

Uniparental disomy found in tumor DNA of *de novo* diagnosed ALL patients as a factor predicting poor outcome

Natalya V. Risinskaya, Olga A. Gavrilina, Julia A. Chabaeva, Anna A. Yushkova, Andrey B. Sudarikov, Sergei M. Kulikov, Elena N. Parovichnikova, Valery G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Contact: Dr. Natalya V. Risinskaya

E-mail: risinska@gmail.com

Introduction

Uniparental disomy (UPD) or copy neutral Loss of Heterozygosity (cnLOH) was described for many malignancies including acute lymphoblastic leukemia (ALL). UPD leads to homozygous form of the chromosomes or their regions including those probably containing tumor-associated mutations. Unfortunately, standard cytogenetic analysis does not detect UPD. However, a sign of uniparental disomy is the loss of heterozygosity for genetic markers in combination with normal copy number of chromosome. Our objective was to identify UPD in blast cells of patients with *de novo* ALL using cytogenetic analysis with STR profiling and to analyze the outcome of therapy for this group of patients relative to patients without LOH. If UPD for patients with *de novo* ALL proves to be an unfavorable prognosis factor, those patients should be considered as high-risk group and first-line candidates for bone marrow transplantation.

Patients and methods

This study included a comparative analysis of the STR DNA profiles of the tumor and normal cells from bone marrow samples in a cohort of 32 patients with *de novo* diagnosed Ph-negative ALL undergoing treatment according to the "RALL-2016" regimen at the National Research Center for Hematology (Moscow, Russia). Inclusion criteria were as follows: *de novo* diagnosed Ph-negative acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients, 18-55 years old, intermediate risk group without MLL translocation t(4;11)(q21;q23), treatment by RALL-2016 protocol. Exclusion criteria: other diagnosis, adult patients older than 55 years, MLL translo-

cation t(4;11)(q21;q23), pretreatment or treatment by other protocol. The presence of blast cells in bone marrow samples was confirmed morphologically. The tumor karyotype was established by standard cytogenetic analysis. Control DNA samples were taken from blood of patients in complete remission and/or from buccal epithelium. STR-profiles were assessed by PCR with COrDIS Plus multiplex kit for amplification of 19 polymorphic STR markers and amelogenin loci (Gordiz Ltd, Russia). The fragment analysis was performed on ABI3130 Genetic Analyzer. The data processing was accomplished using GeneMapper v.4-0 software. SAS V9/4 was used for statistical analysis of the data. A multivariate survival analysis was used to assess independent impact of the UPD as a risk factor for this cohort of patients. We have chosen Failure Free Survival (FFS) as primary endpoint. Death from any reasons, relapse and second leukemia were chosen as failure events, survival time interval starts from begin of treatment.

Results

Of the 32 patients, six were found with LOH in the certain STR loci (19%). Of these six, two were resistant to therapy and died from disease progression. One patient with LOH is currently in relapse, and one patient with multiple LOH has developed secondary leukemia (Fig. 1a). Only two from six patients are "Failure-Free" now, whereas only three patients from 26 died in group without LOH (two from infectious complications and one from GvHD after BMT). P value <0.05 (Fig. 1b).

