

# Využití detekce somatických mutací pro pacienty s cytopenií nejasného významu a u myelodysplastického syndromu

| Tomáš Stopka

BIOCEV a 1. interní klinika – 1. lékařská fakulta UK a VFN, Praha

Autor participuje na národním projektu udržitelnosti center výzkumu LQ1604.

## Abstrakt

Somatické mutace u nádorových onemocnění včetně hematologických malignit jsou výsledkem selekce buněk v průběhu života a některé procesy, jako třeba chemoterapie nebo radioterapie, vývoj nádorového onemocnění v případě takové dispozice uspíší. Zahájení protinádorové léčby může ovlivnit mutační spektrum nádorového klonu, a to zejména u pacientů, kteří na terapii zareagují, v opačném případě terapie napomůže propagaci klonu a zvýšení alelické frekvence mutací rezistentních klonů. V tomto článku bych chtěl upozornit na výhodnost longitudinálního výzkumu pacientů s chronickým postupně progredujícím postižením krve u myelodysplastického syndromu.

## Genetické změny stárnutí

Během stárnutí organizmu dochází prostřednictvím nezcela jasných procesů v některých genech, jež kódují významné regulátory metylace DNA a histonů v chromatinu, k mutacím u zjevně zdravých lidí. Dochází tedy k postupnému postižení aparátu, který nazýváme epigenetickým a jež reguluje genovou expresi na úrovni transkripcie DNA. Mezi nejčastěji postižené geny během stárnutí patří DNA methyl-transferáza DNMT3A, protein ze skupiny Polycomb ASXL1 a metylcytosin dioxygenáza TET2 (1). Zatímco v 50 letech života vykazuje mutace krvetvorby asi 1 % jedinců, v 65 letech je to již 10 % a toto procento se dále zvyšuje se vzrůstajícím věkem. U některých pacientů s hematologickými malignitami, především s akutní myeloidní leukemií (AML) (2) a MDS (3), byly zjištěny mutace v těchto a zhruba stovce genů a bylo dále ukázáno, že u zdravých jedinců s pozitivní

detekcí těchto mutací se mohou tato závažná onemocnění vyvinout. Vychází se tedy z předpokladu, že v průběhu stárnutí organizmu dochází v krvetvorné kmenové buňce k mutaci, jež vede k buněčné výhodě, která následně umožní zmnožení těchto buněk, a tím, vzhledem k omezené kapacitě pro kmenové buňky, k rozšíření mutovaného klonu v celé krvetvorbě. Přítomnost jedné mutace podmiňuje vznik dalších mutací a rozvoj selekčního prostředí pro růstovou výhodu buněk nestejných vlastností, jemuž říkáme klonální vývoj, a vytváří dominantní klonu s mutacemi a řadu meziproduktů, takzvaných minoritních klonů. Nejméně dvě mutace klíčových genů podmiňují vznik AML (4).

Role stárnutí při vzniku MDS je zřejmá i vzhledem k tomu, že se jedná o onemocnění především šesté až sedmé dekády života. MDS narušuje zpětnovazebné vztahy mezi potřebou a možnostmi organizmu a vede k nedostatečnému vývoji myeloidních linií a tvorbě leukocytů, erytrocytů a trombocytů. Postupným vývojem dochází ke ztrátě schopnosti diferencovat, což způsobuje akumulaci myeloblastů v kostní dřeni a periferní krvi. Postižení myeloidní linie většinou nebývá doprovázeno klonálním postižením lymfoidních buněk (5), i když duplicitní malignity lymfoidního typu, především nehodgkinské lymfomy, se u MDS nezřídka vyskytují. Některé z nich, jako například chronická lymfatická leukemie (CLL), jsou též považovány za onemocnění staršího věku s indolentním průběhem. Předpokládá se proto, že porucha na úrovni kmenových buněk může do jisté míry vyústit v hematologické onemocnění s různým projevem.

