

**Szerzett és örökletes genetikai tényezők
kölsönhatásainak vizsgálata
BCR-ABL1 negatív myeloproliferatív
neopláziákban**

Doktori értekezés

Krähling Tünde

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Andrikovics Hajnalka, Ph.D., laborvezető

Hivatalos bírálók: Dr. Modok Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Timár Botond, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Kovalszky Ilona, DSc.,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Apáti Ágota, Ph.D., tudományos
főmunkatárs
Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1 Bevezetés.....	7
1.1 Philadelphia-kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák	7
1.1.1 Esszenciális thrombocythaemia.....	7
1.1.2 Polycythaemia vera.....	9
1.1.3 Primer myelofibrosis	11
1.2 Philadelphia-kromoszóma pozitív myeloproliferatív neopláziák	13
1.2.1 Krónikus myeloid leukémia	13
1.3 Akut myeloid leukémia.....	15
1.4 Genetikai eltérések <i>BCR-ABL1</i> negatív myeloproliferatív neopláziákban.....	16
1.4.1 Szerzett genetikai eltérések	16
1.4.2 Örökletes genetikai eltérések.....	25
2 Célkitűzések	27
3 Módszerek	28
3.1 Vizsgált egyének.....	28
3.1.1 <i>BCR-ABL1</i> negatív MPN.....	28
3.1.2 CML és AML	29
3.1.3 Kontroll csoport.....	30
3.1.4 Etikai megfontolások.....	30
3.2 Nukleinsav izolálás	30
3.3 Citogenetikai vizsgálatok.....	30
3.4 A <i>JAK2</i> V617F mutáció kimutatása	31
3.4.1 Minőségi meghatározás	31
3.4.2 Mennyiségi meghatározás	31
3.5 A <i>JAK2</i> 12. exon mutációk kimutatása.....	32
3.6 A <i>CALR</i> 9. exon mutációk kimutatása.....	33
3.7 Az <i>MPL</i> 10. exon mutációk kimutatása.....	33
3.8 SNP vizsgálatok.....	35
3.8.1 A <i>JAK2</i> rs12343867_C polimorfizmus vizsgálata	35
3.8.2 A <i>TERT</i> rs2736100_C polimorfizmus vizsgálata.....	35
3.9 Statisztikai feldolgozás	36
4 Eredmények.....	37
4.1 A laboratóriumi módszerek beállítása	37
4.1.1 A <i>JAK2</i> V617F mutáció mennyiségi meghatározása	37
4.1.2 A <i>JAK2</i> gén 12. exonjában található mutációk kimutatása	38
4.1.3 A <i>CALR</i> gén 9. exonjában található mutációk kimutatása	40
4.1.4 Az <i>MPL</i> gén 10. exonjában található mutációk kimutatása	41
4.1.5 SNP vizsgálatok.....	44

4.2	Onkogén mutációk klasszikus MPN-ben.....	45
4.2.1	Molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus.....	45
4.2.2	A klinikai jellemzők összehasonlítása alcsoportonként	47
4.2.3	Összesített túlélés az ET és a PMF betegcsoportokban.....	51
4.2.4	A <i>JAK2</i> és <i>CALR</i> mutáns allélok mennyiségi hatása	52
4.2.5	A <i>CALR</i> mutáció klinikai jellemzői a mutáció típusa szerint.....	56
4.3	A <i>TERT</i> rs2736100 és a <i>JAK2</i> rs12343867 polimorfizmusok	58
4.3.1	A vizsgált SNP-k <i>BCR-ABL1</i> negatív MPN-re hajlamosító hatása.....	58
4.3.2	A <i>TERT</i> rs2736100_C polimorfizmus szerepe MPN-ben	63
4.3.3	A <i>TERT</i> rs2736100_C polimorfizmus CML-ben és AML-ben.....	65
5	Megbeszélés.....	66
5.1	Onkogén mutációk MPN-ben	66
5.1.1	A genetikai eltérések optimális meghatározási módszerei	66
5.1.2	A rutin diagnosztikai vizsgálati sorrend meghatározása	69
5.1.3	A V617F allél mennyiségi meghatározása, prognosztikai jelentősége	71
5.1.4	Szövődménygyakoriság és összesített túlélés <i>CALR</i> ^{poz} betegeknél.....	72
5.1.5	A <i>CALR</i> mutáns allél mennyiségének hatása	75
5.2	A <i>TERT</i> rs2736100 és a <i>JAK2</i> rs12343867 polimorfizmusok	76
5.2.1	A <i>TERT</i> rs2736100_C allél, mint MPN-re hajlamosító faktor.....	76
5.2.2	A társuló nem hematológiai malignitások.....	78
6	Következtetések.....	80
7	Összefoglalás	82
8	Irodalomjegyzék.....	84
9	Saját publikációk jegyzéke	107
9.1	A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények.....	107
9.2	A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények	107
10	Köszönetnyilvánítás	108

Rövidítések jegyzéke

AF: allélfrekvencia

AL: akut leukémia

AML: akut myeloid leukémia

AS-PCR: allélspecifikus polimeráz láncreakció (Allele-Specific Polymerase Chain Reaction)

ASXL1: additional sex combs like 1 gén

BCR-ABL1: breakpoint cluster region – Abelson 1 fúziós gén

bp: bázispár

CALR: calreticulin gén

CI: konfidencia intervallum

CML: krónikus myeloid leukémia

CMML: krónikus myelomonocytás leukémia

del: deléción

dg: diagnózis

EPO: erythropoetin

ET: esszenciális thrombocythaemia

EZH2: enhancer of zeste homologue 2 gén

GWAS: genomi léptékű asszociációs vizsgálatok (Genome-Wide Association Studies)

Hb: hemoglobin

Hct: hematokrit

HR: kockázati arány (Hazard Ratio)

HRM: nagy felbontású olvadási görbe analízis (High Resolution Melting)

HSCT: hematopoetikus őssejt transzplantáció (Hematopoietic Stem Cell Transplantation)

IDH1 és 2: 1. és 2. típusú izocitrát dehidrogenáz gén

ins: inszerció

JAK2: 2. típusú Janus kináz gén

LC 480: LightCycler 480 II készülék

LDH: laktát dehidrogenáz

MDS: myelodysplasia (Myelodysplastic Syndrome)

MF: myelofibrosis

MPL: thrombopoetin receptor gén (Myeloproliferative Leukemia virus oncogene)

MPN: myeloproliferatív neoplázia

MUT: mutáns

NK AML: normál kariotípusú AML

OR: esélyhányados (Odds Ratio)

OS: összesített túlélés (Overall Survival)

PAF: egy kockázati tényező betegség kialakulásában betöltött szerepe (Population Attributable Fraction)

PCR: polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

Ph: Philadelphia-kromoszóma

Plt: thrombocytaszám, vérlemezkeszám (Platelet)

PMF: primer myelofibrosis

PV: polycythaemia vera

QPCR: kvantitatív (mennyiségi) polimeráz láncreakció

RARS-T: refrakter anémia gyűrűs szideroblasztokkal, thrombocytosissal

STAT: jelátviteli és transzkripciót aktiváló fehérje (Signal Transducer and Activator of Transcription)

SNP: egyponyos nukleotid-polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism)

SRSF2: szerin/arginin-gazdag érési faktor (Serine/arginine-Rich Splicing Factor) 2 gén

TERT: telomeráz reverz transzkriptáz gén

TKI: tirozin-kináz inhibitor

TPO: trombopoetin

V617F: a *JAK2* gén 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje

WBC: fehérvérsejtszám (White Blood Cell)

WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

WT: vad típus (Wild Type)

1 Bevezetés

A myeloproliferatív neoplázia (MPN) a hematopoetikus őssejt klonális zavara következtében kialakuló betegségcsoport, amelyre különböző érett myeloid sejtek felszaporodása a jellemző. Dameshek 1951-ben ismerte fel e kórképek közös eredetét, és elsőként használta a myeloproliferatív zavar kifejezést [1]. Az MPN a myeloid őssejtek daganatos megbetegsége, melyek fokozott proliferációja egy vagy több sejtvonal túlburjánzásához vezet. A felszaporodott sejtek típusától függően beszélhetünk leukocytosisról és/vagy erythrocytosisról és/vagy thrombocytosisról (azaz magas fehérvérsejt-, vörösvérsejt- és vérlemezkeszámról). A különböző sejtípusok expansiója során a normál csontvelői sejtek a helyükről kiszorulnak, a neopláziás sejtek pedig a perifériás vérben is megjelennek. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization: WHO) 2016. évi besorolása szerint a myeloproliferatív neoplázián belül több kórkép különíthető el: a *BCR-ABL1* (breakpoint cluster region – Abelson 1 fúziós gén) vagy másnéven Philadelphia-kromoszóma (Ph) pozitív krónikus myeloid leukémia (CML), a krónikus neutrofil leukémia (CNL), a *BCR-ABL1* negatív, viszonylag gyakori MPN kórképek: az esszenciális thrombocythaemia (ET), a polycythaemia vera (PV) és a primer myelofibrosis (PMF); valamint a krónikus eozinofil leukémia (CEL) és a nem besorolható MPN (MPN-U) [2].

1.1 Philadelphia-kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák

A Philadelphia-kromoszóma negatív MPN, másnéven klasszikus MPN csoportjába az ET, a PV és a PMF betegségek tartoznak. ET-ben elsősorban a megakaryocytá, PV-ben az erythroid, PMF-ben pedig a megakaryocytá és a granulocytá sejtvonal érintett.

1.1.1 Esszenciális thrombocythaemia

Az esszenciális thrombocythaemia ritka betegség, 100 000 ember közül évente 1 új esetet regisztrálnak [3]. Elsősorban az idősebb korosztályt érinti, diagnóziskor az átlagos életkor 55 év. Nők körében gyakrabban fordul elő, mint férfiaknál [4]. ET esetén elsődlegesen a megakaryocytá sejtvonal érintett, aminek következtében a perifériás vérben a vérlemezkek száma jelentősen megnő: tartósan 450 G/L fölött alakul. A magas vérlemezkeszám miatt az ET-ben szenvedők főképp trombózisra hajlamosak, valamint a

vérlemezkék működészavarából adódóan vérzéses szövődmények is felléphetnek. A kórkép további jellegzetesége lehet a leukocytosis, mikrokeringéses tünetek (fejfájás, feledékenység, szédülés, látászavar, fülzúgás, paresztézia, végtagok zsibbadása) és viszketés [5]. Az esetek 40-60%-ában a betegség előrehaladtával lépmegnagyobbodás alakul ki [6]. Az ET myelofibrotikus és akut leukémiás (AL) átalakulásának kockázata alacsony, 10 év után ET-t követő myelofibrosis (MF) az esetek 0,8-4,9%-ában, akut myeloid leukémia (AML) pedig 0,7-3%-ában fordul elő [7, 8].

Az ET diagnózisának felállítása jelenleg a 2016-os WHO kritériumok alapján történik, ahol a fő követelmények közé a tartósan megemelkedett 450 G/L fölötti vérlemezkeszám, a megakaryocita hyperplasiát igazoló csontvelő biopszia, egyéb myeloproliferatív megbetegedések (pl. PMF prefibrotikus szakaszának) kizárása és az ET betegek közel 90%-ában jelen lévő klonális genetikai eltérések kimutatása tartozik. Minor kritériumként szerepel a reaktív thrombocytosis kizárása, amennyiben klonális genetikai marker nincs jelen [2, 9]. A nem csontvelő eredetű thrombocythaemia háttérben állhat többek között krónikus gyulladással járó megbetegedés (pl. rheumatoid arthritis, colitis ulcerosa), vérvesztés, súlyos vashiány, a lép eltávolítása vagy daganat. A diagnózis megállapításához mind a négy fő kritériumnak, vagy az első három fő valamint a minor kritériumnak kell teljesülnie.

Az ET alapvetően hosszú lefolyású betegség, citoreduktív kezelés nélkül is előfordulhat 10-20 éves túlélés. Az életkor, a kórelőzmény (trombotikus esemény) és a mutációk jelenléte alapján ET-ben négy kockázati csoport különíthető el. A nagyon alacsony kockázatú betegek 60 évnél fiatalabbak, kórelőzményükben nem szerepel trombozisz, és nem mutatható ki genetikai eltérés. Az alacsony kockázati csoportba tartozók szintén 60 évnél fiatalabbak, nem volt még trombozisuk, de genetikai eltérésük kimutatható. A közepes kockázati csoportot a 60 évnél idősebb, trombotikus kórelőzménnyel és genetikai eltéréssel nem rendelkezők alkotják. Magas kockázatúnak pedig azok a betegek számítanak, akiknek volt már korábban trombozisa vagy 60 évnél idősebbek és genetikai eltérésük kimutatható. Mivel a túlélést főként a súlyos komplikációk, szövődmények befolyásolják, a terápia célja a kockázati tényezők minimálisra csökkentése, a trombotikus és vérzéses komplikációk megelőzése [5, 10]. A nagyon alacsony kockázatú ET betegeknél nem feltétlenül szükséges terápiát alkalmazni, míg az alacsony kockázatúaknak legalább napi egyszer Aspirin szedése

javasolt, amely antitrombotikus hatásán túl a mikrovaskuláris zavarok enyhítésében is hatásos gyógyszer. Míg a közepes kockázatú betegeknél az alacsony dózisú Aspirin adása mellett nem feltétlenül szükséges a citoreduktív terápia, addig a magas kockázati csoportba tartozóknál ajánlott. A vérlemezkeshám csökkentésére elsődlegesen hidroxüreát alkalmaznak [5, 10]. Akiknél a hidroxüreával történő kezelés kudarcot vall, második vonalbeli terápiának fiatalabb korban alfa-interferont [5, 11, 12], 65 évnél idősebbek körében pedig buszulfánt javasolnak [5]. Bár a megakaryocita kolóniák gátlásán keresztül az anagrelid is csökkenti a vérlemezke képződést [11, 12] használata az irodalomban vitatott, mivel a hatóanyag összefüggésbe hozható artériás trombózis, vérzés és fibrotikus progresszió megnövekedett kockázatával [5].