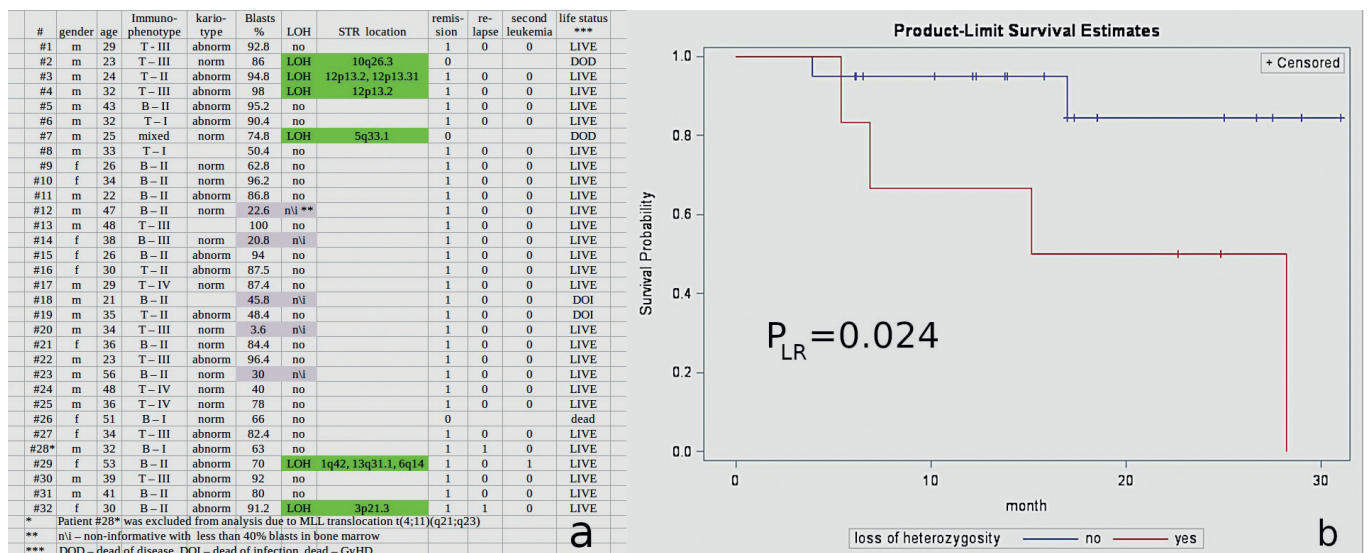


Figure 1. Patient's summary (A) and failure-free survival (FFS) estimates (B)

Conclusions

We have found statistically significant association of clinical failures with the LOH in STR loci measured at the onset of ALL. For all six patients from the “risk group”, LOH in some STR markers was not associated with deletions or monosomy detected by standard cytogenetic analysis. For one patient, UPD was verified by chromosomal microarray (CMA) technique, as shown in Fig. 2. We assume that UPD is an unfavorable prognostic factor for *de novo* diagnosed

ALL patients and could be used for risk stratification and choice of adequate therapy implying allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, or modern innovative therapy approaches.

Keywords

Acute lymphoblastic leukemia (ALL), uniparental disomy (UPD), loss of heterozygosity (LOH).

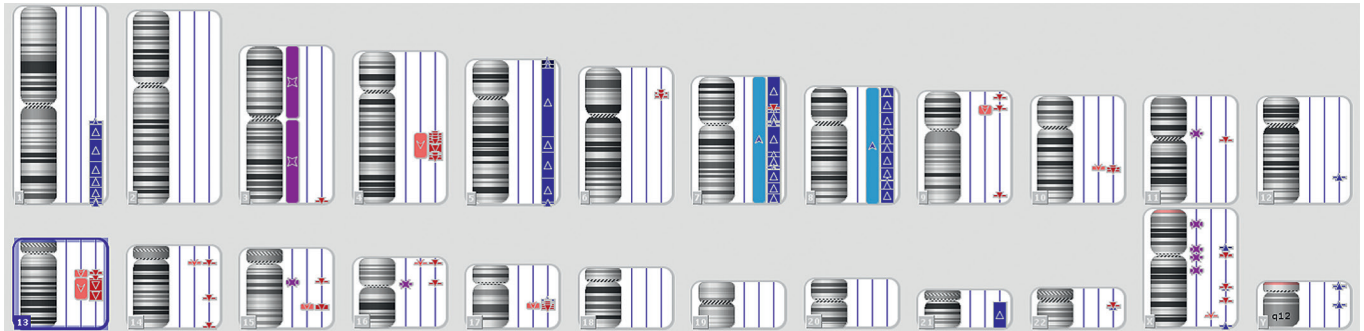


Figure 2. Patient #32 karyotype by CMA. Uniparental disomy of chromosome 3 (pink bar) explains the loss of heterozygosity in the 3p21.3 STR-locus, and deletions or duplications in some chromosomes

Losses (red bars) and gains (blue bars) in a number of chromosomes coincide with the data of cytogenetic analysis. (51,XX,del(1)(p31),+1,del(4)(q28),+5,+8,der(9),del(13)(q14q22),+13,der(15),del(17)(q23),+21[15]/46,XX[15]).

