a

diverz eredményeket, hogy a WT1 gén akut leukémiában elsősorban onkogénként, de tumorszuppresszor génként is részt vehet a leukemogenezis bonyolult és nem teljesen ismert folyamataiban. Ezek alapján nagy WT1 szintek esetén az onkogén hatás érvényesülhet, míg a hiányzó, vagy alacsony WT1 expresszió révén a tumorszuppresszor hatás kiesése is hozzájárulhat a leukémia kialakulásához, mely más genetikai károsodással együtt differenciáció zavart, leukemoid transzformációt hozhat létre (Ostergaard M, 2004; Heesch S, 2010). Ezekben az esetekben a fokozott WT1 expresszió indukálta megnövekedett proliferációs aktivitás, és a gátolt apoptózis hozzájárulhat a csökkent kemoterápiás érzékenységhez, ill. rezisztenciához is (Heesch S, 2010). A WT1 gén összetett működésével és hatásainak sokféleségével magyarázhatjuk az egymásnak sokszor ellentmondó klinikai eredményeket, melyek pontos megértése még várat magára.

6.1.5. A WT1 expresszió változása az indukciós kezelést követően

Vizsgálatunk során a kezdeti WT1 pozitivitást mutató betegek esetén az indukciós kezelést követően észlelt WT1 expresszió küszöbérték alá való csökkenése (azaz molekuláris remisszió) minden esetben komplett hematológiai remisszió kialakulásával járt együtt. A betegség felismerése óta WT1 negatív, illetve a kezelés hatására negatívvá váló betegeket együtt nézve statisztikailag szignifikánsan jobb teljes túlélést ($p < 0,0001$) és betegségmentes túlélést ($p = 0,0180$) észleltünk.

Az első indukciós kezelésre kialakuló WT1 negativitás jelentőségének megítélésére, a vizsgált 49 beteget három csoportra osztottuk. A betegség felismerése óta WT1 pozitív 31 beteg és 7 WT1 negatív beteg mellett külön vizsgáltuk a kezdetben WT1 pozitív, de kezelést követően negatívvá váló 11 beteget. Ezek alapján a legjobb OS túléléssel a kezdetben WT1 expressziót mutató, de az első indukció hatására negatívvá váló betegek rendelkeztek, túlélésük még a betegség felismerésétől WT1 negatív eseteknél is kedvezőbbnek bizonyult.

Az eredményekben leírt adatok szerint a WT1 expresszió változása alapján elkülönített három betegcsoport eltérően reagált az első indukciós kezelésre. A végig negatív csoportba tartozó betegeknek csak 42%-a került CR-be, de ők később is végig remisszióban is maradtak (DFS 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 remisszió időtartama is a legkedvezőtlenebb volt.

Az indukciós kezelésre negatívvá váló betegek kezdeti WT1 értékeinek mediánja lényegesen kisebb volt, mint a végig pozitívaké. Egyes szerzők APL-ben és T-ALL-ben az enyhe (náluk közepes, „intermedier”) WT1 expressziót mutató betegek túlélését találták a legjobbnak (Heesch S, 2010; Luo

CK, 2014; Hecht A, 2015). Ezt ismerve néztük meg, hogy a kezelésre negatívvá váló betegek esetén a küszöbérték alá csökkenő WT1 szint, vagy a diagnóziskor észlelt kezdeti enyhe WT1 expresszió szerepe lehet-e fontosabb a túlélés tekintetében. A kapott eredmények alapján a kezelésre negatívvá váló betegekkel azonos kezdeti WT1 szinttel bíró, de végig WT1 pozitív betegek túlélése szignifikánsan rosszabb volt ($p=0,00278$), mint a 11 WT1 negatívvá váló betegé. Így ez az eredmény azt támasztja alá, hogy nem a kezdeti WT1 mennyisége a legfontosabb, hanem az, hogy a kezelés után a gén expressziójának szintje a küszöbérték alá csökken-e.

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 (Heesch S, 2010). Az alapján, hogy a kezdetben is küszöbérték alatti WT1 expressziót mutató, negatívnak tekintett betegek is reagálhatnak viszont 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 korigálja. 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 (Miyawaki S, 2010; Cilloni D, 2008; Shibasaki Y, 2015), hangsúlyozva az indukciós kezelés utáni fokozott WT1 szint prognosztikai szerepét. Nomdedeu és mtsai (2013) nagyszámú AML-es beteget vizsgáltak, és indukciós kezelést követően leggyakrabban előforduló relapszust és legrövidebb OS-t azokban a betegekben észlelték, akiknél az indukció után a WT1 kópiák száma nagyobb volt 170-nél, 10^4 ABL génre vonatkoztatva. Cilloni és mtsai (2009) szerint ugyanezek az eredmények 250 kópia szám felett igazolódtak, Rossi és mtsai (2014, 2016) közleményében pedig 77×10^4 ABL kópia érték fölött találtak rövidebb OS-t. 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.

A diagnóziskor észlelt WT1 pozitivitás mértéke nem befolyásolta túlélését. A Kaplan-Meier görbék hasonló lefutást mutattak, s a log-rank teszt sem jelzett összefüggést a WT1 pozitivitás mértéke és a teljes túlélés között. ($p=0,5286$).

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 (0,1) alá (nem alakult ki molekuláris remisszió). Két másik munkacsoport vizsgálatában az indukciós kezelést követő WT1 expresszió 2 log csökkenése szignifikánsan jobb teljes és betegségmentes túlélési eredményeket mutatott (Cilloni D, 2009; Rossi G, 2016).