1.1.2 Polycythaemia vera

A polycythemia vera ritka betegség, éves incidenciája $0,7/10^5$ lakos [3], férfiak körében gyakoribb. Főként az idősek betegsége, diagnóziskor az átlag életkor 60 év körül van. A betegség kezdetén az erythroid sejtvonal kontrollálatlan szaporodása következtében a hemoglobin szint (Hb) és a hematokrit (Hct) kórosan emelkedett értéket mutat. Az erythropoetin (EPO) hiányában is bekövetkező fokozott vörösvérsejt képződést mérsékeltebb fehérvérsejt- és vérlemezkeshám emelkedés is kísérheti. A vér alakos elemeinek megnövekedett térfogataránya emeli a trombotikus és vérzéses szövődmények (infarktus, agyvérzés) kialakulásának kockázatát [13]. A többlet véralkotókat a lép tárolja, ami a lép megnagyobbodásához vezethet. A betegség késői myelofibrotikus fázisára alacsony vörösvérsejtszám (anémia) illetve alacsony vérsejtszám (cytopenia) és az esetek 70%-ában lépmegnagyobbodás jellemző. A PV-ben szenvedő betegeknek fokozottabb az esélye a csontvelő myelofibrotikus átalakulására (10 év után 5-6%) vagy akut leukémiás traszformációra (10 év után 2-14%) [8].

A PV lappangva kezdődik, a klinikai tünetek között eleinte rossz közérzet, bágyság és gyengeség jelentkezik. Később a vér sűrűségének növekedése következtében a keringési zavarokkal összefüggő leggyakoribb tünetek a fejfájás, szédülés, fülzúgás, látászavar, enyhe memóriazavar, homályos látás és erythromelalgia. Jellemző továbbá a bőr és a nyálkahártyák vérbősége (plethorás arc, erezett kötőhártya,

lila ajkak). A fokozott sejtképzés miatt előfordulhat hőemelkedés, izzadás, fogyás, viszketés és köszvény is.

PV gyanújakor tisztázni kell, hogy elsődleges vagy másodlagos polycythaemia áll-e a háttérben. Ehhez a vér erythropoetin szintjét szükséges meghatározni, ami PV esetén alacsony, míg másodlagos polycythaemiában normál vagy magas értéket mutat. A szekunder polycythaemia háttérében állhat többek között hypoxia, szívbetegség, krónikus tüdőbetegség, vesebetegség és egyes daganatok.

A 2016. évi WHO ajánlásban a PV három fő diagnosztikai kritériumai közé tartoznak a vérkép tipikus eltérései (férfiaknál: $Hb > 16,5$ g/dL vagy $Hct > 49\%$; nőknél: $Hb > 16,0$ g/dL vagy $Hct > 48\%$), a csontvelő hisztológia, valamint a PV betegek több mint 95%-ánál előforduló klonális genetikai eltérések kimutatása. Minor kritériumnak számít az alacsony EPO szint [2]. A PV diagnózisához a három fő kritérium, vagy az első kettő fő és a minor kritérium együttes teljesülése szükséges. A csontvelő vizsgálat kulcsfontosságú a betegség súlyosságának a megítélésében, és a myelofibrosis fokának felmérésében. Azonban a klinikai gyakorlatban - főleg idősebb betegeknél - a csontvelő biopsziától el lehet tekinteni tartósan fennálló abszolút erythrocytosis esetén (férfiaknál $Hb > 18,5$ g/dL, $Hct > 55,5\%$; nőknél $> 16,5$ g/dL, $49,5\%$), amennyiben mutáció jelenléte igazolt, és alacsony az EPO szint [2, 5].

A terápia során a fő cél a trombotikus és vérzéses szövődmények megelőzése [7, 14]. A betegek életkoruk és korábbi trombotikus eseményeik alapján alacsony vagy magas kockázati csoportokba sorolhatók. Az alacsony kockázatú betegeknél napi egyszer Aspirint adnak, és a vörösvérsejtszám csökkentése céljából vérlebotsátást (phlebotomiát) alkalmaznak, ami általában gyors eredményt nyújt a hematokrit normál értéken ($< 45\%$) tartásában [5, 7]. A 60 évnél idősebbek vagy trombózison átesett betegek magas rizikójúnak számítanak [5], citoreduktív terápiára is szükségük van a trombózis kockázatának minimalizálásához. Elsőként általában hidroxüreát adnak, de a vörösvérsejt és vérlemezke termelését gátló gyógyszerek kiválasztásában a betegek életkora is szerepet játszik. Amennyiben a hidroxüreá nem hatásos, fiatalabb korban alfa-interferont, 65 évnél idősebbek körében pedig buszulfánt javasolnak [5]. Lévén, hogy az interferon terápia a betegek jelentős részénél (96%-ánál) mellékhatásokat okoz, ellenőrzött klinikai vizsgálatok szükségesek PV-ben az interferon terápia előnyeinek és hátrányainak tisztázására a hidroxüreával szemben [5]. A hidroxüreára adott nem

megfelelő válasz illetve intolerancia esetén 2014-ben törzskönyvet kapott a ruxolitiniib nevű Janus kináz (JAK) 1 és 2 inhibitor, amely hatékonyan kontrollálja a vér paramétereiket, a lépméretet, az általános tüneteket, sőt bizonyos betegeknél molekuláris válasz is elérhető [15]. Tefferi és munkatársai a hidroxiureára nem reagáló betegeknél mégis a buszulfán vagy interferon kezelés mellett érvelnek, mert a PV betegek többségénél ezek is megfelelően hatékonyak. Csak abban az esetben javasolnak ruxolitiniib vagy más JAK inhibitor, amennyiben súlyos és elhúzódó viszketés áll fenn, vagy a jelentős mértékű lépmegnagyobbodás az előzőekben említett gyógyszerekre nem reagál [5, 16].

1.1.3 Primer myelofibrosis

A primer myelofibrosis, másnéven krónikus idiopátiás myelofibrosis a csontvelő ritka daganatos megbetegedése, incidenciája évente $0,5/10^5$ fő [3]. Nők körében gyakrabban fordul elő, az átlagos életkor diagnóziskor 67 év [17]. A csontvelői fibrosis mellett a betegségre heterogén klinikai kép (leukocytosis vagy thrombocytosis, cytopenia), csontvelőn kívüli vérképzés és lépmegnagyobbodás jellemző [18]. A klinikai tünetek közé tartozik a fáradtság, az éjszakai izzadás, a láz, a fogyás, a csontfájdalom és a bőrviszketés, amelyek az életminőséget jelentősen befolyásolják. A magas vérlemezkeszám következtében a betegeknél fokozott a vérzés- és trombozishajlama (pl. splanchnikus vénatrombózis) [6, 19]. A kór prefibrotikus stádiumában a megakaryocita sejtvonal burjánzását megnövekedett csontvelő cellularitás, és a granulocita sejtek proliferációja kíséri. Az erythroid sejtek csökkent képződése is gyakori tünet [2]. A továbbiakban a csontvelő állományát fokozatosan rostos kötőszövet foglalja el, ami a csontvelő kimerülését okozza. A PMF előrehaladottabb állapotában a csontvelő károsodása következtében megjelenik a csontvelőn kívüli vérképzés, ami a lép és a máj megnagyobbodásához vezet, és hasi teltségérzetet okoz. Ebben a fibrotikus szakaszban a vércépre a vörösvérsejtek, a fehérvérsejtek és a vérlemezkek erőteljesen csökkent száma jellemző, pancytopenia alakulhat ki [20]. A betegek halálát általában a kór leukémiás transzformációja, szív- és érrendszeri események, vérzés valamint tromboembóliás szövődmények okozzák [19].

A PMF diagnózisának felállítása során a 2016-os WHO kritériumrendszer alapján el kell különíteni a betegség prefibrotikus és fibrotikus szakaszát. A két fázis

között főként a csontvelővizsgálat tesz különbséget. A csontvelő biopszia mellett fő követelmény az egyéb myeloproliferatív megbetegedések és a csontvelői fibrosis másodlagos okainak kizárása, valamint a PMF betegek közel 90%-ában jelen lévő klonális genetikai eltérések kimutatása [2]. A másodlagos myelofibrosis hátterében állhatnak nem rosszindulatú megbetegedések (pl. fertőzések, D-vitamin hiány, autoimmun betegségek, krónikus gyulladás, mellékpajzsmirigy rendellenességek), szolid tumorok (pl. emlő-, tüdő-, gyomor- és prosztata daganatok [6]) valamint hematopoetikus malignitások (CML, PV, ET, myelodysplasia: MDS, krónikus myelomonocytás leukémia: CMML és AML). A minor követelmények közé tartozik az anémia, a leukocytosis (>11 G/L) a tapintható lépmeagnagyobbodás és az emelkedett szérum LDH (laktát dehidrogenáz) szint valamint fibrotikus PMF esetén a leukoerythroblastosis [2]. A diagnózis felállításához mindhárom fő követelménynek és legalább egy minor kritériumnak kell teljesülnie.

A DIPSS-plus (Dynamic International Prognostic Scoring System-plus) klinikai adatokon alapuló prognosztikai pontozási rendszer PMF-ben négy rizikócsoportot különít el az életkor (>65 év), a hemoglobinszint (<10 g/dL), a fehérvérsejt- (>25 G/L) és a vérlemezkeszám (<100 G/L), a blaszt arány ($\geq 1\%$), az általános tünetek, a transfúzió szükségessége, valamint a kedvezőtlen kimenetellel társuló kariotípus alapján. Az alacsony kockázatú betegek számíthatnak a leghosszabb (15,4 éves) túlélésre. Az intermediate-1 és intermediate-2 csoportokba tartozók medián túlélése rendre 6,5 illetve 2,9 év. A legrosszabb túlélési esélyekkel (1,3 év) pedig a magas rizikójú betegek rendelkeznek [19].

PMF esetén jelenleg az egyetlen kuratív kezelés az allogén hematopoetikus őssejt transzplantáció (HSCT). A legtöbb terápia nem befolyásolja a betegség lefolyását, csak a tünetek, panaszok csökkentésére szolgálnak. A tünetmentes alacsony és intermediate-1 kockázati csoportba tartozóknál elegendő a beteg megfigyelése, nem szükséges terápiás beavatkozás. Tünetek fennállása esetén (pl. anémia, lépmeagnagyobbodás, csontfájdalom) specifikus tüneti kezeléseket alkalmaznak. Citoreduktív terápiára extrém leukocytosis vagy thrombocytosis esetén kerül sor. Az intermediate-2 és magas rizikócsoporthoz sorolt betegeknél azonban meg kell fontolni az őssejt transzplantáció lehetőségét [19]. A nem transzplantáltaknál támogató kezelésként magas sejtszám esetén myeloszuppresszív gyógyszereket (hidroxiureát) illetve

ruxolitinit adnak [21, 22], továbbá javasolt számukra klinikai vizsgálatokban való részvétel. A ruxolitinit a kór lefolyását jelentősen nem változtatja meg, de hatására javulnak a betegek általános tünetei, jelentős lépméret csökkenés érhető el, és pozitívan befolyásolja a túlélést is [18]. A leggyakoribb hematológiai mellékhatások között azonban anémia (49,2%) és thrombocytopenia (52,4%) szerepelnek, amelyek dózis módosítással vagy transzfúzióval kezelhetők [17]. A ruxolitinit immunszuppresszív hatása miatt gyakoriak a fertőzések, emellett megnöveli a nem-melanómás bőrrák kockázatát is [17]. A klinikai vizsgálatok alatt álló új generációs JAK inhibitorok közé a momelotinit, a pacritinit és a fedratinit tartoznak [18]. Lépeltávolításra gyógyszeres kezelésre nem reagáló lépmegnagyobbodás esetén kerülhet sor. Splenectomiát követő májmegnagyobbodás, nem-hepatosplenicus csontvelőn kívüli vérvézés és extrém csontfájdalom esetén a sugárterápia a leghatékonyabb [19].

1.2 Philadelphia-kromoszóma pozitív myeloproliferatív neopláziák

A myeloproliferatív neopláziák csoportjába tartozó CML-ben szenvedő betegek 100%-ánál kimutatható a *BCR-ABL1* pozitivitás, azaz a Philadelphia-kromoszómaként ismert 9. és 22. kromoszóma transzlokációja: t(9;22)(q34;q11.2). A létrejövő fúziós génben egymás mellé kerülnek a *BCR* (breakpoint cluster region) és az *ABL1* (Abelson 1) gének lokuszai, amelynek hatására szabályozatlan és kóros jelátviteli folyamatok indulnak el [23].

1.2.1 Krónikus myeloid leukémia

A CML egy ritka vérvézőszervi megbetegedés, amelyre a myeloid sejtek, főként a granulocyták, illetve azok éretlen előalakjainak túltermelődése jellemző. Éves incidenciája $1-1,3/10^5$ [24]. A betegek átlagos életkora diagnóziskor 50-60 év, férfiaknál gyakrabban fordul elő. A CML lefolyását tekintve három főbb szakaszt különböztethetünk meg: a krónikus, az akcelerált és a blasztos fázist [25]. A CML krónikus fázisa legtöbbször perifériás vérből egy egyszerű vérvép vizsgálattal és a *BCR-ABL1* fúziós gén vagy transzkriptum kimutatásával diagnosztizálható. A betegség előrehaladottságának megállapításához azonban csontvelő vizsgálat szükséges [2].

A CML lappangva kezdődik, az évekig elhúzódó krónikus fázis kevés tünettől jár. Az emelkedett fehérvérsejtszámra gyakran csak rutin vérvizsgálat alkalmával derül fény. A betegek fáradtságról, gyengeségről és fogyásról panaszkodhatnak. Az általános tünetek mellett a lépmegnagyobbodás következtében étvágytalanság és hasi fájdalom, teltségérzés jelentkezhethet. A leukocytosison túl thrombocytosis is fennállhat, ami emeli a trombotikus szövődmények kialakulásának kockázatát.

Bár az akcelerált fázis definíciójára nincs általánosan elfogadott kritériumrendszer, a WHO 2016-os ajánlása szerint az akcelerált fázist progresszív fehérvérsejtszám emelkedés (>10 G/L) és további felgyorsult lépmegnagyobbodás kíséri. Erre a fázisra továbbá perzisztens thrombocytosis (>1000 G/L), vagy perzisztens thrombocytopenia (<100 G/L) jellemző, a perifériás vérben legalább 20%-os bazofil arány, valamint a perifériás vérben vagy a csontvelőben 10-19%-os blaszt arány figyelhető meg [2, 25]. A klinikai tünetek között láz, éjszakai izzadás és csontfájdalom jelentkezik. A funkciójukat ellátni nem képes fehérvérsejtek következtében megnő a fertőzésekre való hajlam [6]. A CML utolsó stádiuma, a blasztos krízis gyakorlatilag egy akut myeloid vagy lymphoid leukémiának megfelelő állapot, ahol jellemző lehet a blasztok csontvelőn kívüli szaporodása [25]. A vérben és a csontvelőben a blasztok aránya eléri a 20%-ot [2, 9]. A blaszt fázisos CML prognózisa a mai napig kedvezőtlen.

