

**ROZPRAWA DOKTORSKA
(STRESZCZENIE)**

**Znaczenie prognostyczne
wariantów polimorficznych genu *CRBN*
u chorych z opornym lub nawrotowym
szpiczakiem plazmocytowym
leczonych lenalidomidem.**

Elżbieta Iskierka-Jażdżewska

PROMOTOR: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Jamroziak

Klinika Hematologii

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Klinika Hematologii

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ŁÓDŹ 2019

STRESZCZENIE

Wstęp

Leki immunomodulujące (ang. immunomodulatory drugs; IMiDs) – talidomid, lenalidomid i pomalidomid są szeroko stosowane w terapii szpiczaka plazmocytozy (SzP). Jednym z najbardziej istotnych przełomów dotyczących poznania molekularnego mechanizmu działania tej grupy leków było odkrycie, że białko cereblon jest komórkowym celem dla IMiDs. Cereblon, produkt genu CRBN leżącego na chromosomie 3 (3p26.2), to białko o masie 51kDa zawierające 11 egzonów. Wraz z białkami DDB1 (ang. damaged DNA binding protein 1), CUL4 (Cullin4) i Roc1 (ang. RING finger protein) cereblon współtworzy kompleks ligazy ubikwitynowej E3 (CRL4CRBN), który pełni istotną rolę w regulowaniu funkcji komórki. Kompleks ligazy CRL4CRBN przyłącza ubikwitynę do wybranych białek komórki kierując je w ten sposób na drogę degradacji proteasomalnej. IMiDs poprzez związanie cereblonu, modyfikują funkcję kompleksu ligazy ubikwitynowej E3, co jest kluczowe dla antyproliferacyjnej, antyangiogennej i immunomodulującej roli tych leków. Jednym z niezwykle istotnych działań IMiDs po połączeniu z cereblonem jest promowanie ubikwytynacji dwóch czynników transkrypcyjnych – Ikaros (IKZF1) i Aiolos (IKZF3), kodowanych odpowiednio przez geny IKZF1 i IKZF3. Białka te są naturalnymi represorami wydzielania interleukiny 2. Nasilenie ich degradacji prowadzi do zwiększonej sekrecji interleukiny 2 powodującej aktywację limfocytów T. Ponadto, proces inaktywacji proteasomalnej IKZF1 i IKZF3 prowadzi do redukcji stężenia czynnika transkrypcyjnego IRF-4 i onkogenu c-Myc w komórkach nowotworowych SzP, co z kolei skutkuje zahamowaniem ich wzrostu oraz apoptozą.

Wyniki opublikowanych w ostatnich latach badań sugerują, że poziom ekspresji genu CRBN i obecność wariantów cereblonu w wyniku modyfikacji na etapie składania mRNA mogą wpływać na efektywność działania IMiDs w SzP. Jest zatem prawdopodobne, że indywidualne podłoże genetyczne chorego, w tym zjawisko polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w obrębie genu CRBN, może częściowo determinować skuteczność terapii IMiDs poprzez wpływ na ekspresję genu CRBN lub strukturę i specyficzność substratową białka cereblon.

Cel pracy

Celem pracy było ustalenie, czy naturalnie występujące jednonukleotydowe warianty polimorficzne (ang. single nucleotide polymorphisms, SNPs) genu CRBN mogą wpływać na efektywność leczenia lenalidomidem u pacjentów z opornym lub nawrotowym SzP

Materiały i metody

Badaną populację stanowiła grupa 167 dorosłych pacjentów z rozpoznaniem w latach 1997-2013 SzP, leczonych z powodu oporności lub nawrotu choroby schematami terapeutycznymi zawierającymi lenalidomid w 13 polskich ośrodkach hematologicznych. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wymogami określonymi w Deklaracji Helsińskiej. Protokół badania oraz formularz świadomej zgody pacjenta zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (No RNN/354/1/KE).