Az első indukciós kezelésre WT1 negatívvá váló 11 beteg közül relapszusba került négy beteg esetén a WT1 expresszió ismételten a küszöbérték felé emelkedett. Az irodalom alapján az emelkedő WT1 expresszió akár hetekkel (2-42) megelőzheti a klinikai relapszust (Ostergaard M, 2004). Mi egy betegnél regisztráltuk hat héttel a relapszust megelőzően a WT1 szint küszöbérték fölé emelkedését, a többi esetben a relapszus idején vett minta igazolta a WT1 ismételt pozitívítását. APL-es betegünkben a WT1szint 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, mely szerint a WT1 génexpresszió kemoterápiát követő változásának (megmaradt nagy WT1 expresszó, illetve a jelentős csökkenés hiánya) prognosztikai jelentősége van (Candoni A, 2011; Shibasaki Y, 2015; Rossi G 2016). Az expresszió növekedése a relapszus korai jele lehet (Gianfaldoni G, 2010; Renneville A, 2009; Casalegno-Garduno R, 2016; Malagola M, 2016; Rampal R, 2016; Rossi G, 2016). Igazolt tény, hogy a WT1 expresszió meghatározásának jelentősége van a transzplantáció sikerességének előrejelzésében is. WT1 pozitívítás (vagyis MRD pozitívítás) esetén végzett transzplantáció után gyakoribb a relapszus megjelenése és rövidebb a betegek túlélése, ugyanúgy, mint WT1 negativitást követően a post-transzplantációs időszakban megjelenő WT1 pozitívítás is gyakoribb relapszussal jár (Pozzi S, 2013). Nincs azonban egyértelmű irodalmi adat arra, hogy a megjelenő expresszió mértéke befolyásolja-e a kialakuló relapszus nagyságát (Polak J, 2012). Célszerű lenne a betegek vizsgálata során a WT1 meghatározás és a multiparaméteres áramlási citometria együttes alkalmazása az MRD követésére (Marani C, 2013; Rossi G, 2014; Shibasaki Y, 2015; Malagola M, 2016). Egyes adatok szerint a két módszerrel külön-külön kapott eredmények hasonlóak, a részletes összehasonlítás alapján azonban az indukciós kezelés utáni korai progresszió megítélésére a WT1 expresszió meghatározása, a konszolidációs kezelés után a multiparaméteres áramlási citometria tűnik valamivel alkalmasabbnak (Rossi G, 2014; Malagola M, 2016; Rossi G, 2016). Ez a megállapítás azonban még további vizsgálatot igényel.

6.2. A WT1 gén és a DLBCL kapcsolata

Munkánkban a non-Hodgkin lymphomás esetek közül a DLBCL-ben szenvedő betegek WT1 expresszióját vizsgáltuk. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a WT1 gén szerepéről és klinikai jelentőségéről lymphomákban. Három munkacsoport immunhisztokémiai festéssel mutatta ki a gén expresszióját nyirokcsomó szövettani mintákból non-Hodgkin lymphomában (Drakos E, 2005; Wang YF, 2012) és Hodgkin lymphoma esetén (Vadasz Z, 2012). Vadasz és munkatársai feltételezték a

WT1 gén esetleges proangiogenetikus szerepét a Hodgkin lymphoma kialakulásában, de ennek szélesebb irodalma nem ismert. Wang és munkatársai 2012-ben ALCL-ben szenvedő betegek nyirokcsomó mintáiban vizsgálták a gén expresszióját, prognosztikai jelentőségét és annak túlélést befolyásoló hatását. A teljes túlélést vizsgálva a WT1 expresszióknak nem volt prognosztikai jelentősége, bár megállapításukat limitálja, hogy csak a kezdeti szövettanból nyert minta immunhisztokémiai vizsgálatát végezték el, és ezeket az eredményeket vetették össze a betegek túlélésével. Ismételt mintavétel nem történt, így a WT1 gén expressziójának időbeni változását nem követhették.

6.2.1. Mintavétel DLBCL-es betegek esetén

Munkánk tervezése során az első kérdést a mintavétel módja jelentette. Mint azt néhány sorral fentebb jeleztük, az eddigi kutatócsoportok a daganatos nyirokcsomóból vett minta WT1 gén expresszióját vizsgálták. A betegség felismerésekor vett szövettani mintából immunhisztokémiai módszerrel kimutatható a WT1 gén expressziója, de az ismételt mintavételek már nehézkesek. A kezelést követően jó terápias válasz esetén nincs vizsgálható nyirokcsomó, illetve a betegek követése során nem szerencsés ismételt sebészeti beavatkozásokkal mintát nyerni. Emellett a betegek szövettani mintáihoz nem lehet egészséges egyének nyirokcsomóit eltávolítva azokat kontrollként használni. Vizsgálatunkkal arra kerestünk választ, hogy meghatározható-e a perifériás vérből kezelés előtt és után a WT1 génextpresszió qRT-PCR segítségével DLBCL-ben. Kimutatható-e korreláció a betegség stádiumával, valamint használható-e a WT1 meghatározás prognosztikai faktorként. Az egészséges önkéntesek perifériás vérmintáiból meghatározott WT1 expresszió vizsgálataink szerint megfelelő kontrollnak volt tekinthető.