A CML-ben szenvedő betegek átlagos túlélése jelentősen megnőtt a célzott molekuláris kezelések megjelenésével. A korábban alkalmazott kemoterápia, alfa-interferon és csontvelő átültetés helyett napjainkban a krónikus fázisban diagnosztizált betegeknél a tirozin-kináz inhibitorokat (TKI) alkalmazzák első vonalbeli kezelésként [23]. Azoknál a betegeknél, akiknél az első vonalbeli kezelés kudarcot vall (imatinib), a második és harmadik generációs tirozin-kináz gátlószer (dasatinib, nilotinib, ponatinib, bosutinib) adhatók [23]. A tirozin-kináz inhibitorokra adott választ és a kimenetelt több tényező befolyásolja. A három prognosztikai besorolást nyújtó rendszer (Sokal, Euro és EUTOS) esetén a relatív kockázatot klinikai és hematológiai adatok (életkor, lépméret, vérlemezkeszám, blaszt és bazofil arány) alapján számolják ki [25]. A TKI kezelésre jól reagáló betegek *BCR-ABL1* expressziója négy-öt nagyságrendet is csökkenhet (mély molekuláris válasz) és többségük panasz- és tünetmentesen élhet [6]. Minimum két éves mély molekuláris válasz után abbahagyva a TKI terápiát, 67 hónap követési idő mellett a betegek 39%-a számíthat további kezelés nélkül is a *BCR-ABL1*

expresszió alacsony szinten maradására és klinikai tünetmentességre [26]. Ők nagy valószínűséggel gyógyulnak tekinthetők. Bizonyos krónikus fázisban lévő betegeknél azonban, akik legalább két TKI-ra rezisztensek, vagy azoknál, akiknél a kór már előrehaladott stádiumban van továbbra is a csontvelő transzplantáció az egyetlen kuratív megoldás [23].

1.3 Akut myeloid leukémia

Az akut myeloid leukémia egy hematopoetikus őssejt eredetű betegségcsoport, amely a myeloid sejtek előalakjainak túlszaporodásával jár. Az AML a felnőttek körében leggyakrabban jelentkező akut leukémia. Incidenciája a korrallal emelkedik, előfordulási aránya évente $1,3/10^5$ a 65 évnél fiatalabbak, míg $12,2/10^5$ a 65 évnél idősebbek esetén [27].

Az AML biológiailag és klinikailag is nagyon heterogén kórkép. A kóros hematopoetikus differenciációt és proliferációt kromoszóma transzlokációk és gén mutációk okozzák, amelynek következtében a gyorsan osztódó éretlen myeloid sejtek (blasztok) akadályozzák a normál csontvelői sejt képzést [27]. A leukocytosis mellett a vörösvérsejt- és vérlemezkeszám gyors csökkenése figyelhető meg, ami megmagyarázza az első tüneteket. Az anémia következtében gyengeség, fáradékonyság jelentkezhet, felléphetnek vérzések (pl. orrvérzés, emésztőrendszeri vérzés), vagy az immunhiány miatt láz és visszatérő fertőzések alakulhatnak ki. Az AML további, nem specifikus tünete az étvágytalanság és a fogyás, valamint a csont- és az ízületi fájdalmak [6].

A klinikai megjelenésében és lefolyásában jelentősen eltérő AML esetek és kapcsolódó neopláziák a WHO 2016-os ajánlása alapján több csoportba sorolhatók [2]. Az első csoportba a visszatérő genetikai eltérésekkel jellemzett de novo AML tartozik. A második csoportot a myelodysplasiából vagy más hematológiai kórképből kialakuló másodlagos AML esetek alkotják, amelynek prognózisa kedvezőtlen, a betegek többsége időskorú. A további csoportokat a terápiát követően kialakuló myeloid neopláziák, az egyéb módon nem besorolható AML, a myeloid szarkóma és a Down szindrómához köthető myeloid proliferációk képezik [2]. A kezelések alapját a cytarabine és anthracycline alapú citosztatikus kombinációk és az erre alkalmas pácienseknél az allogén HSCT képezi [27].

1.4 Genetikai eltérések *BCR-ABL1* negatív myeloproliferatív neopláziákban

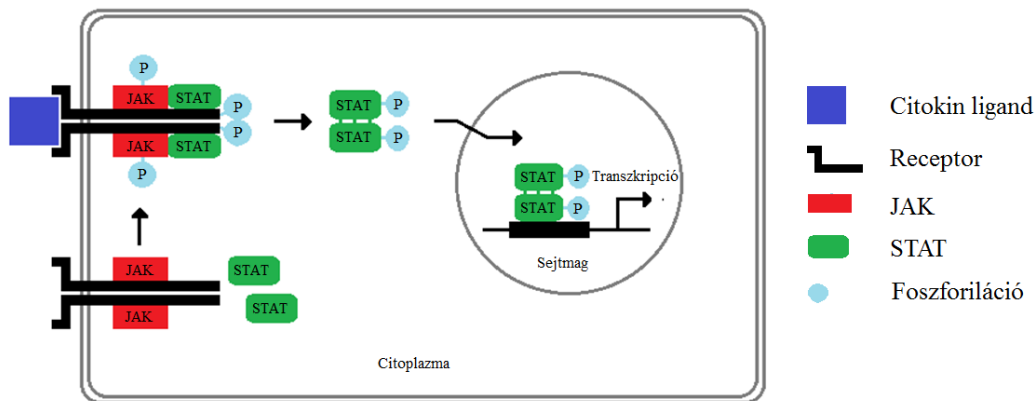
Az elmúlt évtizedben több *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN (PV, ET, PMF) kialakulásáért felelős, csontvelői őssejtekben kialakuló szerzett mutációt azonosítottak, amelyek mindegyike a JAK/STAT (STAT: signal transducer and activator of transcription) jelátviteli útvonalat aktiválja. Elsőként a 2. típusú Janus kináz (*JAK2*) gén 14. exonjában a 617. valin aminosav fenilalanin cseréjét (V617F) eredményező pontmutációt írták le 2005-ben [28-31]. A thrombopoetin receptor gén (*MPL*) 10. exonjának pontmutációit V617F negatív ET-ben és PMF-ben 2006-ban [32], a *JAK2* gén 12. exon mutációit V617F negatív PV-ben 2007-ben ismertették. 2013-ban két munkacsoport, egymástól függetlenül, egyszerre azonosította a calreticulin (*CALR*) gén 9. exonját érintő mutációkat *JAK2* és *MPL* negatív ET-ben és PMF-ben [33, 34]. A *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* gének eltérései MPN specifikusak, más hematológiai betegségben ritkán fordulnak elő. Általában a három gén mutációi egyszerre nem fordulnak elő, két gén együttes érintettsége irodalmi ritkaságnak számít. Mivel klasszikus MPN-ben a betegek 85-90%-ában a *JAK2*, az *MPL* és a *CALR* gének valamelyike érintett, a három gén mutációinak vizsgálata diagnosztikus jelentőségű [35, 36]. Az MPN betegek többségében a JAK-STAT útvonalat aktiváló mutációk mellett egyéb társuló génmutációk is azonosíthatók. Ezek a mutációk leggyakrabban epigenetikai módosításért, mRNS (hírvivő RNS) érésért felelős, illetve tumor szupresszor géneket érintenek. Kimutatásuk MPN-ben prognosztikai jelentőségű [36, 37]. Az MPN kialakulásában nemcsak szerzett mutációk, hanem öröklött eltérések is szerepet játszhatnak, például a *JAK2* és a *TERT* (telomeráz reverz transzkriptáz) gének polimorfizmusai, amelyek befolyásolhatják a betegség fenotípusát, hajlamosító- illetve védőfaktorok lehetnek [38, 39].

1.4.1 Szerzett genetikai eltérések

A hematopoetikus őssejtek differenciálódását és a myeloid sejtek proliferációját befolyásoló citokinek (granulocita kolónia stimuláló faktor: G-CSF, granulocytamonocita kolónia stimuláló faktor: GM-CSF, EPO és thrombopoetin: TPO) a JAK-STAT jelátviteli útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat. A nem receptor tirozinkinázok családjába tartozó 2. típusú Janus kinázok (*JAK2*) a sejtfelszíni receptorok citoplazmatikus végéhez kapcsolódnak, és foszfát csoportok áthelyezését katalizálják. A

JAK2 által végzett foszforiláció során újabb jelátviteli fehérjék, a STAT molekulák is aktivált állapotba kerülnek. Az aktív transzkripciós faktorok (STAT dimerek) pedig különböző sejtosztódást szabályozó gének expresszióját befolyásolják [35].

Az MPN-re jellemző legfontosabb három gén (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) mutációnak mindegyike a JAK/STAT jelátviteli útvonalat aktiválja, amelyet az 1. ábra szemléltet. E gének mutációinak jelenlétében a JAK/STAT jelátviteli útvonal ligand hiányában is állandóan aktivált állapotba kerül.



1. ábra A JAK/STAT jelátviteli útvonal [40]. A foszfát csoportok áthelyezését katalizáló 2. típusú Janus kinázok a citoplazmában találhatóak, és a sejtfelszíni receptorok citoplazmatikus végéhez kapcsolódnak [40]. Kináz aktivitásuk megnövekszik, ha a sejtfelszíni receptorhoz citokin ligand kötődik. A ligand kötődésének hatására a receptorok dimert alkotnak, aminek következtében a tirozin-kinázok már megfelelően közel kerülnek egymáshoz ahhoz, hogy kölcsönös foszforiláció révén egymást és a receptor tirozin maradékait is aktiválni tudják [41]. Ezáltal olyan kötőhelyek jönnek létre, ahová a kinázok célfehérjéi, a STAT molekulák kötődni tudnak. A receptorhoz kapcsolódott STAT fehérjék a JAK2 általi foszforilációt követően dimerizálódnak [41]. Az aktív transzkripciós faktorok (STAT dimerek) a citoplazmából a sejtmagba vándorolnak, és különböző sejtosztódást szabályozó gének kifejeződésére vannak hatással [29].

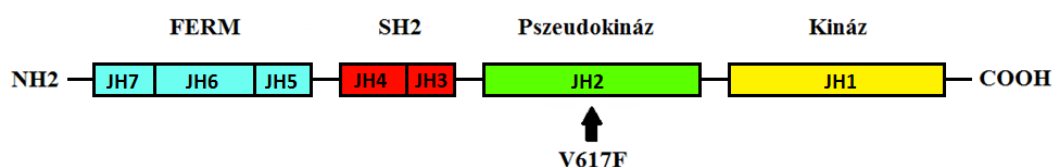
Rövidítések: JAK: Janus kináz; P: foszforiláció; STAT: jelátviteli és transzkripciót aktiváló fehérje

MPN-ben a STAT fehérjék expressziója jelentősen megváltozik a normál hematopoiesis esetén tapasztalt mérsékelt kifejeződéshez viszonyítva. Receptortól függően a STAT1, STAT3 vagy STAT5 fehérjék aktiválódnak. A STAT3 és STAT5 nemcsak segíti a myeloid sejtek proliferációját [35], de szerepet játszhatnak azok redox homeosztázisában is [42]. Az irodalomban leírtak alapján a STAT3 és STAT5 molekulák foszforilációja PMF-ben gyakoribb, mint ET-ben vagy PV-ben. További megfigyelések szerint bár az aktivált STAT5 fehérjék PV-ben és ET-ben egyaránt jelen vannak, ET-ben mégis sokkal hangsúlyosabb a STAT1 molekulák aktivációja. A STAT1 aktiváció a gamma-interferon emelkedett szintjén keresztül segíti a megakaryopoesist és ET-szerű fenotípust eredményez [43]. Egyelőre nem ismert a pontos mechanizmus, ami ezeket a jelátviteli különbségeket okozza a különböző MPN kórképekben [44].

1.4.1.1 *JAK2 V617F pontmutáció*

A 2. típusú Janus kináz pszeudokináz doménjét érintő V617F pontmutációt négy kutatócsoport azonosította egymástól függetlenül [28-31]. A gén 14. exonjában a 617. valin aminosav fenilalaninre történő cseréjéért egy báziscsere felelős (c.1849G>T). A *JAK2 V617F* gyakori előfordulását PV-ben (>95%), valamint ET-ben és PMF-ben (50-60%) később számos tanulmány megerősítette [45, 46]. A mutáció ritkán más myeloid kórképek esetében is előfordulhat, mint például myelodysplasiában, CMML-ben vagy AML-ben [36, 47].

A *JAK2* gén szerkezetét az 2. ábra szemlélteti. A V617F mutációval a *JAK2* pszeudokináz domén gátló funkciója sérül, ami a kináz domén konstitutív aktivációját eredményezi, és STAT3, STAT5 foszforilációt katalizál [48].



2. ábra A *JAK2* gén szerkezetének sematikus ábrája [49]. A *JAK2* gén hét JAK homológ doménből áll (JH1-JH7): a molekula JH1 felőli végén egy karboxil csoport (COOH), míg JH7 felőli végén egy amino (NH₂) csoport található. A JH1 domén katalitikus kináz aktivitással bír, a JH2 pedig a JH1 aktivitásának szabályozásában

szerepet játszó, katalitikusan inaktív pszeudokináz domén. A JH3 és JH4 domének együttesen alkotják a 2. típusú Src-homológot (SH2), míg a citokin receptorokhoz kapcsolódó NH₂-terminális régióinak (JH5-JH7) FERM domén a neve. A FERM domén fehérjék plazma membránba történő áthelyezésében játszik szerepet. A V617F mutáció a pszeudokináz domént érinti [49].

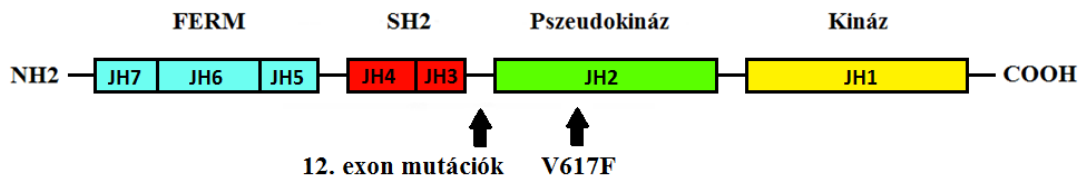
Rövidítések: JH: JAK homológ domén; SH2: 2. típusú Src-homológ domén; FERM: fehérje modul (F: 4.1-es fehérje, E: ezrin, R: radixin és M: moesin); V617F: a JAK2 gén 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje.