W badaniu przeprowadzono genotypowanie wyselekcjonowanej grupy SNPs znakujących haplotypy (ang. tagging SNPs, tSNPs) genu CRBN i przylegających potencjalnych obszarów regulatorowych. Haplotyp reprezentowany przez tSNP obejmuje fragment genu definiowany przez grupę SNPs pozostających we wzajemnym wysokim niezrównoważeniu sprzężeń (linkage disequilibrium, LD). W ten sposób genotypowanie tSNPs pokrywających cały badany region chromosomalny umożliwia ocenę wpływu zmienności genetycznej na określone parametry fenotypowe (tutaj wrażliwość na IMiDs) bez konieczności genotypowania każdego SNP w badanym regionie. Wyboru tSNPs dokonano w oparciu o lokalizację w interesującym regionie (gen CRBN wraz w fragmentami 5kb powyżej promotora i fragmentem obejmującym 5kb za ostatnim egzonem genu) i częstość rzadziej występującego allela (ang. Minor Allele Frequency; MAF) co najmniej 5% u rasy kaukaskiej. Na podstawie literatury wiadomo, że SNP o niższej MAF nie są w wystarczający sposób uchwycone przy pomocy tSNPs. Dane na temat genotypów zostały pobrane ze strony internetowej projektu HapMap International (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/). Wybór odpowiednich tSNPs został przeprowadzony przy użyciu algorytmu Tagger dostępnego poprzez aplikację Haploview (www.broad.mit.edu/mpg/haploview/). Próg współczynnika determinacji r^2 ustalono na poziomie ≥ 0.8 . W wyniku tego procesu wybrano 11 SNPs dla genu CRBN i 3 dla sąsiedniego genu TRNT1, który jest mapowany bezpośrednio za genem CRBN i częściowo ich regiony się pokrywają.

Genotypowanie przeprowadzono stosując ilościową reakcję łańcuchową polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (ang. quantitative polymerase chain reaction; qPCR) w oparciu o technologię TaqMan (ABI, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), zgodnie z protokołem określonym przez producenta. Ocenę fluorescencji wykonano przy użyciu aparatu do ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym ABI PRISM 7900HT Fast Real - Time PCR (Applied Biosystems). Do określenia genotypów użyto oprogramowania SDS Software, wersja 2.4 (Applied Biosystems). W końcowej analizie danych średni odsetek uzyskanych pozytywnych wyników u pacjenta (ang. average call rates by subjects) oraz wskaźnik uzyskanych wyników przypadających na poszczególne tSNPs (ang. average call rates by SNPs) wynosił ponad 95%. Zgodność duplikatów (10% próbek) wynosiła ponad 99%.

Pierwszorzędowe punkty końcowe analizy obejmowały odpowiedź kliniczną na leczenie (oceniane wg kryteriów International Myeloma Working Group), czas wolny od progresji (ang. progression free survival; PFS) i czas całkowitego przeżycia (ang. overall survival; OS). Uzyskanie odpowiedzi klinicznej na leczenie schematami terapeutycznymi z lenalidomidem zdefiniowano jako osiągnięcie co najmniej częściowej remisji (ang. partial remission; PR). Wpływ wybranych czynników klinicznych i laboratoryjnych oraz wyników genotypowania genu CRBN na prawdopodobieństwo odpowiedzi klinicznej badano stosując modele jednoczynnikowej i wieloczynnikowej regresji logistycznej. Wpływ badanych parametrów na zmienne zależne od czasu (PFS i OS) oceniono w oparciu o model proporcjonalnego ryzyka Coxa. Wyniki genotypowania analizowano z założeniem addytywnego, kodominującego, dominującego i recesywnego modelu dziedziczenia genów. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu R (<https://www.r-project.org/>). W celu oceny znaczenia funkcjonalnego SNPs, które w analizie statystycznej wykazały istotny związek z rokowaniem w badanej grupie pacjentów wykorzystano odpowiednie narzędzia bioinformatyczne (RegulomeDB, HaploReg i GTEx).

Wyniki

Genotypowanie przeprowadzono w grupie 167 pacjentów z 13 polskich ośrodków hematologicznych z rozpoznaniem opornym/nawrotowym SzP leczonych schematami terapeutycznymi z lenalidomidem. Wśród schematów terapeutycznych z lenalidomidem zastosowanych u pacjentów włączonych do badania najczęstsze było połączenie lenalidomidu z deksametazonem (133 chorych, 79,6%). U 26 chorych (15,6%) wdrożono terapię

trójlekową, dodając do lenalidomidu i deksametazonu – cyklofosfamid (3 pacjentów; 1,8%), bortezomib (9 chorych; 5,4%), karfilzomib (7 pacjentów; 4,2%) lub elotuzumab (7 pacjentów; 4,2%). Monoterapia lenalidomidem była zastosowana u 8 pacjentów (4,8%).

