

Markeri genetici utili în diagnosticul, prognosticul și terapia personalizată a pacienților cu leucemie limfocitară cronică

Doctorand: **Kardos Beata Magdolna**

Conducător de doctorat: **Bănescu Claudia Violeta**

Introducere: Este din ce în ce mai evident că variabilitatea genetică intratumorală nu numai că facilitează evoluția clonală și progresia leucemică, dar oferă și bazele pentru dezvoltarea rezistenței terapeutice. Din acest motiv evaluarea acestor biomarkeri în momentul instituirii tratamentului este recomandată de majoritatea ghidurilor actuale pentru managementul leucemiei limfocitare cronică (LLC). Identificarea unor noi ținte terapeutice și dezvoltarea de terapii țintite pot contribui la îmbunătățirea calității vieții și a supraviețuirii pacienților cu LLC.

Obiectivele studiului au constat în investigarea extinsă a pacienților cu LLC din punct de vedere genetic, stratificarea riscului, și aprecierea prognosticului fiecărui pacient în funcție de modificarea genetică identificată.

Metodologie generală: Studiul a fost realizat în mai multe etape. În prima etapă s-a efectuat analiza CNV-urilor (variații a numărului de copii) prin tehnica MLPA, cu ajutorul unui kit care conține sonde specifice pentru regiunile cromozomiale frecvent implicate în patogeneza LLC, totodată conține trei sonde specifice pentru mutațiile *NOTCH1* c.7541-7542delCT, *SF3B1* c.2098A>G și *MYD88* c.794T>C. Investigarea genetică a continuat prin testarea statusului mutational al genei *IGHV*, și analiza polimorfismelor *IL-10* 10 (rs1800896 și rs1800872) și *TNF-α* (rs361525 și rs1800750). În studiu au fost incluse 239 de persoane sănătoase cu aceeași vârstă medie și distribuție pe sexe (reprezentând lotul control).

Studiul 1. Prin acest studiu am investigat asocierile posibile între CNV-uri și/sau mutații genice și caracteristicile biologice și clinice, precum și supraviețuirea pacienților cu LLC. Un alt scop al studiului a fost de a evalua eficacitatea tehnicii MLPA în investigarea genetică a pacienților cu LLC. Analiza a evidențiat modificări în 65% din pacienți. CNV-urile identificate, în ordinea descrescătoare a frecvenței, au fost: del(13q), del(11q), trisomia 12, del(7p), del(14q) și dup(10q). Totodată a fost identificat un pacient cu trisomie concomitentă a cromozomiilor 12,13 și 19. Mutațiile somatice (*NOTCH1* și *SF3B1*) au fost frecvent observate la pacienții cu vârsta peste 60 ani. Prezența mutației *SF3B1* sau a mai multor CNV-uri a fost asociată cu numărul crescut de leucocite. Mutația genei *NOTCH1* a fost asociată cu limfadenopatie în peste 78% din pacienți ($p<0,001$). Supraviețuirea cea mai lungă a fost observată la pacienții cu del(13q) izolată, urmată de del(13q) asociată cu alte CNV-uri, del(11q), mutația *SF3B1*, cei fără modificări genetice prezente, trisomia 12, del(14q), mutația *NOTCH1* și del(17p). Supraviețuirea a fost redusă și la pacienții care asociau mai multe CNV-uri, sau CNV-uri cu mutații somatice (în special *NOTCH1*).

Concluzii: Pacienții în vârstă sunt mai predispuși să dezvolte mutații somatice, ceea ce poate fi atribuit hematopoezei clonale legate de vârstă. Pacienții cu CNV-uri și/sau mutații somatice au un număr crescut de leucocite, ceea ce este considerat un factor prognostic nefavorabil. Mutațiile somatice (în special *NOTCH1*) și CNV-urile influențează apariția timpurie a manifestărilor clinice, prin urmare ar putea declanșa evoluția clinică a bolii.

