

Zusammenfassung

Tamara Kempter

Dr. med.

Subclonal *TP53* variants define a subgroup of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients with an increased risk for relapse already at the time of initial diagnosis

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde/Hopp-Kindertumorzentrum (KITZ) Heidelberg

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. Andreas Kulozik

Die akute lymphatische T-Zell-Leukämie ist eine aggressive hämatologische Krankheit, die etwa 15% der pädiatrischen akuten lymphatischen Leukämien ausmacht und die häufigste bösartige Krebserkrankung bei Kindern ist. Ein Rezidiv ist die Haupttodesursache bei akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie, von dem 10-20% der Patienten betroffen sind. Prognostische molekulare Biomarker für eine zuverlässige Risikostratifizierung von Patienten mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind nicht verfügbar. Inaktivierende Mutationen in *TP53* wurden bereits mit tödlichen T-ALL-Rezidiven in Verbindung gebracht. Mutationen in acht weiteren Genen - *NT5C2*, *CCDC88A*, *MSH6*, *USP7*, *IL7R*, *CNOT3*, *KRAS*, *NRAS* - wurden zuvor als rezidiv-spezifisch definiert oder waren mit einer schlechten Prognose im Rezidiv assoziiert. In Anbetracht der klonalen Evolution als treibender Mechanismus des Rückfalls stellte ich die Hypothese auf, dass Subklone (Allelfrequenz <30%) mit Mutationen dieser 9 Gene ein Rezidiv verursachen und eine neue, molekular definierte Hochrisikogruppe zum Zeitpunkt der Erstdiagnose charakterisieren können.

Diese Studie konzentrierte sich daher auf die Analyse dieser 9 Ultra-Hochrisiko-Gene bei der Erstdiagnose der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie. Insgesamt 160 Proben von Patienten, die nach den BFM-Protokollen behandelt wurden, wurden einer gezielten Ultra-Tiefen-Sequenzierung unterzogen, bei der das Haloplex High Sensitivity Kit mit einzigartigen molekularen Identifikatoren zum zuverlässigen Nachweis von Mutationen mit sehr niedriger Allelfrequenz verwendet wurde (durchschnittliche Lesetiefe: 1,012). Einundachtzig dieser Proben stammten von Patienten, die später ein Rezidiv erlitten, während 79 Kontrollen, die hinsichtlich der Behandlungsgruppe, des minimalen Krankheitsrückstands nach der Induktion

(Tag 78), des Ansprechens auf Prednison, der Blastenzahl, des Alters und des Geschlechts übereinstimmten, mindestens drei Jahre lang in vollständiger Remission geblieben waren. Die Sequenzierungsdaten wurden mit der Agilent SureCall Software analysiert, deren SNP-PET Single Nucleotide Polymorphismus Caller die optimierte Erkennung von Mutationen mit niedriger Frequenz ermöglicht (Schwellenwert für die minimale Allelfrequenz: 0.1%).

Insgesamt wurden 75 Mutationen in 7 spezifischen Genen bei 33 / 81 rezidivierenden und 21 / 79 nicht rezidivierenden Patienten identifiziert. Die durchschnittliche Allelhäufigkeit der Varianten betrug 25% (0.8% - 83%; Standardabweichung \pm 18%). Mehr als die Hälfte der Mutationen (43 / 79) wurden mit Allelhäufigkeiten unter 30% gefunden und somit als subklonal eingestuft.

Insbesondere wurden 7 pathogene *TP53*-Mutationen, von denen 5 subklonal und zwei klonal waren (Allelhäufigkeiten: 4.4% - 49.4%), ausschließlich bei 6 Patienten entdeckt, die ein Rezidiv erlitten. Ein Patient trug gleichzeitig eine subklonale und eine klonale Variante von *TP53*. Drei der 6 Patienten wurden basierend auf deren Ansprechen auf die Therapie, das anhand des Prednison-Ansprechens und der PCR-MRD-Kinetik gemessen wurde, in die Hochrisikogruppe der Behandlungsprotokolle eingestuft. Während zwei dieser Patienten aufgrund des schlechten Ansprechens auf die Behandlung in der ersten Remission eine allogene Stammzelltransplantation erhielten, wurden der andere Hochrisikopatient und die übrigen drei Patienten, die in die mittlere Risikogruppe eingestuft worden waren, mit einer Chemotherapie behandelt und erhielten keine Allotransplantation. Keiner der 79 Kontrollpatienten ohne Rezidiv wies *TP53*-Mutationen auf (Chi²-Test, p: 0.014).