Na potrzeby analizy wyników genotypowania sprawdzono, że dla wszystkich 14 testowanych tSNPs uzyskano częstości genotypów zgodne z prawem Hardy'ego – Weinberga ($p > 0.001$). Obserwowane częstości alleli dla wszystkich analizowanych w badaniu tSNPs były zgodne z danymi uzyskanymi z projektu HapMap International. W analizie z zastosowaniem modelu regresji logistycznej wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy rzadszymi allelami dwóch tSNPs (TRNT1 rs1714327 G>C i CRBN rs1705814 T>C) a mniejszym prawdopodobieństwem osiągnięcia odpowiedzi klinicznej (co najmniej PR) na leczenie lenalidomidem w dominującym modelu dziedziczenia. (odpowiednio OR=0.25, 95%CI 0.10-0.63; $p=0.0033$, korekcja Bonferroniego $p=0.019$ dla C/C i G/C vs. G/G i OR=0.21, 95%CI 0.07-0.61; $p=0.0041$, korekcja Bonferroniego $p=0.024$ dla C/C i T/C vs. T/T). Ponadto, stwierdzono, że jeden z dwóch tSNPs wykazujących wpływ na odpowiedź kliniczną (CRBN rs1705814 T>C), był także istotnie związany z krótszym PFS przy założeniu dominującego modelu dziedziczenia (OR=2.49; 95%CI 1.31-4.74; $p=0.0054$, korekcja Bonferroniego $p=0.032$ dla CC i T/C vs. T/T). Żaden z badanych wariantów allelicznych nie miał istotnego wpływu na długość OS.

W badanej grupie pacjentów nie zaobserwowano także istotnego wpływu analizowanych czynników klinicznych i laboratoryjnych na odpowiedź kliniczną na terapię opartą na lenalidomidzie, jak również na długość PFS i OS.

Analizę bioinformatyczną pod kątem potencjalnego znaczenia funkcjonalnego przeprowadzono dla dwóch SNPs (rs1714327 G>C genu TRNT1 i rs1705814 T> C genu CRBN), które wykazały powiązanie z rokowaniem SzP w badanej grupie chorych. W bazie danych RegulomeDB dla SNPs rs1714327 genu TRNT1 uzyskano wynik 6, co wskazuje na brak dowodów na wiązanie czynników transkrypcyjnych w miejscu polimorficznym. Dane dla drugiego SNPs rs1705814 nie były dostępne, co oznacza, że dotychczas zebrane informacje nie wykazały funkcjonalnej roli tego SNP. Analiza z wykorzystaniem bazy danych GTEx wykazała znaczące powiązanie z poziomem ekspresji CRBN dla obu tSNPs, ale w tkankach prawdopodobnie nieistotnych w patogenezie SzP (najsilniejsze skojarzenie zaobserwowano w jądrach, mięśniach szkieletowych i przelyku). Z kolei analiza za pomocą aplikacji HaploReg wskazała na możliwe powiązania obu SNPs z metylacją histonów w różnych typach komórek związanych z krwią, w tym limfocytach T i B oraz macierzystych komórkach krwiotwórczych. Ponadto, za pomocą programu HaploReg wykryto powiązania

eQTL obu SNPs z poziomem ekspresji CRBN w limfoblastoidalnych liniach komórkowych z zestawu danych GEUVADIS, z najsilniejszym związkiem obserwowanym dla rs1714327 genu TRNT1 ($p = 9,52 \times 10^{-10}$).

Wnioski:

1. Zmienność genetyczna w obrębie genu CRBN i jego regionów regulatorowych reprezentowana przez tSNP rs1714327 G>C genu TRNT1 i tSNP rs1705814 T>C genu CRBN wpływa na prawdopodobieństwo uzyskania i czas trwania odpowiedzi klinicznej na leczenie oparte na lenalidomidzie u chorych na nawrotowego/opornego szpiczaka plazmocytowego
2. Mechanizm obserwowanej zależności pomiędzy dwoma analizowanymi SNPs (TRNT1 rs1714327G>C and CRBN rs1705814T>C) a wynikami leczenia lenalidomidem jest niejasny, jednakże może częściowo wynikać z wpływu obu SNPs na poziom ekspresji genu CRBN w komórkach hematopoetycznych za pośrednictwem modyfikacji epigenetycznych w postaci metylacji białek histonowych.
3. Analizowane czynniki demograficzne (wiek, płeć) i kliniczne (stan wydolności nerek, stadium zaawansowania szpiczaka plazmocytowego), nie wpływają istotnie na skuteczność leczenia schematami terapeutycznymi z lenalidomidem u pacjentów z opornym/nawrotowym szpiczakiem plazmocytowym.