6.2.2. A perifériás vérben észlelt WT1 génextpresszió lehetséges magyarázatai

Dolgozatunk írásakor nem rendelkezünk irodalmi adattal arra nézve, hogy van-e, és ha igen, mi az oka az NHL-ben szenvedő betegek perifériás vérmintáiban észlelt fokozott WT1 expresszióknak. A kétezres évek elején elkezdett WT1 expressziós vizsgálatok először az AML-re fókuszáltak, majd a gyermekkori és felnőtt akut lymphoid leukémiák vizsgálata következett (Magyarosy, 2003). Mind a két esetben egyértelművé vált, hogy a perifériás vér alkalmas a WT1 expresszió vizsgálatára. A közelmúltban MDS-ben és CML-ben (krónikus myeloid leukémiában) is leírták a betegség követésére a génextpresszió meghatározását perifériás vérből (Van Dijk JP, 2002; Szántó A, 2015). Normális

hemopoiesis esetén a CD34 pozitív csontvelői őssejtek mutatnak WT1 expressziót. MDS-ben több tanulmány is igazolta, hogy CD34 negatív, de egyéb dysplasiás abnormalitásokat mutató, nem feltétlen blastos morfológiájú sejtvonal is bír WT1 expresszióval. Ezen sejtekben nem gátlódik a WT1 gén aktivitása, szemben a normális sejtekkel, és ezek a dysplasiás sejtek megjelenhetnek a perifériás keringésben (Ueda Y, 2013; Van Dijk JP, 2002). NHL-ben a keringésben megjelenő, fokozott WT1 expressziót mutató kóros sejtek jelenléte magyarázhatja a perifériás vérben mérhető WT1 expressziót, mivel fokozott számban keringő normális hemopoetikus őssejt jelenlétére nincs adat. NHL esetén a perifériás vérben keringő daganatsejtek kimutatásának szenzitivitása (relapszus esetén 1/100 sejt) jóval alacsonyabb, mint magának a gén expressziójának szenzitivitása (1/10000). (Magyarosy, 2003). Ez azt is magyarázhatja, hogy a WT1 expresszió korai emelkedése miatt jelzi előre a relapszust és a kedvezőtlenebb kimenetelt a relapszus megjelenése előtt. Emellett elképzelhető, hogy a daganatos sejtek működését befolyásoló mikrokörnyezet sejtjeinek abnormalis WT1 expresszióját is észlelhetjük méréseink során.

6.2.3. A DLBCL-es betegek WT1 expressziós eredményei

A 25 betegből a vizsgálati idő végére csak 11 beteg (44%) maradt életben, amit az magyaráz, hogy transzplatációs klinikai centrumként a környező kórházakból az előrehaladott stádiumban lévő DLBCL-es betegek nagyobb számban kerültek hozzánk kezelésre autológ őssejt transzplantáció potenciális várományosaiként. Az első, a betegség igazolásakor gyűjtött adatok és a kezdeti WT1 expresszió között kerestünk összefüggést. A betegek közül 8 esetében (32%) igazolódott WT1 pozitívítás. A kis betegszám ellenére a WT1 pozitívítás aránya megfelel a kevés NHL-ről szóló tanulmány nyirokcsomó mintáiból nyert adatainak (Wang YF, 2012). Hasonló expressziós arány észlelhető az eltérő mintavételi módszer mellett is, mely arra utal, hogy DLBCL esetén nem szükségeszerű a nyirokcsomó 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.

Az AML-es eredményeinktől eltérően jelentős különbség volt észlelhető a kezdeti fokozott WT1 expressziót mutató és nem mutató betegek teljes túlélése között. A WT1 negatív betegek kétéves túlélési valószínűsége (68,8%) és teljes túlélése (medián 131 hét, tartomány: 5-414 hét) szignifikánsan jobb volt ($p=0,0475$), mint a WT1 pozitív betegek kétéves túlélésének valószínűsége (37,5%) és teljes túlélése (medián 103 hét, tartomány: 40-224 hét). Kezdeti vizsgálataink alapján az eltérések egyértelmű magyarázatát nem tudjuk, és az irodalomban sem találtunk erre vonatkozó adatokat.

Korábban megjelent közleményünkben munkacsoportunk köpenysejtes lymphomában a DLBCL-hez hasonlóan kedvezőbbnek találta a kezdetben WT1 negatív betegek túlélését. Perifériás T-sejtes lymphomában szenvedőknél nem volt különbség a túlélésben. MALT és Burkitt lymphomában WT1 expresszió nem volt kimutatható (Ujj Zs, 2014). Feltehetően a rosszabb prognózissal járó WT1 pozitivitás esetén több kóros, malignus sejt kerülhet a keringésbe, valószínűleg agresszívabb betegséggel állhatunk szemben.

A kemoterápiás kezelés eredményeként a 17 WT1 negatív beteg közül 12 beteg (a negatívak 70%-a) került CR-be. Ezen esetek betegségmentes túlélése (medián: 113 hét, tartomány: 66-152 hét) is szignifikánsan jobbnak bizonyult ($p=0,0004$), mint az eredetileg WT1 pozitív 8 betegből CR-be került, de továbbra is WT1 pozitív 5 beteg (a pozitívak 63%-a) betegségmentes túlélése (medián: 22 hét, tartomány: 11-204 hét). 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 beteg esetén 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 függhet 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 betegeknél, melynek terápiás vonzata is lehet. Ha a sorozatos MRD vizsgálatok progresszív betegséget igazolnak, akár kezdeti WT1 pozitivitás esetén is felmerülhet a kezelés intenzifikálása, és az első CR-ben az őssejt transzplantáció lehetősége is. A későbbiekben akár immunterápiás fegyverként is használható lehet a betegség kezelésében. Mindehhez nagyobb betegszámú vizsgálatokra lenne még szükség.