Studiul 2. Hipermutația somatică (SHM – Somatic hypermutation) *IGHV* (regiunea variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei) este un proces biologic natural prin care rearanjamentele genelor *IGH* ale celulelor B suferă modificări genetice atunci când sunt expuse la antigene. Astfel, absența hipermutației este asociată cu un prognostic nefavorabil. Prin acest studiu ne-am propus încadrarea pacienților într-o grupă cu risc scăzut sau crescut de prognostic, în funcție de statusul mutațional al *IGHV*. Absența hipermutației a fost observată la 67,2% dintre pacienți, fiind mai frecventă la femei și asociind supraviețuire redusă. Absența hipermutației a fost asociată cu prezența CNV-urilor ($p=0,009$), iar această combinație a modificărilor genetice a fost asociată cu anemie, trombocitopenie și leucocitoză, dar a avut impact și asupra supraviețuirii, comparativ cu absența mutației izolat.

Concluzii: Absența hipermutației în gena *IGHV* are valoare prognostică și este asociată cu supraviețuire redusă. Supraviețuirea la pacienții fără hipermutația *IGHV* a fost redusă în cazul prezenței CNV-urilor și/sau a mutațiilor somatice asociate.

Studiul 3. Obiectivul studiului a fost investigarea efectelor polimorfismelor (SNP-uri) citokinelor la nivelul genelor *IL-10* (rs1800896 și rs1800872) și *TNF- α* (rs361525 și rs1800750). Nu au existat diferențe semnificative în distribuția genotipurilor între loturile analizate și anume pacienți cu LLC și lotul control. Genotipurile variante (inclusiv cele combinate cu două, trei sau patru genotipuri variante) nu au avut impact asupra caracteristicilor clinice sau a supraviețuirii pacienților. Niciunul dintre haplotipuri nu a fost asociat cu riscul de apariție a LLC. În cele din urmă, am analizat prezența concomitentă a tuturor factorilor de risc genetici, și am observat că niciunul dintre pacienți nu a prezentat rezultat negativ pentru toți factori de risc investigați; marea majoritate dintre ei (95,2%) chiar asociind mai mulți factori. Cea mai frecventă asociere a fost între *IGHV* fără mutație, alela variantă a *IL-10* rs1800896 și CNV-uri, o combinație identificată ca factor de risc combinat pentru LLC.

Concluzii: Prezența mutațiilor somatice și alela variantă a *IL-10* rs1800872, precum și asocierea CNV-urilor cu alela variantă *IL-10* rs1800896, au fost identificate ca factori de risc fiind asociați cu o supraviețuire globală redusă. *IL-10* rs1800896 a modulat supraviețuirea la pacienții fără hipermutația *IGHV* și cu CNV-uri asociate. Pe baza datelor existente, studiul nostru este primul care investighează rolul polimorfismelor *TNF- α* rs1800750 și rs361525 în LLC.

Studiul 4. Studiul descrie datele din literatura de specialitate privind tehnicile de editare a genomului în leucemii, pornind de la meganucleaze și până la descoperirea tehnicii CRISPR/Cas9. Sistemul CRISPR/Cas9 a fost folosit mai frecvent pentru leucemia acută mieloidă comparativ cu celelalte tipuri de leucemie. Au fost editate mutații în genele care codifică mediatorii semnalizării citokinelor, modificatorii epigenetici și factorii de transcripție, reproducând astfel combinațiile posibile de mutații observate la pacienți. Studii clinice care investighează siguranța și eficacitatea celulelor editate prin CRISPR în tratamentul malignităților hematologice recidivante sau refractare sunt în desfășurare.

Concluzii generale: Testarea genetică ocupă o poziție centrală în managementul multidisciplinar al LLC, oferind informații valoroase pentru prognosticul bolii și utile în ghidarea deciziilor terapeutice. Tehnici precum MLPA, testarea genei *IGHV* și investigarea SNP-urilor din genele citokinelor au furnizat o înțelegere mai profundă a complexității genetice a bolii și a implicațiilor sale pentru prognostic și tratament. Din aceste motive, testarea genetică extinsă a pacienților cu LLC este esențială, mai ales

dacă luăm în calcul că în majoritatea cazurilor există mai mulți factori de risc genetici prezenți, iar asocierea mai multor astfel de modificări ar putea avea un impact semnificativ asupra prognosticului.