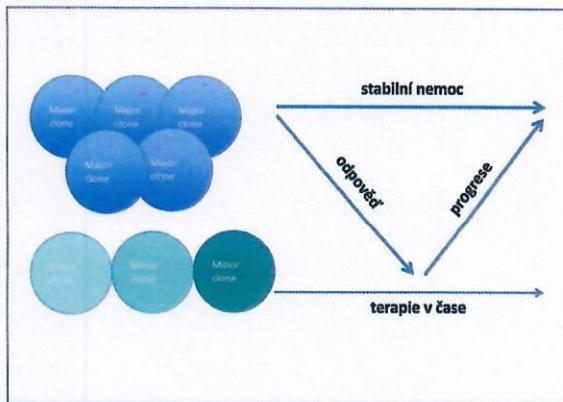
## Genetické změny v předchorobí MDS

Charakteristické u starých nemocných jsou jednoduché či mnohočetné cytopenie. Většina pacientů však spíše patří do skupin anémii sideropenických (zejména při chronickém krvácení na ASA), deficiece folátů a B12 (poruchy vstřebávání) či anemie chronických nemoci (ACD). Méně početná je naopak skupina imunitních trombocytopenií (ITP) a virových infekcí, například parvovirem B19. Vyloučení především těchto rozličných, avšak ovlivnitelných etiologií vede k identifikaci pacientů, kteří zhruba se stejnou frekvencí jako MDS, vykazují cytopenie nejasného významu (ICUS, Idiopathic Cytopenia of Unknown Significance). Vedle této skupiny naopak stojí skupina pacientů bez zjevné poruchy krvetvorby se známkami klonality včetně přítomnosti somatických mutací, tzv. CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indetermined Potential) (6). V těchto dvou skupinách (ICUS, CHIP) tvořících zjevně předchorobí MDS se relativně často nacházejí pacienti dříve léčení chemo/radioterapií pro rozličné malignity, například prsu, střeva či štítné žlázy. Práce na toto téma publikovaná v minulosti na ASH ukázala, že mutace p53 zjištěné u tMDS po léčbě Hodgkinova lymfomu jsou detektovatelné ještě před terapií lymfomu, chemoterapie tedy posiluje selekční prostředí pro klonální vývoj kmenových buněk. Proto je v tuto chvíli jisté na místě, aby pacienti, kteří absolvovali chemoterapii, byli kontrolovaní na přítomnost somatických mutací za účelem odlišit ty jedince, kteří mají vyšší riziko pro transformaci do AML či MDS. Pro tyto účely se jeví jako výhodné využít amplifikované sekvenování nové generace s hloubkou kolem 10 000 čtení každé báze v opakování vytvořených knihovnách ideálně dvou vzorků kostní dřeně a porovnat výskyt takových změn s jinou tkání daného pacienta. Pokud se takové mutace identifikují, měly by se dále monitorovat stejně jako i pacienti nesoucí tyto mutace s ohledem na možnou transformaci do MDS či AML.

## MDS a dynamika klonálních změn

Odstranění mutacemi postižených MDS klonů se zdá prozatím nerealistické, přesto pacienti, kteří během léčby dosáhnou kompletní remise, vykazují výrazný pokles či dočasné vymizení mutací (Stopka, et al., nepublikováno). Naopak, pacienti, kteří nedosáhnou léčebné odpovědi, mají trvalý vzorec mutací takřka nezměněn. Problém tedy představují omezené léčebné možnosti, jež v případě MDS zahrnují inhibitory DNA metylace: 5-azacitidin (AZA) (7) a 5-aza-2'-deoxycytidin (Decitabine) (8). Asi třetina pacientů s MDS reaguje na AZA hematologickou odpověď. Pacienti, kteří na léčbu zareagují, však selžou, a to většinou v progresi do AML (9). Za rezistenci k AZA a progresi do AML lze vy-