7. 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 kezdetől WT1 negatív betegeknél is.
4. A tartósan WT1 negatív AML-es betegek indukciós kezelésre adott kedvező válaszának 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 beteget 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.

8. Összefoglalás

A Wilms tumor (WT1) gént korábban tumorszupresszor génnek tartották, amelynek deléciója egy gyermekkori vesetumor kifejlődéséhez járul hozzá. A WT1 gén egy cink-ujj transzkripciós faktort kódol, amely több gén expressziójának negatív vagy pozitív szabályozásán keresztül fontos szerepet játszik a sejtosztódásban, differenciálódásban, apoptózisban. Az embriogenesis során a mesodermális eredetű sejtekben normális esetben is kifejeződik. Szerény WT1 expresszió több felnőtt szövetben is kimutatható, többek között a CD34+ csontvelői őssejtekben, ami fiziológias funkcióra utal. Nagy expresszió észlelhető számos szolid daganatban és több malignus hematológiai kórképben is. A hematológiai betegségek körében részletesebben tanulmányozott a WT1 expresszió prognosztikai szerepe akut myeloid leukémiában. A lymphomák és WT1 expressziójának kapcsolatáról kevés adat található az irodalomban.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy módszerünk alkalmas-e lymphomás és leukémiás betegek perifériás vérmintáiban a WT1 gén expressziójának detektálására. Egészséges önkéntesektől vett kontroll minták és a GAPDH endogén referenciagén segítségével meghatároztuk a WT1 expresszió küszöbértékét. A perifériás vérben a WT1 expresszió megbízhatóan vizsgálható. A küszöbérték feletti eredményeket kórosnak tekintettük, a WT1 pozitivitás küszöbértéke 0,1-nek adódott. Az erős WT1 pozitivitás küszöbértékét 10,0-nél tudtuk megadni. AML esetén igazoltuk, hogy a kezdeti WT1 pozitivitás mértéke nem befolyásolta a betegek túlélését, illetve a WT1 negatív csoport túlélése bár kedvezőbb volt, de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Ezzel szemben igazoltuk, hogy a kezelés hatására negatívvá váló betegek túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult a végig WT1 pozitívknál, illetve a végig WT1 negatív betegeknél is. A kezelést követően WT1 negatívvá váló betegek esetén a WT1 expresszió ismételt küszöbérték felé emelkedése pedig megbízhatóan jelezte a klinikai relapszust. A küszöbérték feletti WT1 expresszió nagysága, és annak a kóros tartományon belüli egy vagy két nagyságrendbeli csökkenése nem befolyásolta a túlélést.

DLBCL esetén első alkalommal végeztünk WT1 expressziós vizsgálatot perifériás vérből. Az expresszió küszöbérték feletti előfordulási gyakorisága az irodalomban korábban ismertett nyirokcsomóból igazolt gyakorisággal megegyező. A kezdetben WT1 expressziót mutató DLBCL-es betegek OS-e és DFS-e szignifikánsan rosszabbnak bizonyult, de a kezdeti WT1 expresszió nem volt kapcsolatban a beteget jellemző egyéb vizsgált prognosztikai markerekkel. A kezelést követően kórossá váló WT1 expresszió jelezte a klinikai relapszust. Eredményeink arra utalnak, hogy a DLBCL-ben szenvedő betegek esetében a WT1 gén fokozott expresszója mind a prognózis megítélésében, mind a betegség követésében hasznos segítséget nyújt. Akut myeloid leukémiás betegeinkben a követés során ismételten megjelenő WT1 expresszióknak nagyobb szerepe lehet a betegség kimenetelét illetően, mint a diagnóziskor észlelhető WT1 gén expressziójának. A WT1 expresszió vizsgálata segítséget nyújthat a kezelése során a betegség követésében, a korai relapszus megítélésében, a minimális reziduális betegség monitorozásában és a jövőben a WT1 gén elleni célzott immunterápia javíthatja a kezelés eredményességét.

9. Summary

Wilms tumor (WT1) gene was considered as tumor suppressor before. Its deletion contributed to developing a childhood kidney tumor. WT1 gene encodes a zinc finger transcription factor, which plays an important role in cell division, differentiation and apoptosis by positively or negatively regulating them. Normally it is expressed during embryogenesis in mesodermal originated cells. Weak WT1 expression can be detected in several adult tissue, which suggests physiologic function. WT1 is expressed in CD34+ hematopoietic stem cells also. Strong expression can be detected in several solid tumors as well as in several hematological malignancies. The prognostic role of WT1 expression is investigated in details in acute myeloid leukemia. The connection of WT1 expression and lymphomas are published less in the literature.

We investigated, whether our technique is feasible to detect WT1 gene expression in the peripheral blood samples of lymphoma and leukemia patients. We defined the threshold of WT1 expression in the samples of healthy volunteers by using GAPDH endogen reference gene. WT1 expression could be investigated reliably. Results above threshold were considered as abnormal. The threshold of WT1 positivity was 0.1. Strong WT1 expression was considered above 10.0. The measure of WT1 expression detected before treatment did not influence survival of AML patients. Survival of WT1 negative group was more favorable, however difference was not significant to the WT1 positive group. Survival of patients becoming negative from initial positive owing to treatment was more favorable, than those are positive alongside through treatment and WT1 negative patients. WT1 expression rising above threshold of patients who became negative owing to treatment showed dependable early sign of relapse. The extent of WT1 expression above threshold and its decrease by 1-2 logs within the abnormal range did not influence survival.