Nem ismert, hogy a *JAK2* gén egyetlen pontmutációja miképpen tud három különböző klinikai képpel járó kórformát létrehozni [50]. Az egyik elképzelés szerint a háttérben a heterozigótáság elvesztése áll: uniparentális diszómia következtében bizonyos sejtek a *JAK2* V617F mutációt két kópiában hordozzák [44]. Az 50% feletti V617F% az MPN klonális evolúciójának a markere [51]: a mutáció homozigóta formája ET-ben ritkaságnak számít, PV-ben gyakori, PV-t követő MF esetén pedig a betegek közel 100%-ánál jelen van [52, 53]. Egy másik elmélet szerint jelátviteli különbségek vannak PV-ben, ET-ben és PMF-ben [44]. Teofili és munkatársai kimutatták, hogy a különböző MPN megbetegedésekre különböző STAT5 és STAT3 expressziós mintázat jellemző [48]. A heterozigóta és a homozigóta mutáns sejtek jelátvitel is különbözhet, ami szintén fenotípus eltéréseket okozhat MPN-ben [44]. A betegség megjelenését tekintve egyéb genetikai tényezők, pl. különböző polimorfizmusok jelentősége is felmerül, valamint a nemiség is szerepet játszhat a heterozigótáság elvesztésekor (a *JAK2* V617F mennyisége szignifikánsan alacsonyabb nőknél). A *JAK2* V617F kópiaszám, a jelátviteli különbségek és az egyéb genetikai faktorok közösen alakíthatják a PV, ET vagy PMF fenotípust [44].

1.4.1.2 *JAK2* 12. exon mutációk

A V617F és a *JAK2* 12. exon mutációk együttesen a PV-ben szenvedő betegeknél a genetikai eltérések közel 100%-át adják [54, 55]. Irodalmi adatok szerint a *JAK2* 12. exon mutáció gyakorisága az európai PV-ben szenvedő betegek körében 1,9-7,4%. A *JAK2* 12. exon mutáció ET-ben és PMF-ben nem fordul elő [36], vizsgálata csak V617F negatív PV-ben indokolt.

Valamennyi 12. exon mutáció a JAK fehérje 533-547. aminosavak közötti 44 nukleotid hosszúságú régióját érinti, amely az SH2 és a pszeudokináz domén összekapcsoló szekvenciája (3. ábra). A *JAK2* 12. exon mutációk módosítják a JH2 domén szerkezetét, aminek hatására sérül a JAK fehérje önszabályozó funkciója. Hasonlóan a V617F mutációhoz, a 12. exon mutációk is citokin független proliferációt indukálnak [47].



3. ábra A *JAK2* gén szerkezetének sematikus ábrája [49]. A 12. exon mutációk az SH2 és a pszeudokináz domén összekapcsoló szekvenciáját érintik.

Rövidítések: JH: JAK homológ domén; SH2: 2. típusú Src-homológ domén; FERM: fehérje modul (F: 4.1-es fehérje, E: ezrin, R: radixin és M: moesin); V617F: a JAK2 gén 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje.

A *JAK2* 12. exon mutációk lehetnek pontmutációk, deléciók (del), inszerciók (ins) és duplikációk [36]. Leginkább a 3-12 bázispáros (bp) olvasási keretet megtartó deléciók fordulnak elő. A leggyakoribb mutáció az N542-E543del (23–30%), amit a K537L, az E543-D544del és az F537-K539delinsL (10–14%), valamint az R541-E543delinsK (<10%) mutáció követ a gyakorisági sorrendben [36].

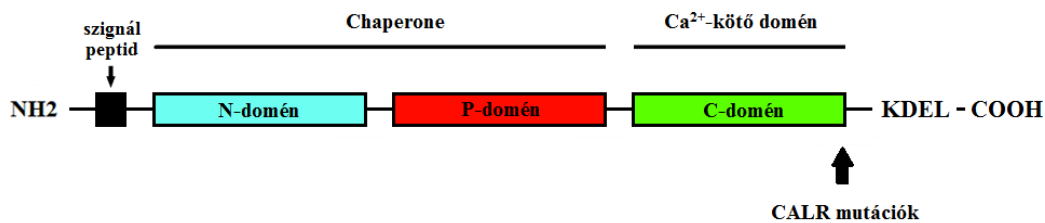
A *JAK2* 12. exon mutációt hordozó betegek többségénél a csontvelőben tiszta erythroid hyperplasia figyelhető meg, és alacsony a szérum erythropoetin szint [36]. Klinikailag a *JAK2* 12. exon mutációra pozitív betegek fiatalabbak diagnóziskor (az esetek 40%-a 50 év alatti), a hemoglobin és hematokrit értékeik magasabbak, mint V617F mutáció jelenléte esetén. Az esetek kis százalékában a megakaryocita és a granulocita sejtvonalak érintettsége is kimutatható [36, 47]. A betegség kimenetelét tekintve nincs jelentős különbség a V617F és 12. exon mutációt hordozók között [47].

1.4.1.3 *CALR* gént érintő mutációk

JAK2 és *MPL* negatív ET-ben és PMF-ben a calreticulin gén 9. exonját érintő mutációkat két munkacsoport egymástól függetlenül azonosította 2013-ban [33, 34]. A *CALR* mutációk gyakorisága ET-ben és PMF-ben 25 és 35% között alakul, ezáltal

MPN-ben a 2. leggyakoribb genetikai eltérés. A *CALR* mutációk néha előfordulhatnak myelodysplasiában (RARS-T: refrakter anémia gyűrűs szideroblasztokkal, thrombocytosissal), PV-ben és nagyon ritkán *BCR-ABL1* pozitív CML-ben, valamint *JAK2* V617F mutációval egyidejűleg is [36]. A *CALR* gént érintő eltérések, a *JAK2* és az *MPL* mutációkhoz hasonlóan a JAK/STAT jelátviteli útvonalat aktiválják. A közös hatásmechanizmus megmagyarázza a *CALR*, a *JAK2* és az *MPL* mutációk együttes előfordulásának alacsony valószínűségét, és a *CALR* pozitív betegek JAK inhibitorokra adott válaszát [56, 57].

A *CALR* egy kalcium-kötő, főként endoplazmatikus retikulumban található chaperone molekula (dajkafehérje). Dajkafehérjeként legfőbb funkciója a fehérjék szerkezeti összerendeződésének elősegítése, kalcium-kötő fehérje lévén pedig a kalcium homeosztázis fenntartásában játszik jelentős szerepet [47]. A *CALR* fehérje szerkezetét az 4. ábra szemlélteti.



4. ábra A *CALR* fehérje szerkezete. A calreticulin fehérje 3 fő szerkezeti egységből áll: N domén, P domén és C domén, sorban kézzel, pirossal és zölddel jelölve. A fehérje egy N terminális aminosav szignállal indul (fekete doboz). Maga az N domén egy lektin-kötő hely, melynek a chaperone aktivitásban és a Zn^{2+} megkötésében van szerepe. A középső prolinban gazdag P domén nagy affinitású, de kis kapacitású kalcium-kötő helyeket tartalmaz. A negatív töltésű aminosavakból álló C domén pedig egy nagy kapacitású kalcium-kötő hely, és egy C terminális 'KDEL' endoplazmás retikulum retenciós szignállal zárul [47, 58].

Rövidítések: CALR: calreticulin; KDEL: endoplazmás retikulum retenciós szignál.

A vad típusú *CALR* fehérje C terminális régiója negatív töltésű, míg a mutáns *CALR* lizinben és argininben gazdag pozitív töltésű C terminális domént eredményez. A kalcium-kötő C domén töltöttségének változása következtében sérül a mutáns fehérjék

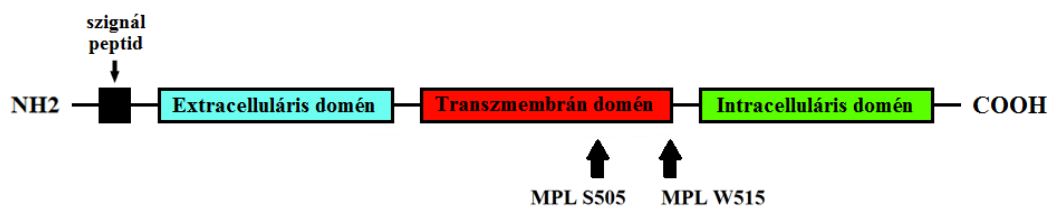
kalcium-kötő képessége. Továbbá minden mutánsban elveszik az utolsó négy aminosav molekula, az újonnan szintetizált fehérjék visszatartásáért felelős ún. 'KDEL' endoplazmatikus retikulum retenciós szignál ('KDEL': lizin, aszparaginsav, glutaminsav és leucin). Elf és munkatársai bizonyították, hogy a mutáns CALR C terminálisa a thrombopoetin receptorhoz közvetlenül kötődik, és ligandkapcsolódástól függetlenül aktiválja azt. Az összekapcsolódáshoz az MPL extracelluláris N-glikozilációs részére és a mutáns CALR glikán-kötő helyére van szükség. Az folyamat valószínűleg az endoplazmatikus retikulumban történik, majd az MPL-CALR komplex együttesen vándorol a sejtfelszínre [59]. A két molekula kölcsönhatásának feltétele a mutáns CALR fehérje C doménjének pozitív töltöttsége, amely elengedhetetlen az onkogén átalakulás létrejöttéhez. A thrombopoetin receptor aktiváció által a JAK/STAT útvonal konstitutívan aktívvá válik, és citokin független sejtproliferáció figyelhető meg [33, 34, 56, 57].

Klampfl és munkatársai [33] a calreticulin génben 36 féle MPN-re jellemző inszerciót és deléciókat határoztak meg, de azóta már összesen több mint 50 féle variációt azonosítottak [36]. A *CALR* mutációt hordozó eseteknek közel a fele egy 52 bázispáros deléció (1. típus: c.1092_1143del; L367 fs*46), míg a mutációk 35%-a egy 5 bázispáros inszerció (2. típus: c1154_1155insTTGTC; K385 fs*47). A *CALR* mutációk a *JAK2* és *MPL* negatív ET és PMF betegek 60-80%-ában kimutathatók [36].

1.4.1.4 *MPL* gént érintő mutációk

Az *MPL* (myeloproliferatív leukémia vírus onkogén) mutációk gyakorisága *JAK2* V617F negatív ET és PMF betegek csoportjában 5-10% között alakul [32, 47]. A W515L aminosav csere RARS-T és AML betegek mintáiban is jelen lehet [60]. Az *MPL* mutációk PV-ben általában nem fordulnak elő [61], illetve együttes előfordulásuk a *JAK2* V617F pontmutációval irodalmi ritkaságnak számít [36].

A *MPL* gén a megacaryocyták egyik legfontosabb növekedési faktorát, a thrombopoetin receptort kódolja [36]. A thrombopoetin receptor szerkezetét az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra A *thrombopoietin receptor* fehérje szerkezete. A hematopoetin receptorok családjába tartozó *MPL* gén a thrombopoetin receptort kódolja, amelynek 635 aminosav építőköve négy főbb szerkezeti egységet alkot. Az N terminális szignál peptidet az 1. exon, a fehérje sejten kívüli részét (kékkel jelölve) a 2-9. exonok, a transzmembrán domént (pirossal jelölve) a 10. exon, míg a sejten belüli domént (zölddel jelölve) a 11-12. exonok kódolják [60]. A leggyakoribb szerzett *MPL* mutációk a 10. exonban találhatóak, az S505 és W515 kodonokat érintik.

Rövidítések: MPL: thrombopoietin receptor gén.

TPO kötődésekor a receptor dimerizálódik, jelátvittele a JAK/STAT útvonalon keresztül történik. A szerzett *MPL* mutációk ligandtól független receptor aktivitást, ezáltal fokozott sejtosztódást eredményeznek [32, 36, 47]. A leggyakoribb szerzett *MPL* mutációk a receptor transzmembrán doménjében találhatóak, az 505. szerin és az 515. triptofán aminosavakat érintik. Az 505. pozícióban a szerin aszparagin (S505N) cserében több kodon is érintett lehet. Az 515. tripletet az *MPL* fehérje amfipatikus „K/RWQFP” motívuma tartalmazza, amely egy autoinhibitoros régió közvetlenül a transzmembrán domén határán [60]. Az 515. kodon leggyakoribb patogén mutációi a W515L és a W515K. Ritka esetekben azonban előfordulhatnak W515A, W515R és W515S aminosav cserék is. ET-ben szenvedők között a thrombopoetin receptor extracelluláris doménjében is találtak funkciónyeréssel járó mutációt (Y252H), amely szintén spontán receptor aktivitást és fokozott sejtproliferációt okoz [60]. További ritka mutációkat azonosítottak az S204P/F, V501A, S505C, A506T, V507I, G509C, L510P, R514K és W515-P518delinsKT, R519T, Y591D pozíciókban, de ezek közül bizonyos esetekben a patogén jelentőség nem tisztázott [36, 60].

A klinikai megjelenés vonatkozásában az *MPL* mutációt hordozó betegeknek a *JAK2* V617F pozitív betegekhez képest alacsonyabb a hemoglobinszintjük, magasabb a vérlemezkeszámuk, és izolált megakaryocita proliferáció jellemző a csontvelő szövettani vizsgálatokor. Az ET-ben szenvedők csoportjában szintén a *JAK2* V617F

pozitív esetekhez viszonyítva az *MPL* mutáció a magasabb vérlemezkeshszám mellett csökkent csontvelő cellularitást és csökkent erythropoesist eredményez [62]. A szövődmények (trombózis, vérzés, myelofibrotikus és leukémiás transzformáció) és a kimenetel tekintetében nincs jelentős különbség az *MPL* és *JAK2* V617F pozitív MPN betegek között sem ET, sem PMF esetén [36, 62]. Bár a W515K mutáns allél aránya általában magasabb, mint a W515L mutációé, ez nem befolyásolja szignifikánsan a betegek klinikai és laboratóriumi mutatóit [36, 47]. A homozigóta esetekben azonban a megfigyelések szerint gyakrabban fordul elő csontvelői fibrosis [62].