SUMMARY

Introduction

The class of immunomodulatory drugs (IMiDs), including thalidomide, lenalidomide and pomalidomide, is one of the main parts of antimyeloma therapy. The cornerstone of the knowledge about the IMiDs' mechanism of action was the discovery of the cereblon as a cellular target for this group of drugs. Cereblon (CRBN), encoded by the CRBN gene located on chromosome 3p26.2, is a 51 kDa protein and contains 11 exons. This protein, together with damaged DNA binding protein 1 (DDB1), Cullin-4 (CUL4) and RING finger protein (Roc1), forms an E3 ubiquitin ligase complex (CRL4CRBN), which is involved in cell cycle regulation. The CRL4CRBN ligase complex attaches ubiquitin to selected cell proteins, thus directing the proteasomal degradation pathway. IMiDs, while binding to the CRBN, modulate the function of the E3 ubiquitin ligases complex, which is crucial for antiproliferative, antiangiogenic and immunomodulatory properties of these drugs. One of the most important activities of IMiDs is their capability to induce CRBN-dependent ubiquitination and degradation of two transcription factors, Ikaros (IKZF1) and Aiolos (IKZF3), which are encoded by genes IKZF1 and IKZF3, respectively. These proteins are natural repressors of interleukin 2 (IL-2) secretion. Proteasomal degradation of IKZF1 and IKZF3 leads to increased secretion of IL-2, causing activation of T lymphocytes. Moreover, the proteasomal inactivation of Ikaros and Aiolos decreases levels of transcription factor IRF4 and oncogene c-Myc in MM cells, resulting in inhibition of their growth and apoptosis.

Several recent reports suggested that baseline of CRBN gene expression and the presence of alternatively spliced variants of CRBN affect sensitivity to IMiDs in MM. It can be speculated that inherited background including functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) may partially determine baseline CRBN expression level, splicing variants or substrate specificity, and thus influence sensitivity to therapy with IMiDs.

The objective of this study was to verify whether naturally occurring single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CRBN gene may influence the response to lenalidomide-based therapy and survival outcomes in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (MM).

Material and methods

The inclusion criteria contained 167 adult patients with diagnosis of relapsed or refractory MM from 1997-2013 treated with lenalidomide-based therapy in 13 Polish tertiary hematological centers. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol of the study and informed consent were approved by the Ethics Committee at the Medical University of Lodz (No RNN/354/1/KE).

In the study, the genotyping of selected tagging SNPs of the CRBN gene and nearby potential regulatory regions was performed. Tagging SNPs are representative SNPs in a region of the genome with high linkage disequilibrium (LD) that represent a group of SNPs called a haplotype. It is possible to identify genetic variation and association to phenotypes (IMiDs sensitivity in this study) without genotyping every SNP in a chromosomal region. In this study, the entire set of common genetic variants (including 5 kb upstream of the first exon and 5 kb downstream of the last exon of a gene), with minor allele frequency (MAF) $\geq 5\%$ in Caucasians, was included for CRBN. Based on literature it is known that SNPs with MAF of less than 5% are poorly captured by tSNPs. The genotyping data were downloaded from the website of the HapMap International Project (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/). Tagged SNPs were selected with use of the Tagger algorithm available through Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>), using pairwise SNP selection with a minimum r^2 threshold of 0.8. This process resulted in a selection of 11 tagging SNPs for CRBN and 3 for TRNT1 (rs334763, rs3931974 and rs1714327), a nearby gene of CRBN that maps just downstream of CRBN and partly overlaps it.

Genotyping was carried out using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) based on TaqMan technology (ABI, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The measurement of fluorescence was performed using a qPCR device ABI PRISM 7900HT Fast Real - Time PCR (Applied Biosystems). The SDS Software, version 2.4 (Applied Biosystems) was used to determine the genotypes. The average subjects and SNP call rates were $> 95\%$. Approximately 10% of the samples were analyzed in duplicate and the concordance rate of their genotypes was $> 99\%$.