We performed WT1 expression from peripheral blood samples of DLBCL patients for the first time. The frequency of expression above threshold is identical with the frequency detected from the lymph nodes, reported in the literature. The OS and DFS was significantly worse of initially WT1 expressing DLBCL patients, however initial WT1 expression did not show relationship with other prognostic factors. Abnormal WT1 expression occurring after treatment predicted relapse. Our results suggested that increased WT1 expression helps both evaluating prognosis and follow-up of DLBCL patients. Repeatedly appearing WT1 expression may have major role in predicting outcome during follow-up of AML patients, than initial WT1 expression at the time of diagnosis. Investigation of WT1 expression may help in follow-up of patients, in judging early relapse and monitoring minimal residual disease. Targeted therapy directed against WT1 gene may improve therapeutic efficacy in the future.

10. Tárgyszavak

WT1 gén, expresszió, qRT-PCR, túlélés, prognózis, heveny myeloid leukémia, diffúz nagy B-sejtes lymphoma

Keywords

WT1 gene, expression, qRT-PCR, survival, prognosis, acute myeloid leukemia, diffuse large B-cell lymphoma

11. 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 segítségéért.

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 és a cikkek elkészültének irányítását 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 segítése nélkül. Köszönöm férjemnek Dr. Jóna Ádámnak, kislányomnak Panninak, Édesanyámnak. Édesapámnak külön kiemelve szeretném megköszönni szakmai támogatását és folyamatos ellenőrző munkáját.

12. Irodalomjegyzék

Akagi T, Yoshikawa M, Nakanishi H, et al. (2015) A case of WAGR syndrome in association with developmental glaucoma requiring bilateral Baerveldt glaucoma implants and subsequent tube repositioning. *N Clin Ophthalmol* **15**: 1081-1084.

Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, et al. (2011) Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* **117**: 4519–4529.

Alimoghaddam K. (2014) A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia: *Int J Hematol Oncol Sem Cell Res* **8**: 44-54.

Andersson C, Li X, Lorenz F, et al. (2012) Reduction in WT1 gene expression during early treatment predicts the outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Diagn Mol Pathol* **21**: 225–233.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**: 2391-2405.

Armand P, Kim HT, Logan BR, et al. (2014) Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **123**: 3664-3671.

Baba M, Hata T, Tsushima H, et al. (2015) The level of bone marrow WT1 message is a useful marker to differentiate myelodysplastic syndromes with low blast percentage from cytopenia due to other reasons. *Intern Med* **54**: 445-451.

Ballen KK, Koreth J, Chen YB, et al. (2012). Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* **119**: 1972-80.

Barnes JA, Jacobsen E, Feng Y, et al (2013) Everolimus in combination with rituximab induces complete responses in heavily pretreated diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **98**: 615-619.

Bergmann L, Maurer U, Weidmann E, et al. (1997) Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* **25**: 435–443.

Bor YC, Swartz J, Morrison A, et al. (2006) The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev* **20**:1597-608.

Boussiotis VA (2015) Cell-specific PD-L1 expression in DLBCL. *Blood* **126**: 2171-2172.

Brayer J, Lancet JE, Powers J, et al. (2015) WT1 vaccination in AML and MDS: A pilot trial with synthetic analog peptides *Am J Hematol* **90**: 602-607.

- Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K, et al. (2004) Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13q22): results from CALGB 8461. *J Clin Oncol* **22**: 1087-1094.
- Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, et al. (2011) Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant* **25**: 308–316.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. (1971) Report of the committee on Hodgkin lymphoma staging classification. *Cancer Research* **31**: 1860–1861.
- Casalegno-Garduno R, Schmitt A, Spitschak A, et al. (2016) Immune responses to WT1 in patients with AML or MDS after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Int J Cancer*. **138**: 1792-1801.
- Celalettin U, Lucy AG. (2015) Molecular genetic markers in acute myeloid leukemia. *J Clin Med* **4**: 460-478.
- Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H. et al. (2011) Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator WT1. *PLoS Genet*. **7**: e1002404.
- Chau YY, Hastie ND (2012) The role of WT1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet*. **28**: 515-524.
- Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, et al. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* **15**: 5323-5337.
- Cilloni D, Messa F, Arruga F, et al. (2008) Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* **93**: 921–924.
- Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. (2009) Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: an European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* **27**: 5195–5201.
- Cilloni D, Saglio G (2004) WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* **112**: 79–84.
- Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, et al. (2015) Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood* **126**: 1033-1040.

- Copelan EA, Grunwald MR, Druhan LJ, et al. (2015) Use of molecular markers to determine postremission treatment in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* **8**: 143-149.
- Dao T, Pankov D, Scott A, et al. (2015) Therapeutic bispecific T-cell engager antibody targeting the intracellular oncoprotein WT1. *Nat Biotechnol* **33**: 1079-1086.
- Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, et al. (2004) Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the WT1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* **13**: 235–246.
- Dennis SL, Manji SS, Carrington DP, et al. (2002) Expression and mutation analysis of the Wilms' tumor1 gene in human neural tumors. *Int J Cancer* **97**: 713–715.
- Di Grazia C, Pozzi S, Geroldi S, et al. (2016) Wilms Tumor 1 Expression and Pre-emptive Immunotherapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia Undergoing an Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **22**: 1242-1246.
- Di Stasi A, Jimenez AM, Minagawa K, et al. (2015) Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol.* **6**: 1-6.
- Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. (2015) International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with > 30% blasts. *Blood* **126**: 291-299.
- Drakos E, Rassidakis GZ, Tsioli P, et al. (2005) Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **3**: 132–137.
- Elstrom RL, Andemariam B, Martin P, et al. (2012) Bortezomib in combination with rituximab, dexamethasone, ifosfamide, cisplatin and etoposide chemoimmunotherapy in patients with relapsed and primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma* **53**: 1469–1473.
- Essafi A, Webb A, Berry RL, et al. (2011) A WT1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell* **21**: 559–574.
- Fang C, Zhu D, Dong H, et al. (2015) Lenalidomide alone or in combination with chemotherapy treatment for subtypes of diffuse large B cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**: 10705-10713.
- Gaiger A, Schmid D, Heinze G, et al. (1998) Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **12**: 1886–1894.