1.4.1.5 Egyéb addicionális mutációk

A *JAK2*, *MPL*, és *CALR* mutációk együttesen véve az MPN betegségek jelentős hányadában kimutathatók: PV-ben 99%-ban, ET-ben és PMF-ben 85%-ban meghatározható a betegséget okozó genetikai marker [62]. A JAK-STAT útvonalat aktiváló onkogén mutációkhoz azonban társulhatnak egyéb génmutációk is. Az addicionális genetikai eltérések leggyakrabban epigenetikai módosításért (pl. 2. típusú ten-eleven transzlokációs gén: *TET2*, 1. és 2. típusú izocitrát dehidrogenáz: *IDH1* és 2, additional sex combs-like 1: *ASXL1*, enhancer of zeste homologue 2: *EZH2*), mRNS érésért felelős (pl. serine/arginine-rich splicing factor: *SRSF2*), illetve tumor szupresszor (pl. tumor protein p53: *TP53*) géneket érintenek [36, 37]. Ezek a mutációk önmagukban nem vezetnek az MPN-re jellemző klinikai eltérések (PV, ET, PMF) kialakuláshoz, és gyakran más myeloid klonális betegségekben (pl. MDS vagy AML) vagy időskori klonális hematopoesisben is előfordulnak [63, 64]. Az addicionális mutációk az MPN-re jellemző onkogén mutáció kialakulását megelőzően és követően is kialakulhatnak. Az érintett génektől, a mutációk számától és keletkezési sorrendjétől függően az addicionális mutációk jelezhetik a betegség előrehaladottabb állapotát. Kimutatásuk nem diagnosztikus, hanem prognosztikai jelentőségű MPN-ben [36, 37].

1.4.1.6 Tripla negatív MPN

A *JAK2* V617F, a *CALR* és az *MPL* mutációkra negatív ET és PMF képezi a tripla negatív MPN csoportot. Az esetek háttérében állhatnak más JAK/STAT jelátviteli útvonalat érintő gének mutációi. Ilyen a *JAK2* foszforiláció egyik gátló fehérjéjét, a lymphocita specifikus adaptor proteint (LNK) kódoló gén, melynek mutációit *JAK2* V617F negatív ET, PMF és PV esetekben azonosították [65-67]. Az is elképzelhető,

hogy ritkán a *JAK2*, a *CALR* vagy az *MPL* gének mutációi a vizsgált szakaszokon kívül esnek. A tripla negatív betegek 10%-ában például az *MPL* gén 10. exonján kívüli régiókban is található genetikai eltérések (pl. S204P, Y591N), ezenfelül tripla negatív ET-ben a *JAK2* gén V625F és F556V aktiváló mutációit is kimutatták [68, 69]. Lehetséges továbbá, hogy a mutáns allél aránya az alkalmazott módszer kimutatási határa alatt van. Bizonyos esetekben pedig előfordulhat, hogy a poliklonális hematopoiesis elkülönítése a klinikai kép alapján nem lehetséges, és nem MPN áll a beteg erythrocytosisának, thrombocytosisának vagy myelofibrosisának a hátterében. A klinikai jellemzőket tekintve a tripla negatív ET fiatalabb korban kerül diagnózisra, és alacsonyabb hemoglobin és fehérvérsejtszám jellemzi. Ezeknél a betegeknél alacsonyabb a trombózis kockázata, a túlélésük a *JAK2* V617F és/vagy *CALR* mutáció pozitív esetekéhez hasonló. Tripla negatív PMF-ben a betegek hemoglobin szintje alacsonyabb, és kedvezőtlenebb kimenetelre számíthatnak [35].

1.4.2 Örökletes genetikai eltérések

Ugyanazon mutációk (*JAK2* V617F, *CALR*, *MPL*) jelenléte különböző MPN betegségekben felveti annak lehetőségét, hogy az MPN patomechanizmusában egyéb genetikai tényezők is szerepet játszhatnak. Nemcsak szerzett, hanem öröklött eltérések is befolyásolhatják az MPN fenotípusát, hajlamosító- illetve védőfaktorok lehetnek.

1.4.2.1 *JAK2* rs12343867 polimorfizmus

A veleszületett *JAK2* 46/1-es haplotípust 2009-ben azonosították. A 280 kilobázis kiterjedésű haplotípus magában foglalja a *JAK2*, az *INSL4* és az *INSL6* (4., ill. 6. típusú, inzulin-szerű) géneket, amelyek közül hematopoetikus sejtekben csak a *JAK2* gén expresszálódik [70]. A 9. kromoszómán egymáshoz közel található genetikai markerek, például az rs12343867, rs12340895, rs3780374, rs4495487 és rs10974944 egy pontos nukleotid-polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism), azaz SNP-k mindegyike a *JAK2* 46/1 haplotípussal kapcsolatosan öröklődik, és MPN kialakulására hajlamosít. Egy adott betegséggel összefüggésben álló haplotípus SNP kombinációja befolyásolhatja a gének expresszióját, az általuk kódolt fehérjék szekvenciáját, valamint növelheti a szerzett mutációk előfordulási esélyét [39]. Az irodalomban leírtak szerint a 46/1-es haplotípust hordozók körében magasabb a *JAK2* V617F mutáció kialakulási valószínűsége [39, 71]. A *JAK2* V617F pozitív MPN betegcsoportban a 46/1 haplotípus

gyakorisága kétszeres értéket mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva [71]. A 46/1 haplotípusra nézve heterozigóta MPN betegek 85%-ában a *JAK2* V617F mutáció a 46/1 haplotípust hordozó allélon alakult ki [39]. További kutatások kimutatták, hogy a 46/1-es haplotípus a *JAK2* V617F negatív MPN örökletes rizikófaktora is [70]. Kutatócsoportunk korábban emelkedett hordozógyakoriságot talált normál kariotípusú (NK) AML-ben is [72]. Bár az irodalomban leírt legtöbb tanulmány nem talált összefüggést a 46/1-es haplotípus és a hematológiai, klinikai paraméterek között, Tefferi és munkatársai eredményei szerint PMF-ben a *JAK2* 46/1 haplotípusra nullizigóta betegek túlélési esélyei jobbak a *JAK2* V617F mutáció jelenlététől függetlenül [73].

1.4.2.2 *TERT* rs2736100 polimorfizmus

Az elmúlt években a genomi léptékű asszociációs vizsgálatok (GWAS: genome-wide association studies) kimutatták, hogy a *TERT* gén 5p15.33-as lókusza számos tumorrall kapcsolatba hozható [74]. A *TERT* gén a telomeráz enzim katalitikus alegységét kódolja, amely elengedhetetlen a kromoszómák végén található ismétlődő DNS szekvenciák, a telomerek hosszának fenntartásához. A lánchosszabbításhoz az enzim részét képező, *TERC* gén által kódolt RNS alegység szolgál templátként. A rövid és diszfunkcionális telomerek korlátozzák a normál őssejt proliferációt, és genom instabilitáshoz vezetnek, aminek hatására mind a hematológiai malignitások, mind a szolid tumorok kialakulásának kockázata nő [75, 76]. Daganatos elváltozásokban rendszerint megfigyelhető a telomeráz enzim emelkedett aktivitása, amely kontrollálatlan sejtosztódást eredményez. A *TERT* gén második intronjában található rs2736100_C variánst hajlamosító faktorként tartják számon több különböző daganatos megbetegedésben (pl. tüdő, hólyag tumorok) [77], 2014-ben pedig sporadikus és családi halmozódású MPN megnövekedett kockázatával is összefüggésbe hozták [38, 78, 79]. Az rs2736100_C allél növelheti a *TERT* transzkripcióját, az emelkedett expressziós szint pedig hozzájárulhat az MPN kialakulásának kockázatához.

2 Célkitűzések

Munkánk célja szerzett és örökletes genetikai tényezők, és azok hatásának tanulmányozása volt *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN betegek körében:

- 1) Módszerek beállítása a szerzett onkogén mutációk (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) meghatározásához, kombinált molekuláris genetikai módszeregyüttes alkalmazása.
- 2) A szerzett mutációk azonosítása, és a gyakoriságuk meghatározása egy nagy, hazai MPN betegcsoporton. Összefüggések keresése az onkogén mutációk és az MPN klinikai paraméterei között (életkor, nem, laboratóriumi adatok, lépmegnagyobbodás, trombózis, myelofibrotikus ill. akut leukémiás transzformáció). A mutációk fenotípust, kimenetelt befolyásoló hatásának és prognosztikai szerepének tanulmányozása túlélési elemzések elvégzésével.
- 3) A *JAK2* V617F vagy a *CALR* mutációk relatív mennyiségének összehasonlítása, klinikai paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálata. A *CALR* mutációt hordozó betegek klinikai jellemzőinek elemzése a mutáció típusa szerint.
- 4) A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* 46/1-es haplotípussal kapcsoltan öröklődő *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok allélfrekvenciájának meghatározása (kontroll csoporthoz viszonyítva), illetve a variánsok hajlamosító szerepének vizsgálata nemcsak MPN, de CML és AML betegségben szenvedőknél is.
- 5) A *TERT* polimorfizmus hatásának tanulmányozása az MPN megjelenését, tüneteit és a különböző komplikációk gyakoriságát (lépmegnagyobbodás, vénás és artériás trombózis, vérzés, myelofibrotikus vagy leukémiás transzformáció, egyéb szolid tumorok kialakulása) illetően. Különböző *TERT* genotípusú MPN betegek túlélési esélyeinek elemzése diagnózis szerint lebontva.
- 6) A *TERT* és a *JAK2* hajlamosító allélok együttes hatásának vizsgálata az MPN kialakulásának kockázata szempontjából.

3 Módszerek

3.1 Vizsgált egyének

3.1.1 *BCR-ABL1* negatív MPN

Tanulmányunkban 1974 és 2013 között diagnosztizált, *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN-ben (PV, ET, PMF) szenvedő betegeknél vizsgáltuk a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk előfordulását.

A betegek 2008. évi WHO kritériumoknak megfelelő diagnózisa és követése az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályán történt. ET esetén a diagnózis felállításának 2008-as fő kritériumai: a tartósan fennálló magas thrombocyta szám (≥ 450 G/L), a csontvelő vizsgálat, egyéb MPN kizárása, és a betegségre jellemző genetikai eltérések kimutatása, ezek hiányában pedig a reaktív thrombocytosis kizárása [9]. A 2016. évi WHO kritériumrendszer ehhez képest nem jelent jelentős változást: a driver mutációk közé bekerült a *CALR* mutáció [2]. PV-ben a típusos vérképen kívül (Hb $>18,5$ g/dL férfiaknál, 16,5 g/dL nőknél) elengedhetetlen a megbetegedések közel 95%-ában jelen lévő klonális genetikai eltérések kimutatása, míg a minor kritériumok között szerepel a csontvelő biopszia és az alacsony EPO szint [9]. (A 2016. évi WHO ajánlásban a fentiekhez képest csökkent a hemoglobin határérték, valamint a fő kritériumok közé sorolták a csontvelő hisztológiát [2].) A 2008. évi WHO kritériumok szerint PMF-ben is kulcsfontosságú a csontvelő vizsgálat, a betegség egyéb MPN kórképektől való elkülönítése, a PMF-re jellemző mutációk kimutatása, ezek hiányában pedig a csontvelői fibrosis másodlagos okainak kizárása. A minor kritériumok körébe pedig a leukoerythroblastosis, az emelkedett szérum LDH szint, az anémia és a tapintható lépmeagnagyobbodás tartozik [9]. A 2016-ban megjelent WHO PMF kritérium ajánlás már elkülöníti a betegség prefibrotikus és fibrotikus szakaszát, amelyek között főként a csontvelő vizsgálat tesz különbséget. A leukocytosis (>11 G/L) bekerült a minor követelmények közé, valamint a leukoerythroblastosis csak a fibrotikus PMF esetén kritérium. A *CALR* gént érintő eltérések pedig már a driver mutációk között szerepelnek [2].

A 949 főből álló betegcsoportunkból 353 beteg PV-ben (190 férfi, 163 nő; átlagéletkor diagnóziskor: 61 ± 13 év), 469 beteg ET-ben (156 férfi, 313 nő; életkor 58 ± 17 év) és 127 beteg PMF-ben (58 férfi, 69 nő; életkor 62 ± 15 év) szenvedett. A

laboratóriumi paramétereket (hemoglobin, fehérvérsejt- és vérlemezkeszámokat) és a klinikai adatokat (splenomegalia) a kezelőorvosok segítségével retrospektíven gyűjtöttük. Nyomon követtük a myelofibrotikus vagy leukémiás transzformációkat, valamint rögzítettük a koagulációs komplikációk előfordulását. A véralvadási szövődményeket tekintve három csoportot vizsgáltunk: a vénás trombózisokat (mélyvénás trombózis, tüdőembólia, splanchnicus vénás vagy sinus sagittalis trombózis), az artériás trombózisokat (átmeneti ischaemiás roham, ischaemiás stroke, angina pectoris, szívinfarktus, vagy perifériás artériás vaszkuláris komplikációk), és a haemorrhagiás komplikációkat (gyomor-bélrendszeri vérzés, vérzéses stroke, vérvizelés, súlyos vérzés műtét vagy fogászati beavatkozás során). A *JAK2* és *CALR* mutációk mennyiségi meghatározását rutinszerűen csak 2014 óta végezzük laboratóriumunkban, ezáltal a mennyiségi adatok összehasonlítását csak egy szűkebb betegcsoporton (n=603) tudtuk elvégezni. A betegek egy részénél a mintavétel és a diagnózis megállapítása egy éven belül történt (n=159). Ezeket az eseteket egyes elemzéseknél külön csoportban kezeltük, mert legjobban ezek tükrözik a betegek diagnóziskori állapotát. A *BCR-ABL1* negatív MPN betegeknél a kóroki mutációk azonosításán túl (*JAK2* V617F, *JAK2* 12. exon, *CALR*, *MPL* mutációk) 584 esetben a *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok szerepét is megvizsgáltuk.