Um die Hypothese zu bestätigen, dass Klone, die eine *TP53*-Mutation tragen, während der Rezidiventwicklung selektiert werden, wurden verfügbare Proben der sechs *TP53*-positiven Patienten aus der Zeit nach der Remission durch Exom-Sequenzierung analysiert (Lesetiefe von *TP53*: 371 - 479 Reads). Die klonale Evolution von *TP53*-Mutationen bei T-ALL-Rezidiven wurde durch den Nachweis eines Hauptklons mit einer *TP53*-Mutation im Rezidiv (Allelfrequenz: 42 %) bestätigt, der aus einem Subklon bei der Erstdiagnose (Allelfrequenz: 5.4 %) bei einem Patienten hervorgegangen war. Die Identifizierung einer *TP53*-Mutation bei einem weiteren Patienten in der Postremission-Phase ist mit der klonalen Selektion als Rezidivmechanismus vereinbar und deutet darauf hin, dass diese Mutation resistent gegenüber der Therapie gewesen zu sein scheint. Überraschenderweise deutet die niedrige Allelfrequenz der *TP53*-Variante bei einem weiteren Patienten während des Rezidivs darauf hin, dass der *TP53*-Subklon persistiert, sich aber während der Entwicklung des Rezidivs nicht ausgebreitet

hat. Das Vorhandensein einer *USP7*-Mutation bei Erstdiagnose und im Rezidiv bei diesem Patienten deutet darauf hin, dass in diesem Fall mehrere Veränderungen im p53-Wegs an der Rezidiventwicklung beteiligt sein könnten. Ein weiterer Rezidivmechanismus, der mit subklonalen *TP53*-Varianten in Verbindung gebracht werden könnte, ist die Beeinträchtigung der zellulären Überwachung der DNA-Integrität durch subklonale inaktivierende *TP53*-Mutationen, was sowohl zu genomischer Instabilität als auch zu Resistenz gegenüber Apoptoseauslösern führt. Der Anteil der Leukämiezellen, die *TP53*-Mutationen tragen, widersteht somit der Wirkung einer genotoxischen Chemotherapie und kann sogar sekundäre genomische Veränderungen erwerben, die zur Entwicklung eines Rezidivs beitragen.

Zusätzlich zu *TP53* wurden pathogene *KRAS*-Mutationen entdeckt, die sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei Patienten mit Rezidiv (9 / 81) im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv (2 / 79) signifikant angehäuft zeigten (Chi²-Test, p: 0.032).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass subklonale und klonale Mutationen in *TP53* und *KRAS* zum Zeitpunkt der Erstdiagnose etwa 17 % der Patienten mit tödlichem Rezidiv identifizierten und somit eine Untergruppe von Patienten mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie mit extrem hohem Risiko bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose definieren. Diese neue, molekular charakterisierte Untergruppe von Hochrisikopatienten könnte von einer intensivierten Behandlung profitieren, bei der eine Immuntherapie wie bei der allogenen Stammzelltransplantation, CAR T-Zellen oder das p53-stabilisierende Prodrug APR-246 für Patienten mit *TP53*-mutierter akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie eingesetzt wird. Bevor neuartige Behandlungsstrategien für eine solche molekular charakterisierte Untergruppe der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie realisiert werden können, müssen Häufigkeit und Relevanz von (subklonalen) Mutationen in *TP53* und *KRAS* in einer zusätzlichen, nicht-selektierten Patientenpopulation der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie in Zukunft validiert werden.