Однородительская дисомия в геноме опухолевых клеток как фактор неблагоприятного прогноза при остром лимфобластном лейкозе

Наталья В. Рисинская, Ольга А. Гаврилина, Юлия А. Чабаева, Анна А. Юшкова, Андрей Б. Судариков, Сергей М. Куликов, Елена Н. Паровичникова, Валерий Г. Савченко

Национальный медицинский исследовательский центр гематологии МЗ РФ, Москва, Россия

Введение

Явление однородительской дисомии (ОРД), или потери гетерозиготности без изменения копийности ДНК, описано для ряда опухолей, в том числе и для острых лимфобластных лейкозов. При ОРД хромосомы или их участки (которые могут содержать мутации в генах, ассоциированных с опухолевой трансформацией) оказываются в гомозиготной форме. К сожалению, стандартный цитогенетический анализ не выявляет ОРД. Однако, признаком ОРД является потеря гетерозиготности по генетическим маркерам в сочетании с нормальной копийностью хромосомы. Целью работы было сопоставление данных цитогенетического анализа и потери гетерозиготности в STR-локусах, выявление ОРД в бластных клетках пациентов с ОЛЛ в начале заболевания и анализ исходов терапии для этой группы пациентов относительно пациентов без потери гетерозиготности. Если ОРД для пациентов с *de novo* ОЛЛ окажется неблагоприятным фактором прогноза, эти пациенты, возможно, должны рассматриваться как группа высокого риска и кандидаты первой очереди на трансплантацию костного мозга.

Пациенты и методы

Данное исследование включает сравнительный анализ STR-профилей ДНК опухоли и нормальных клеток из образцов костного мозга от 32 пациентов с диагнозом

de novo ОЛЛ, проходящих лечение по схеме «ОЛЛ-2016» в Национальном исследовательском центре гематологии (Москва, Россия). Критерии включения: *de novo* диагностированный Ph-отрицательный острый лимфобластный лейкоз, 18-55 лет, группа среднего риска без транслокации MLL t(4;11)(q21;q23). Критерии исключения: другой диагноз, взрослые пациенты старше 55 лет, транслокация MLL t(4;11)(q21;q23), лечение по другому протоколу. Наличие бластных клеток в образцах костного мозга подтверждено морфологически, кариотип опухоли установлен стандартным цитогенетическим анализом. Образцы контрольной ДНК были взяты из крови пациентов с полной ремиссией и/или из буккального эпителия. STR-профили изучали посредством ПЦР с мультиплексным набором COrDIS Plus для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и маркера амелогенина (Gordiz Ltd, Россия). Разделение фрагментов проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 с последующим анализом программным обеспечением GeneMapper v.4.0. Пакет SAS V9 /4 был использован для статистического анализа данных. Анализ бессобытийной выживаемости был использован для оценки потери гетерозиготности как фактора риска. Смерть от любых причин, рецидив и второй лейкоз были выбраны в качестве событий неудачи, интервал времени выживания отсчитывался от начала лечения.

Результаты

У шести из 32 пациентов была обнаружена потеря гетерозиготности в определенных локусах STR (19%). Из этих шести двое были устойчивы к терапии и умерли от прогрессии заболевания. Один пациент с потерей гетерозиготности в настоящее время находится в рецидиве, и один пациент с множественной потерей гетерозиготности имеет второй лейкоз (Рис. 1а). Только двое из шести пациентов в настоящее время находятся в ремиссии. В группе контроля погибли только трое из 26 (двое от инфекционных осложнений и один от РТПХ после ТКМ).