3.1.2 CML és AML

86 *BCR-ABL1* pozitív CML-ben (44 férfi, 42 nő; átlagéletkor diagnóziskor: 54 év, tartomány: 21-85 év) és 308 AML-ben (142 férfi, 166 nő, átlagéletkor diagnóziskor: 51 év, tartomány: 16-93 év) szenvedő betegtől gyűjtöttünk perifériás vér, illetve csontvelő mintákat. A betegeket az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályán kezelték. A klinikai adatokat retrospektíven gyűjtöttük. A CML-es betegek közül 77 volt korai krónikus fázisban, 6 akcelerált fázisban és 3 blasztos fázisban. Az AML-ben szenvedők közül 195 esetben a betegségnek nem volt előzménye a kórtörténetben (de novo AML), 93 betegnél az AML myelodysplasiát, míg 20 betegnél terápiát követően alakult ki. Az átlagos követési idő 5,8 év volt (tartomány: 0-39 év). A CML-ben és AML-ben szenvedő betegeknél a *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok szerepét vizsgáltuk.

3.1.3 Kontroll csoport

A *JAK2* V617F mennyiségi polimeráz láncreakció (QPCR) beállításához 30 egészséges csontvelő donor perifériás vérmintáját használtuk fel. A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok jelenlétét 400 egészséges személynél is megvizsgáltuk.

3.1.4 Etikai megfontolások

A vizsgálatok az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyével a kutatási tervnek megfelelően történtek (45108/2012/EKU/698/PI/12).

3.2 Nukleinsav izolálás

A szerzett mutációk és a veleszületett polimorfizmusok vizsgálatához a DNS kivonása Puregene Gentra DNS izoláló készlettel történt.

3.3 Citogenetikai vizsgálatok

Az ET-ben és a PMF-ben szenvedő betegeknél a 9-es és 22-es kromoszómák közötti reciprok transzlokáció következtében kialakuló Philadelphia kromoszóma, illetve *BCR-ABL1* fúziós gén jelenlétét citogenetikai módszerekkel is vizsgáltuk. A kariotipizálás során a kromoszómákon belüli átrendeződések kimutatása kromoszómafestéssel (G-sávozással) valamint fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálattal (FISH) történt, Vysis LSI *BCR/ABL* transzlokációs próbák felhasználásával. A kariotípus vizsgálatokkal egyéb prognosztikailag jelentős kromoszómaeltérések, CML esetén pl. számfeletti Ph, +8, i(17q); PMF esetén pedig 9-es triszómia, del(13q), +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- vagy 11q23 átrendeződések [19] kimutatása is lehetséges. A citogenetikai vizsgálatok az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályának Citogenetikai Laboratóriumában történtek.

3.4 A *JAK2* V617F mutáció kimutatása

3.4.1 Minőségi meghatározás

A *JAK2* V617F (c.1849G>T) pontmutáció jelenlétét allélspecifikus polimeráz láncreakcióval (AS-PCR) vizsgáltuk diagnózistól függetlenül az összes *BCR-ABL1* negatív MPN betegnél. A mutációk kimutatását korábbi, nemzetközi irodalomban ismertetett módszer alapján végeztük [28]. A PCR reakcióban keletkezett DNS fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el. A 3%-os agaróz gél etidium bromid tartalma UV fényben láthatóvá teszi a PCR termékeket. A módszer érzékenysége 1-5%. A dolgozatban a továbbiakban a mérési módszerek érzékenysége alatt a minimálisan kimutatható mutáns allél mennyiség értendő.

3.4.2 Mennyiségi meghatározás

Mennyiségi *JAK2* V617F vizsgálat a *JAK2* V617F pozitív (425/710) és negatív (59/239) betegek, valamint 30 egészséges csontvelő donor perifériás vérmintájából történt. A V617F allél mennyiségi meghatározására valós idejű PCR-t alkalmaztunk fluoreszcens TaqMan szondával LightCycler 480II (LC 480) készüléken. A mutációt tartalmazó génszakasz amplifikálásához a reakcióelegy LC 480 Probes Master-t (katalógus szám: 04707494001), genomiális DNS templátot (200 ng), forward primert, vad típusú vagy mutáns reverz primert, valamint egy fluoreszcensen jelölt próbát tartalmazott. A LC 480 Probes Master kétszeres koncentrációban tartalmazott DNS polimerázt, puffert, dNTP-t (deoxiribózt tartalmazó nukleotid trifoszfátot) és $MgCl_2$ -t. A primerek és a próba megegyezett az irodalomban leírt oligonukleotidokkal [80], a primerek koncentrációja 0,5 μM , a próbáé pedig 0,33 μM volt. A *JAK2* V617F mutáns (MUT) és normál (vad típusú, wild type: WT) allélokat külön reakcióban sokszoroztuk fel. Mindkettő esetében 10 perc 95°C-os denaturációt követően a PCR 50 ciklust tartalmazott (95°C 15 mp, 60°C 60 mp). A fluoreszcens jel, amelyet a PCR során valós időben detektáltunk, egyenesen arányos a keletkező DNS mennyiségével. A kezdeti szakaszban a kibocsátott fluoreszcencia a háttér fluoreszcenciától nem különül el. Ezt követően a fluoreszcencia exponenciálisan megemelkedik, végül eléri a plató fázist, ahol a fluoreszcens jel már nem erősödik tovább. Azt a ciklust, ahol a minta fluoreszcencia értéke a háttérfluoreszcenciához képest élesen megemelkedik (azaz „elindul” az amplifikáció) crossing pointnak (Cp) nevezzük. A kiértékelés során a delta

Cp (ΔC_p) módszert alkalmaztuk, ami a Cp értékek közvetlen összehasonlításán alapul. A normál allél Cp értékéből kivontuk a mutáns allél Cp értékét ($\Delta C_p = C_p^{wt} - C_p^{mut}$). Alkalmaztuk azt az összefüggést, miszerint a Cp különbség növekedésével a kezdeti templát szekvencia különbség exponenciálisan nő ($MUT/WT = 2^{\Delta C_p}$). Kiszámoltuk a mutáns/normál ($JAK2^{mut} / JAK2^{wt}$) allél arányát, majd a mutáns allél arányát a teljes *JAK2* allél arányához viszonyítottuk [$JAK2^{mut} / (JAK2^{mut} + JAK2^{wt})$]. A mennyiségi *JAK2* V617F meghatározás a minőségihez képest érzékenyebb, 0,1% $JAK2^{mut}/JAK2^{teljes}$ érték felett megbízhatóan jelzi a mutáció jelenlétét.

3.5 A *JAK2* 12. exon mutációk kimutatása

A *JAK2* gén 12. exonjában az 536-547. kodonokat érintő mutációkat a *JAK2* V617F negatív PV betegeknél vizsgáltuk fragmens analízissel, ami a deléciós és az inszerciós mutációk mellett a leggyakrabban előforduló K539L pontmutáció kimutatására is alkalmas [81]. A fragmens analízist megelőzően a PCR reakcióelegy PCR master mixet (Promega, katalógus szám: M7505), genomiális DNS templátot (100 ng), forward primert, K539L mutációra specifikus forward primert, és egy közös reverz primert tartalmazott. A felhasznált forward primerek nukleotid sorrendje megegyezik az irodalomban leírtakkal [81], azonban nem tartalmaznak fluoreszcens jelölést. A reverz primer nukleotid sorrendje 2 bázissal hosszabb, és fluoreszcensen jelölt: 5'-(6FAM)-ATTCCAATGTCACATGAATGTAAATC-3'. Mindhárom primert 0,25 μ M koncentrációban alkalmaztuk. A 35 ciklusos (95°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 60 mp) PCR-t követően a különböző méretű DNS fragmentumokat ABI 310 Genetikai Analizátoron kapilláris elektroforézissel választottuk el. A módszer érzékenysége 1-5%.

A *JAK2* 12. exon mutációra pozitív eseteket szekvenálással is megerősítettük 20%-nál nagyobb mennyiségben jelen levő mutációk esetén. A DNS fragmentumok oligonukleotid sorrendjét didezoxi nukleotidokat tartalmazó láncterminációs módszerrel (Sanger-féle szekvenálással) határoztuk meg. A DNS szakaszok felsokszorozásához az irodalomban közölt forward primert [81] és egy saját tervezésű reverz primert (5'-AACACAAGGTTGGCATATTTTC-3') használtunk. A szekvenáló reakciót BigDye 3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. Az elválasztás kapilláris elektroforézissel történt ABI 310 Genetikai Analizátoron. A módszer érzékenysége 20-25%.

3.6 A *CALR* 9. exon mutációk kimutatása

A *JAK2* V617F negatív ET (n=181) és PMF (n=53) betegeknél a *CALR* gén 9. exonjában a deléció/inszerció mutációk jelenlétét fragmens analízissel vizsgáltuk [33]. A reakcióelegy PCR master mixet (Promega, katalógus szám: M7505), genomiális DNS-templátot, fluoreszcensen jelölt forward primert és reverz primert tartalmazott. Az irodalomban ismertetett primereket [33] 0,5 µM koncentrációban alkalmaztuk. A *CALR* mutáció szűrésére 35 ciklusos (95°C 30 mp, 55°C 30 mp, 72°C 30 mp) PCR-t használtunk, majd a különböző méretű DNS fragmentumokat CEQ 8000 Genetikai Analizátoron kapilláris elektroforézissel választottuk el. A PCR során a rövidebb fragmentek hatékonyabban amplifikálódnak, így azok mennyiségét túlbecsülhetjük. Ennek elkerülése céljából a *CALR* mutáció mennyiségi meghatározáshoz a PCR ciklusszámát 25-re csökkentettük. A *CALR* mutáció mennyiségét a kapott csúcsmagasságok arányából számoltuk: a *CALR* mutáns allél arányát a teljes *CALR* allél arányához viszonyítottuk [$CALR^{mut} / (CALR^{mut} + CALR^{wt})$]. A módszer érzékenysége 1-5%.

A *CALR* mutációra pozitív eseteknél a mutáció típusát szekvenálással határoztuk meg. A DNS szakaszok felsokszorozásához az irodalomban leírt primereket használtuk [33]. A szekvenáló reakciót BigDye 3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. Az elválasztás kapilláris elektroforézissel történt ABI 310 Genetikai Analizátoron. A módszer érzékenysége 20-25% (szekvenálás csak ennél nagyobb mennyiségű *CALR* mutáció jelenléte esetén történt).

3.7 Az *MPL* 10. exon mutációk kimutatása

Az *MPL* gén S505 és W515 kodonjait érintő mutációk jelenlétét a *JAK2* V617F és a *CALR* mutációkat nem hordozó ET és PMF betegeknél szűrtük nagy felbontású olvadási görbe analízissel (HRM: high resolution melting) LC 480 készüléken [82]. A reakcióelegy LC 480 HRM Master mixet (Roche 04 909 631 001), genomiális DNS templátot (100 ng), valamint a Boyd és munkatársai által leírt forward és reverz primereket tartalmazta 0,25 µM koncentrációban. A 45 ciklusos (95°C 15 mp, 60°C 15 mp, 72°C 25 mp) PCR-ben keletkező termékeket olvadáspont analízisnek vetettük alá. A LightCycler készülék a fluoreszcencia folyamatos mérése mellett fokozatosan emeli 40°C-ról a hőmérsékletet 95°C-ra. A fluoreszcencia a denaturáció során lecsökken. A

fluoreszcencia változását a hőmérséklet függvényében ábrázolva megkapjuk az olvadási görbéket. A termékben jelen levő mutáció olvadáspont csökkenést okoz, így a mutációt tartalmazó minták olvadási görbéje megváltozik. Bár az eltérő olvadási görbe alapján a mutáns genotípus megkülönböztethető a vad típustól, de ezzel a módszerrel a konkrét aminosav cserék meghatározása nem lehetséges. A módszer elméleti érzékenysége 5-10%, amely mutációnként változhat.

A mutációk pontos azonosítása céljából az olvadási görbe eltérést mutató mintákat szekvenálással vizsgáltuk tovább. A DNS szakaszok felsokszorozásához az irodalomban leírt primereket használtuk [83]. A szekvenáló reakciót BigDye 3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. Az elválasztás kapilláris elektroforézissel történt ABI 310 Genetikai Analizátoron. A módszer érzékenysége 20-25%.

Az olyan mintákat, amelyek HRM módszerrel pozitív, szekvenálással pedig negatív eredményt mutattak, tovább vizsgáltuk minden mutációra (S505N, W515L, W515K, W515R, W515A) külön-külön allélspecifikus PCR-rel [83]. A reakcióelegy PCR master mixet (2x Promega, katalógus szám: M7505), genomiális DNS-templátot (100 ng), kontroll forward primert, W515 vagy S505 mutációra specifikus forward primert és egy közös reverz primert tartalmazott. A primereket 0,5 μ M koncentrációban alkalmaztuk, kivéve a kontroll forward primert, ami a reakcióelegyben 0,125 μ M koncentrációban volt jelen. A kontroll forward primer, a reverz primer, a W515L és W515K mutációkra specifikus forward primerek megegyeztek az irodalomban leírt oligonukleotidokkal [83], míg a W515R, W515A és S505N mutációkhoz tartozó forward primerek saját tervezésűek voltak (W515R: 5'-TGGGCCTGCTGCTGCTGAGTC-3'; W515A: 5'-GGGCCTGCTGCTGCTGAGGGC-3'; S505N: 5'-GCATCTAGTGCTGGGCCTCCA-3'). A W515L, W515R és W515A mutációk kimutatásához 35 ciklusos, 66°C anellációs hőmérsékletű PCR-t (95°C 30 mp, 66°C 40 mp, 72°C 60 mp), S505N esetén szintén 35 ciklusos, de 62°C anellációs hőmérsékletű PCR-t (95°C 30 mp, 62°C 40 mp, 72°C 60 mp) alkalmaztunk. A W515K mutációkat 42 ciklusos touchdown PCR-rel vizsgáltuk, ahol meghatározott ciklusonként az anellációs hőmérsékletet 70°C-ról fokenként 65°C-ra csökkentettük (3 ciklus: 95°C 30 mp, 70°C 30 mp, 72°C 45 mp; 3 ciklus: 69°C 30 mp; 3 ciklus: 68°C 30 mp; 3 ciklus: 67°C 30 mp; 15 ciklus: 66°C 30 mp; 15 ciklus: 65°C 30 mp). A PCR reakciókban

keletkezett DNS fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el. A 3%-os agaróz gél etidium bromid tartalma UV fényben láthatóvá teszi a PCR termékeket. A módszer érzékenysége 1-5%.