The primary end points included clinical response to therapy (assessed according to International Myeloma Working Group criteria), overall survival (OS) and progression free survival (PFS). The clinical response to lenalidomide-based therapy was defined as achievement of at least partial remission (PR). Univariate and multivariate logistic regression

analyses were performed to assess the influence of selected clinical and laboratory factors and the results of CRBN gene's genotyping on the probability of achievement of at least partial remission. Cox proportional-hazards model was used for the time-dependent variables (PFS and OS). The results of genotyping were analyzed on the assumption of additive, co-dominant, dominant and recessive models of genes' action. All the analyses were performed using R software environment for statistical computing (<https://www.r-project.org/>). Bioinformatic tools including RegulomeDB, HaploReg and GTEx were used to assess possible functional relevance for the SNPs showing significant associations.

Results

One hundred sixty-seven relapsed/refractory MM patients treated with lenalidomide-based regimens in 13 Polish hematological centers were included in the study. The majority of patients (133, 85.6%) received the lenalidomide in combination with dexamethasone, while 26 patients (15.6%) were treated with triplets, including cyclophosphamide (3 patients; 1,8%), bortezomib (9 patients; 5,4%), carfilzomib (7 patients; 4,2%) or elotuzumab (7 patients; 4,2%) as a third drug. Eight patients (4.8%) were treated with lenalidomide in monotherapy.

All 14 tested SNPs showed genotype frequencies consistent with the HWE ($P > 0.001$) and the observed allele frequency for all selected SNPs was in accordance with HapMap data. The carriers of minor alleles of two studied SNPs, namely TRNT1 rs1714327G>C and CRBN rs1705814T>C, were significantly associated with lower probability of achievement of at least partial remission (\geq PR) to lenalidomide-based therapy using dominant inheritance pattern (OR=0.25, 95%CI 0.10-0.63; $p=0.0033$, Bonferroni corrected $p=0.019$ for C/C and G/C vs. G/G and OR=0.21, 95%CI 0.07-0.61; $p=0.0041$, Bonferroni corrected $p=0.024$ for C/C and T/C vs. T/T, respectively).

In accordance with these findings one of these two SNPs, namely CRBN rs1705814T>C, was also significantly associated with a shorter PFS in the analyzed group of lenalidomide-treated MM patients in the dominant inheritance pattern (HR=2.49; 95%CI 1.31-4.74; $P=0.0054$, Bonferroni corrected $p=0.032$ for CC and T/C vs T/T). None of the tested allelic variants of CRBN or TRNT1 showed any significant impact on OS. There was no significant influence of the preselected clinical and laboratory factors on the response to the treatment and survival outcomes.

Concerning bioinformatic analysis of TRNT1 rs1714327G>C and CRBN rs1705814T>C, RegulomeDB showed the score of 6 for SNP rs1714327, indicating minimal evidence for binding transcription factors, while no data were available for SNP rs1705814.

GTE_x presented significant associations between both SNPs and the expression level of CRBN, of note, in tissues not relevant to MM (with the strongest association in testes, skeletal muscles and esophagus). HaploReg showed possible link between both SNPs and regulatory chromatin states (histone methylation) in various blood cells including T cells, B cells and hematopoietic stem cells. In addition, HaploReg reported eQTL associations between both SNPs and CRBN expression levels in lymphoblastoid cell lines from the GEUVADIS dataset with the strongest relation observed for rs1714327 ($p=9.52 \times 10^{-10}$).

Conclusion

1. The genetic variation in the CRBN gene and its regulatory regions represented by two analyzed SNPs, namely CRBN rs1705814T>C and TRNT1 rs1714327G>C have an impact on probability of achievement of clinical response to lenalidomide-based therapy and response duration in patients with relapsed/refractory MM treated with lenalidomide.
2. The mechanism of observed correlation between two analyzed SNPs (TRNT1 rs1714327G>C and CRBN rs1705814T>C) and efficacy of the therapy with lenalidomide is unclear. However, it is possibly partly dependent on the modification of the CRBN gene expression in hematopoietic cells mediated by epigenetic modifications (namely on histone methylation).
3. The analyzed demographic (age at diagnosis, gender) and clinical factors (Salmon and Durie stage, serum creatinine level, dosage of lenalidomide, the use of combination therapy) did not have any significant influence on response to the treatment and survival outcomes in patients with relapsed/refractory MM treated with lenalidomide.