Gao L, Xue SA, Hasserjian R, et al. (2003) Human cytotoxic T lymphocytes specific for Wilms' tumor antigen-1 inhibit engraftment of leukemia-initiating stem cells in non-obese diabetic-severe combined immunodeficient recipients. *Transplantation* **75**: 1429–1436.

Gasiorowski RE, Clark GJ, Bradstock K, et al. (2014) Antibody therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **164**: 481-495.

Gessler M, Poustka A, Cavenee W, et al. (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* **343**: 774–778.

Gianfaldoni G, Mannelli F, Ponziani V, et al. (2010) Early reduction of WT1 transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease free and overall survival in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **95**: 833–836.

Gole B, Wiesmüller L. (2015) Leukemogenic rearrangements at the mixed lineage leukemia gene (MLL) multiple rather than a single mechanism. *Front Cell Dev Biol* **25**: 41.

Gray JX, McMillen L, Mollee P, et al. (2012) WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk Res* **36**: 453–458.

Guo JK, Menke AL, Gubler MC, et al. (2002) WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet* **11**: 651–659.

Hastie ND (1993) Wilms' tumour gene and function. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 408-413.

Hecht A, Nolte F, Nowak D et al. (2015) Prognostic importance of expression of the Wilms' tumor 1 gene in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. **56**: 2289-2295.

Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, et al. (2010) Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **95**: 942-949.

Hohenstein P, Hastie ND (2006) The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* **15**: 196–201.

Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, et al. (2002) Very low frequencies of human normal CD34⁺ hematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumor gene WT1 at the levels comparable to those in leukemia cells. *Br J Haematol* **116**: 409–420.

Huang JL, Liao Y, An Y, et al. (2015) Spontaneous rupture of adult Wilms' tumor: A case report and review of the literature. *Can Urol Assoc J* **9**: 7-8.

Huff V (2011) Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* **11**: 111-121.

Huff V. (1996) Genotype/phenotype correlations in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol* **27**: 408–414.

Ijpenberg A, Pérez-Pomares JM, Guadix JA, et al. (2007) WT1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* **312**: 157–170.

Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T (2011) Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* **35**: 685-688.

Issa JP, Roboz G, Rizzieri D, et al. (2015) Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol* **16**: 1099-1110.

Juliusson G, Antunovic P, Derolf A et al. (2009) Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**: 4179-4187.

Kolitz JE (2006) Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematol* **134**: 555-572.

Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. (2009) Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* **301**: 2349-2361.

Koziell A, Charmandari E, Hindmarsh PC, et al. (2000) Frasier syndrome, part of the Denys Drash continuum or simply a WT1 gene associated disorder of intersex and nephropathy? *Clin Endocrinol* **52**: 519–524.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**: 679–691.

Ladomery M, Sommerville J, Woolner S et al. (2003) Expression in *Xenopus* oocytes shows that WT1 binds transcripts in vivo, with a central role for zinc finger one. *J Cell Sci* **116**: 1539-1549.

Loo CK, Pereira TN, Ramm GA. (2012) Abnormal WT1 expression in human fetuses with bilateral renal agenesis and cardiac malformations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **94**: 116–122.

Luo S, Yu K, Yan QX, et al. (2014) Analysis of WT1 mutations, expression levels and single nucleotide polymorphism rs16754 in de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. **55**: 349-357.

Lynn RC, Poussin M, Kalota A, et al. (2015) Targeting of folate receptor β on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood* **125**: 3466-3476.

- Madden SL, Cook DM, Morris JF, et al. (1991) Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* **253**: 1550–1553.
- Magyarosy E, Varga N, Timár J, et al. (2003) Follow-up of minimal residual disease in acute childhood lymphoblastic leukemia by WT1 gene expression in the peripheral blood: the Hungarian experience. *Pediatr Hematol Oncol* **20**: 65-74.
- Malagola M, Skert C, Borlenghi E, et al. (2016) Risk stratification in acute myeloid leukemia (AML) patients Postremission sequential monitoring of minimal residual disease by WT1 Q-PCR and multiparametric flow cytometry assessment predicts relapse and may help to address risk-adapted therapy in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Med.* **5**:265-274.
- Marani C, Clavio M, Grasso R, et al. (2013) Integrating post induction WT1 quantification and flow-cytometry results improves minimal residual disease stratification in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* **37**: 1606-1611.
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. (2011) Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* **29**: 475-486.
- Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, et al. (2013) Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* **87**: 146-171.
- Mazrouei S, Ziaei A, Tanhaee AP, et al. (2012) Apoptosis inhibition or inflammation: the role of NAIP protein expression in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas compared to non-neoplastic lymph node. *J Inflamm Lond* **9**: 4.
- Merli M, Ferrario A, Maffioli M, et al. (2015) Everolimus in diffuse large B-cell lymphomas. *Future Oncol* **11**: 373-383.
- Miglino M, Colombo N, Pica G et al. (2011) WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia
Leuk Lymphoma, **52**: 1961–1969.
- Milligan DW, Grimwade D, Cullis JO, et al. (2006) Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. *Brit J Haemat* **135**: 450-474.
- Miwa H, Beran M, Aunders GF (1992) Expression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* **6**: 405-409.
- Miyata Y, Kumagai K, Nagaoka T, et al. (2015) Clinicopathological significance and prognostic value of Wilms' tumor gene expression in colorectal cancer.) *Cancer Biomark* **15**: 789-797.
- Miyawaki S, Hatsumi N, Tamaki T, et al. (2010) Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **51**: 1855-1861.

- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, et al. (1999) YAC complementation shows a requirement for WT1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**: 1845–1857.
- Morrison AA, Viney RL, Lodomery MR (2008) The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochim Biophys Acta* **1785**: 55-62.
- Mossallam GI, Hamid TM, Mahmoud HK (2013) Prognostic significance of WT1 expression at diagnosis and end of induction in Egyptian adult acute myeloid leukemia patients. *Hematology* **18**: 69–7313.
- Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. (2012) Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **30**: 4515-4523.
- Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, et al. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* **119**: 1329-1341.
- Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, et al. (2012) Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther* **136**: 334-342.
- Nomdedeu J, Hoyos M, Carricondo M, et al. (2013) Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia* **27**: 2157–2164.
- Noronha SA, Farrar JE, Alonzo TA, et al. (2009) WT1 expression at diagnosis does not predict survival in pediatric AML: a report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer* **53**: 1136–1139.
- Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, et al. (2004) WT1 gene transcript assay for relapse in acute leukemia after transplantation. *Leuk Lymphoma* **45**: 1747–1753.
- Oka Y, Tsuboi A, Murakami M, Hirai M, et al. (2003) Wilms tumor gene peptide-based immunotherapy for patients with overt leukemia from myelodysplastic syndrome (MDS) or MDS with myelofibrosis. *Int J Hematol* **78**: 56-61.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. (2004) Induction of WT1 (Wilms' tumor gene) specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 13885–13890.
- Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, et al. (2004) WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients – results from a single-center study. *Brit J Haematol* **125**: 590-600.
- Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P (2010) The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol* **28**: 13–19.

- Parenti R, Perris R, Vecchio GM, et al. (2013) Immunohistochemical expression of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human epithelial and mesenchymal tissues. *Acta Histochem* **115**: 70–75.
- Parenti R, Puzzo L, Vecchio GM, et al. (2014) Immunolocalization of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human peripheral sympathetic and gastroenteric nervous system. *Acta Histochem* **116**: 48–54.
- Parenti R, Salvatorelli L, Musumecic G, et al. (2015) Wilms' tumor 1 (WT1) protein expression in human developing tissues. *Acta Histochemica* **117**: 386–396.
- Polak J, Hajkova H, Maalaufova-Soukupova J, et al. (2011) Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression. *Exp Ther Med*. **3**:129-133.
- Pfreundschuh M, Zwick C, Zeynalova S, et al. (2008) Dose-escalated CHOEP, for the treatment of young patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: II. Results of the randomized high-CHOEP trial of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Annals of Oncology* **19**: 545–552.
- Polak J, Hajkova H, Maalaufova-Soukupova J, et al. (2012) Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression. *Exp Ther Med*. **3**:129-133.
- Polak J, Hajkova H, Haskovec C, et al. (2013) Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma* **60**: 74–82.
- Port M, Böttcher M, Thol F, et al. (2014) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* **93**: 1279-1286.
- Pozzi S1, Geroldi S, Tedone E, et al. (2013) Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol*. 2013 **160**: 503-509.
- Qi XW, Zheng XD, Zong BG, et al. (2015) Association between WT1 polymorphisms and susceptibility to breast cancer: results from a case-control study in a southwestern Chinese population. *Am J Cancer Res* **15**: 1234-1250.
- Qi XW, Zhang F, Wu H, et al. (2015) Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* **5**: 8924.
- Que J, Wilm B, Hasegawa H, et al. (2008) Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 16626–16630.

- Rampal R, Figueroa ME. (2016) Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. **101**: 672-679.
- Ravandi F, Ritchie EK, Sayar H, et al. (2015) Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study. *Lancet Oncol* **16**: 1025-1036.
- Renneville A, Boisse IN, Zurawski V, et al. (2009) Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a study from the acute leukemia French association. *Cancer* **115**: 3719– 3727.
- Rossi G, Minervini M, Melillo L et al. (2014) Predictive role of minimal residual disease and log clearance in acute myeloid leukemia: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilm's tumor 1 levels. *Ann Hematol* **93**: 1149–1157.
- Rossi G, Minervini MM, Carella AM et al. (2016) Wilms' Tumor Gene (WT1) Expression and Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. In: van den Heuvel-Eibrink MM, Wilms Tumor. Brisbane (AU), Codon Publications; Chapter **16**: 273-286.
- Sadek HA, El-etnawey WH, Shaheen IA, et al. (2011) Quantitative assessment of Wilms tumor 1 (WT1) gene transcripts in Egyptian acute lymphoblastic leukemia patients. *Investig Med* **59**: 1258-1262.
- Salvatorelli L, Bisceglia M, Vecchio G, et al. (2011) A comparative immunohistochemical study of oncofetal cytoplasmic WT1 expression in human fetal, adult and neoplastic skeletal muscle. *Pathologica* **103**: 186.
- Sanford D, Ravandi F. (2015) Management of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Current Strategies and Future Directions. *Drugs Aging* **32**: 983-997.
- Sarkaria SM, Christopher MJ, Klco JM, et al. (2014) Primary acute myeloid leukemia cells with IDH1 or IDH2 mutations respond to a DOT1L inhibitor in vitro. *Leukemia* **28**: 2403-2406.
- Schmid D, Heinze G, Linnerth B, et al. (1997) Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**: 639–643.
- Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, et al. (2012) Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncology* **13**: 1250–1259.
- Scholz H, Kirschner KM. (2005) A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* **20**: 54–59.