pozorovat význam mutovaných kmenových buněk, jež jsou schopny krátkodobě omezit buněčné dělení a překonat supresivní prostředí terapie, zatímco následně, po vytvoření mechanizmů rezistence, jsou schopny se vrátit do buněčného cyklu a způsobit expanzi nádorového klonu (10). Zmíněné mechanizmy rezistence na AZA jsou v tuto chvíli nejasné, ale lze se domnívat, že existují varianty, jež mají rozličnou senzitivitu k AZA, a tudíž některé z těchto variant mohou přispívat k znovuobnovení klonální expanze. Na obrázku je znázorněna současná představa spojující využití hluboké mutační analýzy v kostní dřeni postižených pacientů. Zatímco stabilní nemoc bez odpovědi na léčbu je charakterizována stabilním vzorcem mutací, naopak odpověď na léčbu vede k poklesu alelické frekvence v průběhu terapie. Progrese nemoci je naopak charakterizována vystupem alelické frekvence původních mutací či vznikem nových. Zapojení minoritních klonů při terapeutické rezistenci a následném progresu klonu bylo též pozorováno.



Zdroj: archiv autora

Mezi významné otázky v biologii MDS patří též otázky mutační dynamiky, potenciálu rozličných minoritních klonů a v neposlední řadě i otázky eradikace klonálních nádorových buněk. Studie 213 MDS pacientů všech rizikových skupin léčených hypometylační terapií ukázala asociaci mutací v dioxygenáze TET2 s léčebnou odpovědí. Přítomnost mutace ASXL1 u těchto pacientů (s mutací TET2) byla naopak asociována s nižší odpovědí, což naznačuje, že ně-

které varianty mohou být senzitivní k demetylační terapii, zatímco jiné ne, a tedy fakt, zda pacient na AZA odpovídá či nikoli, souvisí více se vzorcem mutací než s postižením pouze jednoho genu (11). Některé mutace mají vztah k délce života pacientů, často jsou považovány za rizikové faktory, i když jako v případě mutací TP53 jejich mutace nesouvisejí s navozením léčebné odpovědi hypometylační terapie (11), nemluvě o tom, že asi třetina pacientů s mutací TP53 má zcela srovnatelné přežívání s TP53 nemutovanými pacienty. Z toho vyplývá, že jde především o typ varianty, a nikoli opět o postižený gen, a cílem sekvenačního úsilí je tedy především vytvořit kolekci funkčně ověřených a klinicky zkoumaných variant, jež mají zřetelně negativní prognostický dopad, a tak eventuálně odlišit ty varianty, které přežívání pacientů neovlivňují.

Další studie se 107 MDS pacienty léčenými hypometylační terapií ukázala, že žádný z 26 analyzovaných cílů somatických mutací neovlivňuje léčebnou odpověď, avšak některé z variant, především u TP53 a DNMT3A byly spojeny s nižším přežíváním a doby do AML progrese (12). Další studie 134 pacientů léčených s AZA prokázaly asociaci variant v TP53 s kratší dobou přežívání, avšak bez vlivu na odpověď (13). Některé univariantní analýzy ukazovaly naopak, že existují asociace mutací epigenetického aparátu (EZH2, ASXL1) s delším přežíváním na AZA (13). Přes tyto nadějně studie je přenos poznatků o somatických mutacích do klinické praxe značně omezen, a to především proto, že mutace u MDS se vyskytují asi ve stovce genů a jejich kombinace se jeví prozatím veskrze jako náhodná. Recentní studie obsahující opakování sekvenace 41 MDS pacientů v době diagnózy a při progresi však ukázala, že existují určité cílové geny, které spíše modifikují průběh MDS a asociovají s progrésí včetně ASXL1, RUNX1 a TP53 (14), přestože statistická evaluace tohoto pozorování byla založením studie dosti komplikovaná. Data z našeho pracoviště nicméně potvrzují, že právě tyto geny jsou v pozadí progrese do AML a zatímco TP53 a ASXL1 patří spíše mezi stabilní mutace, mutace v RUNX1 (a též BCORL1) se objevují až jako následek klonální selekce AML na terapii AZA. Hlavním cílem v terapii rezistence AZA nicméně zůstává především rozšířit terapeutické možnosti pro rizikové pacienty s potenciálem ovlivnit pacienty nereagující na AZA, či využít tyto látky v době, kdy ztratily molekulární nebo klinickou odpověď. Mezi nadějné studiové zkoumané látky v současnosti jistě patří rigosertib (15), jež představuje látku blokující rozličné proteiny obsahující vazebnou doménu

pro onkogen RAS (16). Další nadějně látky pro eventuální záchrannou nebo primární léčbu představují například inhibitory produktů genů četně mutovaných u MDS, jako jsou IDH1/2 nebo EZH2.