Выводы

Мы обнаружили статистически значимую ассоциацию клинических неудач с потерей гетерозиготности в геноме бластных клеток (Рис. 1б). Для всех шестерых

пациентов группы риска была найдена потеря гетерозиготности в STR-маркерах, не связанная с делециями или моносомией, выявленными стандартным цитогенетическим анализом (для одной пациентки однородительская дисомия была подтверждена хромосомным микроматричным анализом – см. Рис. 2). Возможно, однородительская дисомия является неблагоприятным прогностическим фактором для всех пациентов с ОЛЛ и может быть использована как фактор стратификации риска и выбора адекватной терапии, предполагающей трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, или применение современных инновационных методов терапии.

Ключевые слова

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), однородительская дисомия, потеря гетерозиготности.

Invasive fungal diseases before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adults with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma

Yuliya A. Rogacheva¹, Marina O. Popova¹, Alisa G. Volkova¹, Inna V. Markova¹, Alexander N. Shvetsov¹, Iliya Y. Nikolaev¹, Oleg V. Goloshchapov¹, Svetlana M. Ignatieva², Tatiana S. Bogomolova², Andrey V. Kozlov¹, Kirill V. Lepik¹, Yury R. Zalyalov¹, Lilia V. Stelmakh¹, Asmik G. Gevorgian¹, Anastasya V. Beynarovich¹, Eugeniya S. Borzenkova¹, Elena I. Darskaya¹, Elena V. Kondakova¹, Natalya B. Mikhailova¹, Mariya D. Vladovskaya¹, Sergey N. Bondarenko¹, Ivan S. Moiseev¹, Ludmila S. Zubarovskaya¹, Nikolay N. Klimko^{1,2}, Boris V. Afanasyev¹

¹ Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

² I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Marina O. Popova

E-mail: marina.popova.spb@gmail.com

Introduction

There is only limited number of publications concerning invasive fungal disease (IFD) in lymphoma patients, especially, after allo-HSCT. There are no data about outcomes of allo-HSCT in lymphoma patients with prior IFD. This study focuses on epidemiology of IFD detected before and after allo-HSCT in children and adults with Hodgkin's lymphoma (HL).

Patients and methods

A single-center prospective observational study included 86 patients (pts) with classical relapsed/refractory (r/r) HL who received allo-HSCT from 2002 to 2018. The median age was 27 (13-49) y.o., children (<18 yo), 13% (n=11). Allo-HSCT from matched unrelated donors (MUD) was performed in 45.4% (n=39); matched related donors (MRD), in 24.4% (n=21); nonmatched MUD, 15.1% (n=13); haplo, 15.1% (n=13), with reduced-intensity conditioning (RIC) (100%), and predominantly PTCY-based GvHD prophylaxis (71%). Primary antifungal prophylaxis was performed with fluconazole (85%); voriconazole was used as secondary prophylaxis (100%). EORTC/MSG 2008 criteria for diagnosis and response to therapy were used. In the pts with lung lesions at CT-scans before allo-HSCT, bronchoscopy with BAL exami-

nation was used. "Active IFD" means IFD diagnosed just before HSCT. Median follow-up time was 12 (1 to 71) months.

Results

Incidence of IFD before allo-HSCT was 12.8% (n=11). Invasive aspergillosis (IA) was found in all cases of IFD prior to HSCT, with lung affection in most cases. Antifungal therapy before allo-HSCT was applied in 81.8% pts with median duration of 2 months. Complete response to antifungal therapy was registered in 45.4% pts, partial response or stabilization, in 36.4%, and 18.2% pts had "active IFD". Following allo-HSCT, all the pts received voriconazole as antifungal therapy, or secondary prophylaxis. Cumulative incidence of relapse or progression of IA after allo-HSCT was 18.2%, with a median of 49 days [19-79] after HSCT that were successfully treated with voriconazole during the post-HSCT period. Incidence of IFD after allo-HSCT for naïve patients was 17.6% (n=13/74). Etiology of IFD after allo-HSCT was as follows: IA, in 69% of patients; invasive candidiasis (IC), in 15%; mucormycosis, in 8%, and combined IFD caused by *Aspergillus fumigatus* + *Rhizopus stolonifer* was diagnosed in 8%. The median day of IFD onset after allo-HSCT was day+114 [1-489]. The main site of infection were lungs (88%), with febrile fever being the main clinical symptom (100%).