3.8 SNP vizsgálatok

3.8.1 A *JAK2* rs12343867_C polimorfizmus vizsgálata

A *JAK2* 46/1 haplotípussal kapcsoltan öröklődő, a *JAK2* gén 14. intronjában elhelyezkedő rs12343867_C polimorfizmust (NT_008413.17: g.5064189T>C) PCR-t követő olvadási görbe analízissel vizsgáltuk LC 480 készüléken, a korábban leírtak alapján [72, 84].

3.8.2 A *TERT* rs2736100_C polimorfizmus vizsgálata

A *TERT* rs2736100_C polimorfizmust LC 480 készüléken vizsgáltuk valós idejű PCR-rel, majd olvadási görbe analízist végeztünk. A reakcióelegy PCR master mixet (MyTaq, katalógus szám: MTX-313211), genomiális DNS-templátot, 0,45 µM koncentrációban forward primert (5'-GCTAAGCATTATTAATATTGTTTTCCGT-3'), 0,14 µM koncentrációban reverz primert (5'-GCAATAACAAGACAGAAGAACC-3') és 0,23 µM koncentrációban két fluoreszcensen jelölt hibridizációs szondát (anchort: 5' - AAGGAGGAAAAGCAGGGCG-Fluorescein-3' és sensor: 5'-Cy5-GGCAAAGCTACAGAAAC-Phosphate-3') tartalmazott. Az amplifikációs primerek és a hibridizációs szondák tervezése a LightCycler Probe Design szoftverrel (Roche Diagnostics) történt. A két hibridizációs szonda közül a sensor a szekvencia variábilis (polimorfizmust tartalmazó) részére illeszkedik. A sensorhoz képest az anchornak jóval magasabb az olvadási hőmérséklete, így az olvadáspon analízis kizárólag a sensortól függ. A 60 ciklusos (95°C 20 mp, 55°C 30 mp, 72°C 45 mp) PCR-ben keletkező termékek olvadási görbe analízise során a készülék a hőmérsékletet fokozatosan emelte 35°C-ról 85°C-ra folyamatos fluoreszcencia mérés mellett. Bázis eltérés esetén az polimorfizmusra illeszkedő szonda olvadáspon csökkenést okoz, amelynek segítségével az rs2736100 allél genotípusa meghatározható.

3.9 Statisztikai feldolgozás

A klinikai jellemzőket, az egyes mutációk és a szövődmény gyakoriságok (dichotóm változók) összehasonlítását chí-négyzet próbával és Fischer-egzakt teszttel, míg a mennyiségi mutáció meghatározás eredményeit, valamint a hematológiai paramétereket (folyamatos változókat) Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis tesztekkel hasonlítottuk össze az egyes MPN alcsoportokban. Folyamatos változók esetén a mediánt (középértéket) valamint a 25%-os és 75%-os percentiliseket adtuk meg. A különböző alcsoportokban az összesített túlélést (a diagnózistól a beteg haláláig vagy az utolsó megfigyelési időpontig eltelt idő, overall survival, OS) log-rank teszttel hasonlítottuk össze. A túlélési elemzések esetén a paraméterek közötti összefüggéseket Cox regresszióval vizsgáltuk (multivariancia analízis). Kiszámoltuk a kockázati arányokat (HR: hazard ratio értékeket) 95%-os konfidencia intervallummal (CI). A statisztikai elemzéseket az SPSS 20.0 verziójú szoftverével végeztük. Az eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén szignifikánsnak tekintettük.

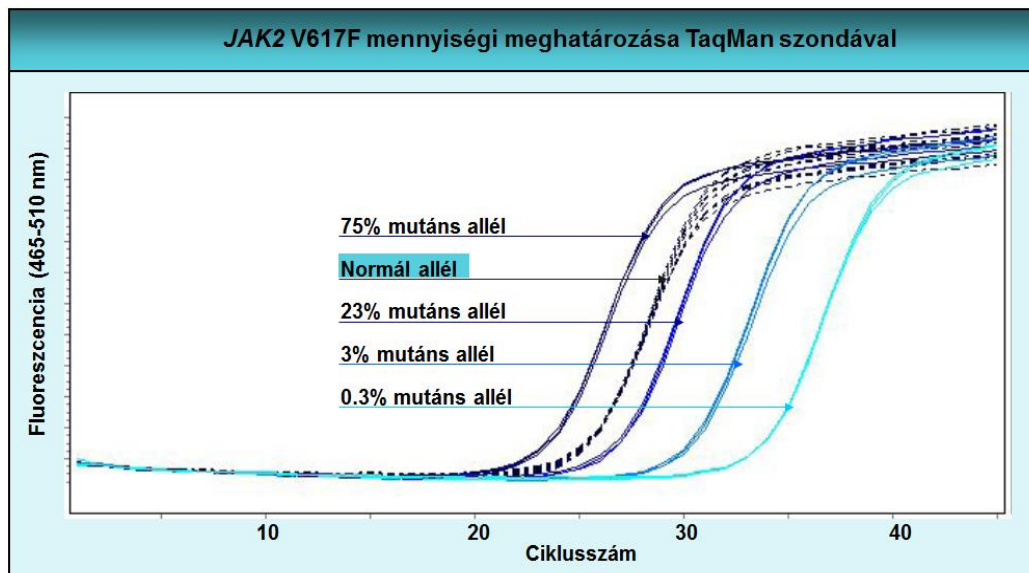
A *TERT* rs2736100_C és *JAK2* rs12343867_C polimorfizmusok esetén az allél-frekvenciákat (AF) 95%-os konfidencia intervallummal adtuk meg ($AF \pm 95\%CI$). A különböző *TERT* és *JAK2* genotípusú betegek között az MPN vagy AML kialakulásának esélyhányadosát (odds ratio, OR) és a 95%-os konfidencia intervallumot ($OR \pm 95\%CI$) logisztikus regresszióval határoztuk meg. A *TERT* és *JAK2* polimorfizmusok, mint kockázati tényezők esetleges szerepét a betegség kialakulásában a PAF (Population Attributable Fraction) hányadossal jellemeztük [85, 86]. A genotípusok várható eloszlását, vagyis a Hardy-Weinberg egyensúly (HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium) vizsgálatát chí-négyzet próbával végeztük el.

4 Eredmények

4.1 A laboratóriumi módszerek beállítása

4.1.1 A JAK2 V617F mutáció mennyiségi meghatározása

A JAK2 V617F pontmutáció kimutatására az 1-5% érzékenységgű és könnyen kivitelezhető AS-PCR alapú kimutatási technikát alkalmaztuk, azonban ez a módszer alacsony mutáció mennyiség esetében nehezen reprodukálható. Mivel a mutáció 1-3%-os mennyiségben is kóroki szerepet tölthet be [87], 2014-től laboratóriumunkban a megbízható érzékenységgel rendelkező mennyiségi AS-PCR került bevezetésre. Tanulmányunkban a JAK2 V617F mennyiségi meghatározására valós idejű PCR-t alkalmaztunk TaqMan szondával LC 480 készüléken (ld. Módszerek fejezet). A QPCR segítségével információt kaphatunk az MPN „tumor-tömegéről”, és három nagyságrend (0,1-100%) tartományban monitorozhatjuk a terápia hatékonyságát. Az 6. ábrán a mutáns (kék folyamatos vonal) és normál (fekete szaggatott vonal) amplifikációs görbék láthatók. Az amplifikáció indulására jellemző ciklusszámok a mutáns allél mennyiségétől függően eltérnek.

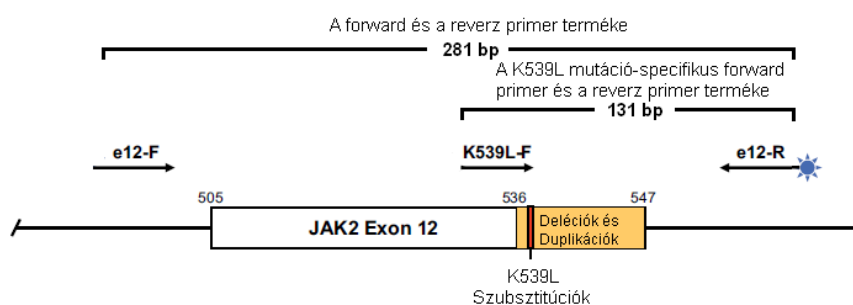


6. ábra A JAK2 V617F pontmutáció mennyiségi meghatározása valós idejű PCR és TaqMan szonda alkalmazásával (MPN&MPNr-EuroNet referencia anyag, engedéllyel).

A normál allélhoz viszonyítva alacsonyabb ciklusszámot kapunk 50%-nál magasabb mutáns allélt tartalmazó minták esetén, míg a kevesebb mutáns allél jelenléte magasabb ciklusszámot eredményez. A V617F mutáns allél relatív mennyiségét a mutáns és normál amplifikációs görbéken a crossing point-ok összevetéséből nyertük a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően.

4.1.2 A *JAK2* gén 12. exonjában található mutációk kimutatása

A *JAK2* gén 12. exonjában található mutációk kimutatására laboratóriumunkban 2014 óta van lehetőség: az 536-547. kodonokat érintő mutációk vizsgálatára fragmens analízist vezettünk be Furtado és munkatársai nyomán. Ezzel a módszerrel nemcsak a deléciós és az inszerciós mutációk, hanem a leggyakrabban előforduló K539L pontmutáció is kimutatható [81]. A költséghatékonyság érdekében a fragmens analízishez felhasznált primereket és a fluoreszcens jelöléseket kis mértékben módosítottuk az irodalomban leírtakhoz képest (7. ábra).



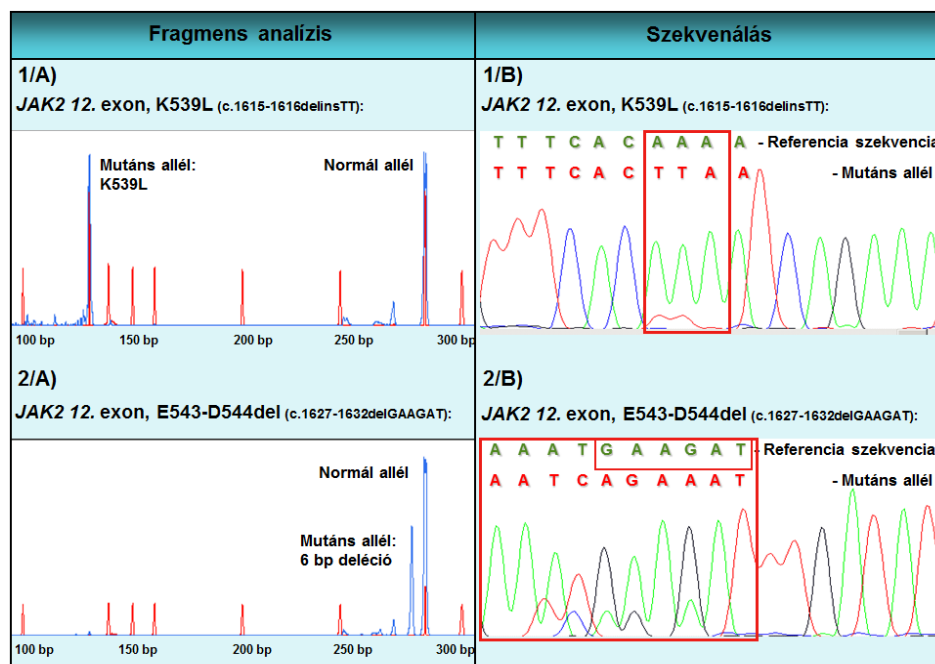
7. ábra A *JAK2* gén 12. exonjában található mutációk fragmens analízissel történő kimutatásához felhasznált primerek. A forward primerek (e12-F és K539L-F) az irodalomban leírtakkal ellentétben [81] nem tartalmaznak fluoreszcens jelölést. A közös reverz primer (e12-R) azonban fluoreszcensen jelölt.

Rövidítések: bp: bázispár; e: exon; F: forward; *JAK2* exon 12: 2. típusú Janus kináz gén 12. exonja; R: reverz.

Mutáció jelenlétében a K539L mutációra specifikus forward primer és a reverz primer 131 bp méretű PCR terméket ad, normál szekvencia estében 131 bp-os szekvencia nem keletkezik. A forward primer és a reverz primer 281 bp-os normál allél hosszúságú PCR terméket ad. Deléció esetén 269-278 bp, míg duplikáció esetén

305-317 bp detektálási tartományokban várjuk a termékeket. A leggyakoribb mutációk a 6 bp-os deléciók vagy a 33 bp-os duplikációk.

A *JAK2* 12. exon mutációra pozitív eseteket szekvenálással is megerősítettük. A *JAK2* 12. exon mutációk fragmens analízissel („A” panelek) és szekvenálással („B” panelek) történő kimutatását a 8. ábra szemlélteti. Az olvasási kereteltolódással nem járó deléciós vagy inszerciós mutációk esetében a méretváltozásoknak megfelelő, valamint a K539L mutáció esetében az AS-PCR terméknek megfelelő, második PCR termék is megfigyelhető az elektroferogramon.

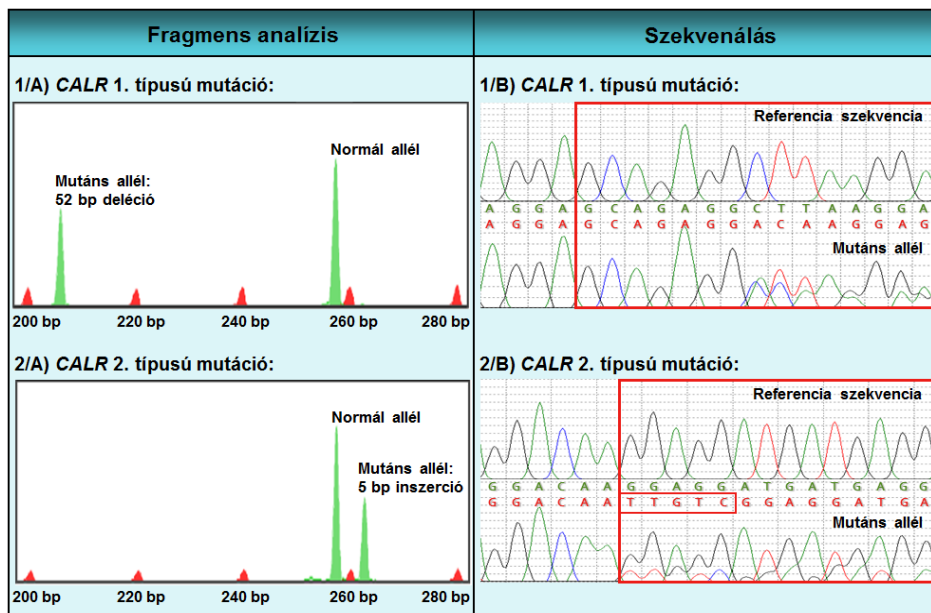


8. ábra A *JAK2* gén 12. exonjában található mutációk kimutatása fragmens analízissel („A” panelek) és szekvenálással („B” panelek). „1/A és 1/B” panelek: K539L pozitív minta (c.1615-1616delinsTT; gyakorisága 10-14%). „2/A és 2/B” panelek: 6 bázispár deléciójával (GAAGAT) járó *JAK2* 12. exon mutációra pozitív minta (c.1627-1632delGAAGAT; gyakorisága 10-14%). „A” panelek: A 281 bp-os normál allél mellett egy további 131 bp illetve 275 bp hosszúságú PCR termék is megfigyelhető. A méret markereket piros színnel jelöltük. A pozitív eredmények megerősítéseként a „B” panelek a szekvenálás során kapott fluoreszcens regisztrátumokat tartalmazzák: a mutáns allélokat a referencia szekvenciához viszonyítva.