- Seam P, Juweid ME, Cheson BD. (2007) The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood* **110**: 3507–3516.
- Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, et al. (2004) Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood* **103**: 4036-4042.
- Shibasaki Y, Seki Y, Tanaka T, et al. (2015) The association of level of reduction of Wilms' tumor gene 1 mRNA transcript in bone marrow and outcome in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. **39**: 667-671.
- Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR et al. (1993) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med* **329**: 987–994.
- Small D (2006) FLT3 mutations: Biology and treatment. In *Hematology* **1**: 178-184.
- Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, et al. (2014) Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* **120**: 2497-2506.
- Sorrer ML, Storb RF, Sandmaier BM, et al. (2014) Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* **32**: 3249-3256.
- Sugiyama H (2010) WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* **40**: 377-387.
- Sugiyama H. (2005) Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *Expert Rev Vaccines* **4**: 503–512.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**: 2375-2390.
- Szántó A, Pap Z, Dénes L, et al. (2015) Real-time quantitative PCR detection of WT1 and M-BCR-ABL expressions in chronic myeloid leukemia. *Rom J Morphol Embryol* **56**: 703-707.
- Takakura K, Koido S, Kan S, et al. (2015) Prognostic markers for patient outcome following vaccination with multiple MHC Class I/II-restricted WT1 peptide-pulsed dendritic cells plus chemotherapy for pancreatic cancer. *Anticancer Res* **35**: 555-562.
- Toogeh G, Ramzi M, Faranoush M, et al. (2016) Prevalence and Prognostic Impact of Wilms' Tumor 1 (WT1) Gene, Including SNP rs16754 in Cytogenetically Normal Acute Myeloblastic Leukemia (CN-AML): An Iranian Experience. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. **16**: 21-26.
- Trindade F, Tellechea O, Torrelo A, et al. (2011) Wilms tumor 1 expression in vascular neoplasms and vascular malformations. *Am J Dermatopathol* **33**: 569–572.

Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, et al. (2013) Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* **54**: 1450-1458.

Ujj Z, Buglyó G, Udvardy M et al. (2014) WT1 overexpression affecting clinical outcome in non-Hodgkin lymphomas and adult acute lymphoblastic leukemia. *Pathol Oncol Res.* **20**: 565-570.

Vadasz Z, Shasha-Lavsky H, Nov Y, et al. (2013) Wilms' tumor gene 1: a possible new proangiogenic factor in Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **21**: 177-180.

Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT, et al. (2002) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br J Haematol* **118**: 1027-1033.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**: 2292-2302.

Vidovic K, Svensson E, Nilsson B, et al. (2010) Wilms' tumor gene 1 protein represses the expression of the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in human hematopoietic progenitors and in leukemic cells. *Leukemia* **24**: 992–1000.

Vitolo U, Chiappella A, Angelucci E, et al. (2009) Dose-dense and high-dose chemotherapy plus rituximab with autologous stem cell transplantation for primary treatment of diffuse large B-cell lymphoma with a poor prognosis: a phase II multicenter study. *Haematologica* **94**: 1250-1258.

Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, et al. (2014) Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **15**: 730-737.

Wagner KD, Wagner N, Schedl A (2003) The complex life of WT1. *J Cell Sci* **116**: 1653-1658.

Wander SA, Levis MJ, Fathi AT (2014) The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol* **5**: 65-77.

Wang X, Gao P, Lin F, et al. (2013) Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) is involved in the carcinogenesis of lung cancer through interaction with PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int* **14**: 114.

Wang YF, Yang YL, Gao ZF, et al. (2012) Clinical and laboratory characteristics of systemic anaplastic large cell lymphoma in Chinese patients. *J Hematol Oncol* **5**: 38-46.

Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, et al. (2009) Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* **23**: 1472-1479.

Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. (2015) Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med* **21**: 922-926.

- Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, et al. (1996) Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* **87**: 2878–2884.
- Yanada MG, Borthakur G, Ravanadi F, et al. (2008) Relapse and death during first remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **4**: 633-634.
- Yi-Ning Y, Xiao-rui W, Chu-xian Z, et al. (2015) Prognostic significance of diagnosed WT1 level in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Ann Hematol.* **94**: 929-938.
- Yohe SJ (2015) Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Med* **4**: 460-478.
- Yoon JH, Jeon YW, Yahng SA, et al. (2015) Wilms tumor gene 1 expression as a predictive marker for relapse and survival after hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes. *Blood Marrow Transplant* **21**: 460-467.
- Zhao C, Bratthauer GL, Barner R, et al. (2007) Diagnostic utility of WT1 immunostaining in ovarian sertoli cell tumor. *Am J Surg Pathol* **31**: 1378–1386.



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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.02.17.