Závěry tohoto sdělení tkví v několika novějších aspektech. Především je vhodná monitorace somatických změn u pacientů s ICUS/CHIP, což jsou nové klinické entity, jež je nutné vážně zvažovat v diferenciální diagnostice cytopenií. Dynamika sledování je kriticky důležitá proto, že na základě proměnlivosti somatických změn lze usuzovat o stupni klonální selekce. V neposlední řadě je prozatím nejasné, jak se somatické mutace ve vztahu ke stárnutí mohou projevovat ve vzniku hematologických malignit a eventuálně i solidních nádorových onemocnění, jejichž prevalence u starších lidí vzrůstá podobně jako u MDS.

prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

BIOCEV a 1. interní klinika – klinika hematologie VFN

a 1. LF UK, Praha

e-mail: tstopka@lf1.cuni.cz

#### Literatura

- Genovese G, et al., Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England Journal of medicine* 371, 2477 (Dec 25, 2014).
- Ley TJ, et al., DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456, 66 (Nov 6, 2008).
- Bejar R, Ebert BL. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematology/oncology clinics of North America* 24, 295 (Apr, 2010).
- Welch JS, et al., The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150, 264 (Jul 20, 2012).
- Will B, et al., Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood* 120, 2076 (Sep 06, 2012).
- Stoonsma DP, et al., Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*, (Apr 30, 2015).
- Penaux P, et al., Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 562 (Feb 1, 2010).
- Kantarjian H, et al., Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 109, 52 (Jan 1, 2007).
- Jabbour E, et al., Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy. *Cancer* 116, 3830 (Aug 15, 2010).
- Craddock C, et al., Azacitidine fails to eradicate leukemic stem/progenitor cell populations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia.

- Leukemia 27, 1028 (Apr, 2013).
11. Bejar R, et al., TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. Blood 124, 2705 (Oct 23, 2014).
  12. Jung SH, et al., Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. Oncotarget, (Jul 11, 2016).
  13. Tobiasson M, et al., Mutations in histone modulators are associated with prolonged survival during azacitidine therapy. Oncotarget 7, 22103 (Apr 19, 2016).
  14. Pellagatti A, et al., Targeted resequencing analysis of 31 genes commonly mutated in myeloid disorders in serial samples from myelodysplastic syndrome patients showing disease progression. Leukemia 30, 247 (Jan, 2016).
  15. Garcia-Manero G, et al., Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): a randomised, controlled, phase 3 trial. The Lancet Oncology 17, 496 (Apr, 2016).
  16. Athuluri-Divakar SK, et al., A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. Cell 165, 643 (Apr 21, 2016).



## První anonce

Pořadatel a organizátor:  
We Make Media, s. r. o. / tel.: +420 778 476 475  
e-mail: info@pragueonco.cz / www.PragueONCO.cz

## „9. pražské mezioborové onkologické kolokvium“

Lékaři a sestry společně proti zhoubným nádorům

World Interdisciplinary Oncology Colloquium

24.–26. 1. 2018

Clarion Congress Hotel Prague \*\*\*  
Freyova 33, Praha 9, Česká republika

### Předběžná téma pro devátý ročník kolokvia:

- úvodní blok
- Post ASCO GI 2018
- karcinom prsu
- onkogynekologie
- nádory gastrointestinálního traktu
- nádory genitourinárního traktu
- karcinom plic
- hematatoonkologie
- možnosti primární a sekundární prevence v onkologii

Jednací jazyky: čeština, angličtina. Pro zahraniční účastníky odborné lékařské sekce bude zajištěn simultánní překlad do angličtiny.