Rövidítések: A: adenin; bp: bázispár; C: citozin; G: guanin; *JAK2* 12. exon: 2. típusú Janus kináz gén 12. exonja; T: timin

4.1.3 A *CALR* gén 9. exonjában található mutációk kimutatása

Az MPN fenotípusát és prognózisát is befolyásoló *CALR* gént érintő mutációk szűrését laboratóriumunkban 2014-ben vezettük be. A *CALR* mutációk többsége a PCR termék méretének változásával jár, ezért a legtöbb mutáció fragmens analízissel kimutatható. A PCR termékek méretének meghatározását a Klampfl és munkatársai által közölt módon végezzük [33]. A *CALR* mutációra pozitív eseteknél a mutáció típusát szekvenálással határozzuk meg. A leggyakrabban előforduló *CALR* mutációk 52 bázispár delécióval (1. típusú mutáció: L367fs*46), vagy 5 bázispár inszercióval (2. típusú mutáció, K385fs*47) járnak. Az 1. és 2. típusú mutációk fragmens analízissel („A” panelek) és szekvenálással („B” panelek) történő kimutatását a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra *Calreticulin (CALR)* mutációk kimutatása fragmens analízissel („A” panelek) és szekvenálással („B” panelek). „1/A és 1/B” panelek: 1. típusú, 52 bázispár (bp) deléciójával járó *CALR* pozitív minta (c.1092-1143del; p.L367fs*46; gyakorisága 50%). „2/A és 2/B” panelek: 2. típusú 5 bázispár inszerciójával (TTGTC) járó *CALR* pozitív minta (c.1154-1155insTTGTC; p.K385fs*47; gyakorisága 30%). „A” panelek: A 257 bp-os normál allél mellett egy további 205 illetve 262 bp hosszúságú PCR termék is megfigyelhető. A méret markerek piros színnel jelöltek. A pozitív eredmények megerősítéseként a „B” panelek a szekvenálás során kapott fluoreszcens

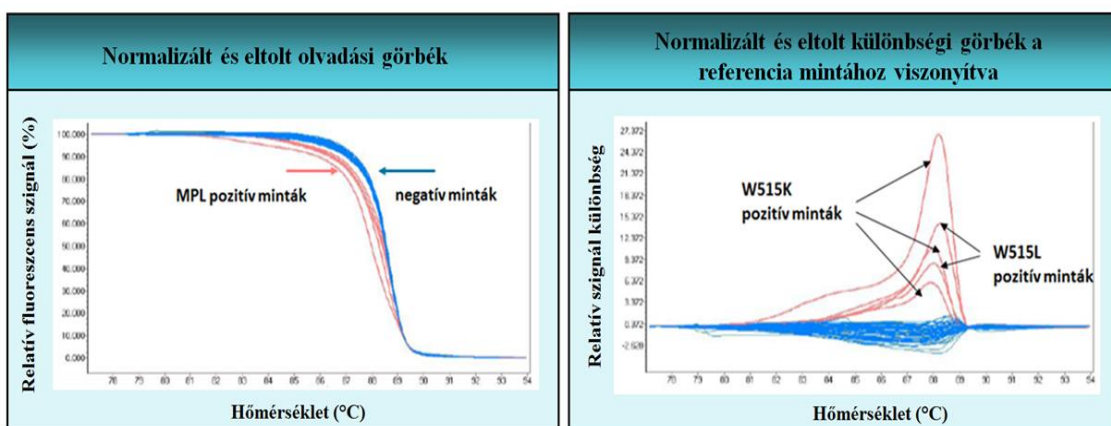
regisztrátumokat tartalmazzák: az 1. és 2. típusú mutáns allélt a referencia szekvenciához viszonyítva.

Rövidítések: A: adenin; bp: bázispár; C: citozin; CALR: calreticulin gén; G: guanin; T: timin

A végpont PCR-en alapuló fragmens analízis a *CALR* mutáció mennyiségi meghatározására is alkalmas szemi-kvantitatív eljárás. A *CALR* mutáció mennyiségét a kapott csúcsmagasságok arányából számoltuk a Módszerek fejezetben leírtak szerint.

4.1.4 Az *MPL* gén 10. exonjában található mutációk kimutatása

Az *MPL* gén 10. exonjában található mutációk leggyakrabban a W515 és S505 kodonokat érintik. A gyakori W515L és W515K aminosav cserék mellett ritkán W515A, W515R és W515S és egyéb mutációk is előfordulnak, a mutáció mennyiségét tekintve pedig alacsony (1-15%) és magas (>50%) értékeket egyaránt mérhetünk. Emiatt az *MPL* gént érintő mutációk kimutatására többféle laboratóriumi módszer alkalmazása szükséges. A szerzett *MPL* mutációk szűrését laboratóriumunkban nagy felbontású olvadási görbe analízissel végezzük. A HRM ritka eltérések kiszűrésére is alkalmas lehet. Ezzel a módszerrel 5-10%-nyi kóros allél kimutatása lehetséges, azonban a konkrét aminosav cserét nem tudjuk vele meghatározni. A normalizált és eltolat olvadási valamint különbségi görbéket az 10. ábra szemlélteti.

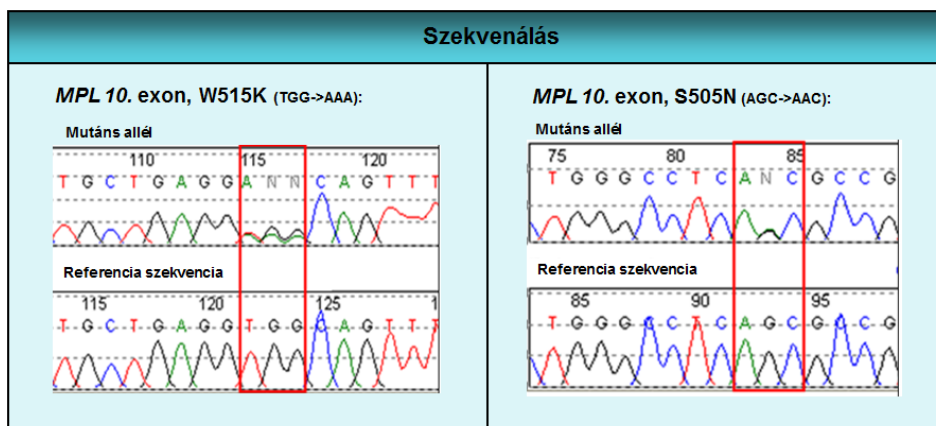


10. ábra A thrombopoetin receptor gén (*MPL*) mutációk kimutatása nagy felbontású olvadási görbe analízissel. „A” panel: az olvadáspont analízis során kapott pozitív és negatív minták normalizált és eltolat olvadási görbéi. „B” panel: Pozitív és negatív

minták normalizált és eltolt különbségi görbéi. A mutáns genotípus a vad típustól jól elkülöníthető, de a módszer nem alkalmas a konkrét aminosav cserék meghatározására, mivel a görbék lefutása a mutáció típusa mellett a mutáció mennyiségétől, a választott referencia mintától és az olvadási görbe analízis paramétereitől egyaránt függhet.

Rövidítések: MPL: thrombopoetin receptor gén.

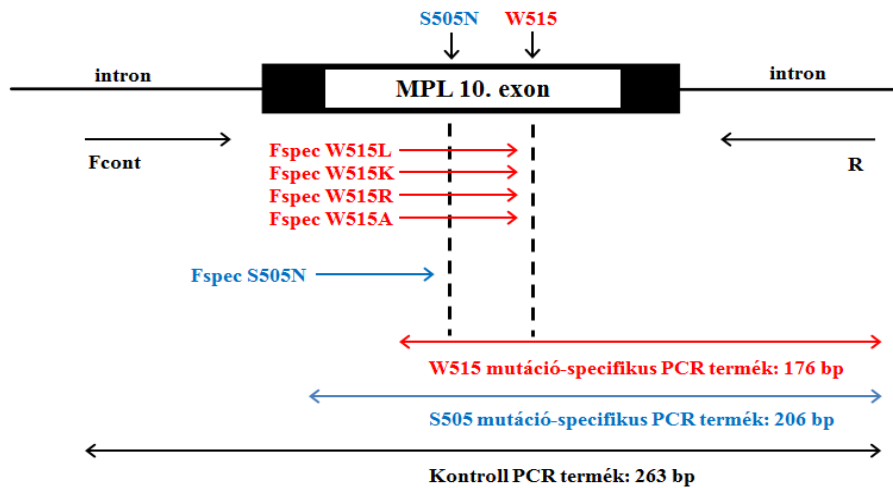
A HRM módszerrel pozitívnak bizonyuló esetek pontos nukleotid sorrendjének a megállapítása szekvenálással történt. A kapott fluoreszcens regisztrátumokat a 11. ábra tartalmazza.



11. ábra Az MPL gén szekvenálása során kapott fluoreszcens regisztrátumok: a mutáns allél a referencia szekvenciához viszonyítva.

Rövidítések: A: adenin; C: citozin; MPL 10. exon: a thrombopoetin receptor gén 10. exonja; G: guanin; T: timin

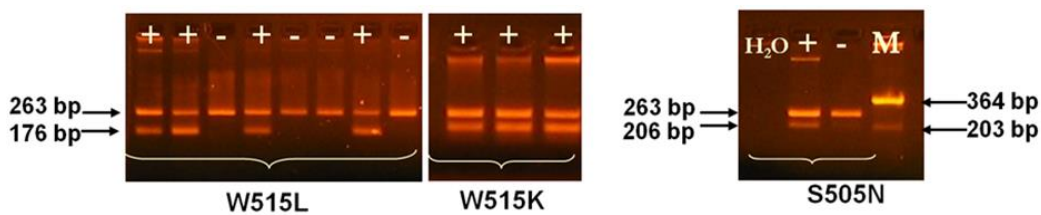
A HRM-mel pozitív, de a szekvenálás során negatívnak bizonyuló mintákat mutációnként külön AS-PCR-rel vizsgáljuk tovább. Bár az allélspecifikus PCR érzékenysége 1-5%, ezáltal a gyengén pozitív esetek megerősítésére is alkalmas, használhatóságának gátat szab, hogy csak a leggyakoribb *MPL* mutációkat tudjuk vele kimutatni. A PCR reakciókhoz felhasznált oligonukleotid primerek elhelyezkedését az *MPL* génen a 12. ábra mutatja be.



12. ábra Az MPL gén egy részletének szerkezete, és a PCR reakciókhoz felhasznált oligonukleotid primerek elhelyezkedésének sematikus ábrázolása. A mutációra specifikus forward primer és a reverz primer 206 bázispár (bp) hosszúságú terméket ad S505N mutáció és 176 bp hosszúságú terméket W515 mutáció jelenléte esetén. A kontroll forward primer és a reverz primer 263 bp hosszúságú PCR terméket eredményez, ami a reakció belső kontrolljaként szolgál.

Rövidítések: bp: bázispár; Fcont: kontroll forward primer; Fspec: mutáció specifikus forward primer; MPL 10. exon: a thrombopoetin receptor gén 10. exonja; R: közös reverz primer.

A bemutatott primerek és genomiális DNS minták felhasználásával végzett amplifikációs termékek gélelektroforetikus elemzésének képe a 13. ábrán látható.



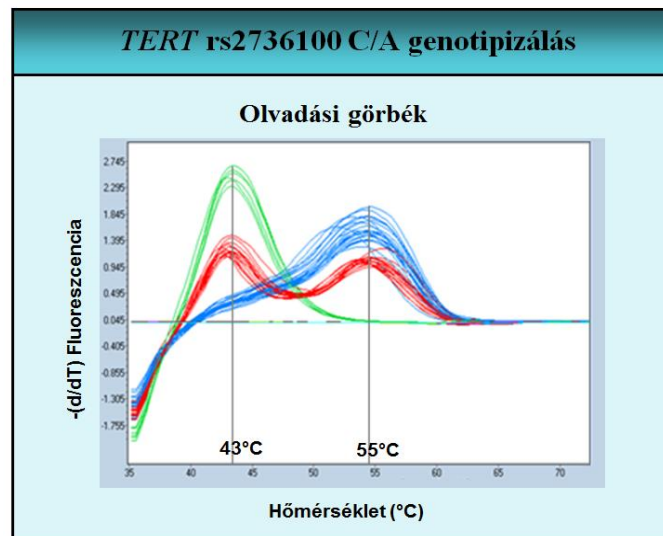
13. ábra Az MPL gén W515 és S505 kodonjait érintő aminosav cserékre tervezett allélspecifikus PCR-t követő agaróz gélelektroforézis. A 3%-os agaróz gél etidium bromid tartalma UV fényben láthatóvá teszi a PCR termékeket.

Rövidítések: bp: bázispár, M: marker

Amennyiben a HRM módszerrel pozitívnak bizonyuló mintákat sem szekvenálással, sem AS-PCR-rel nem sikerült megerősíteni, akkor azokat negatívnak tekintettük.

4.1.5 SNP vizsgálatok

A *JAK2* rs12343867_C polimorfizmus korábban bevezetett vizsgálati módszeréhez hasonlóan a *TERT* rs2736100_C polimorfizmus vizsgálatára is LightCycler alléldiszkriminációs, hibridizációs szondákat alkalmazó módszert vezettünk be. A PCR során saját tervezésű amplifikációs primereket és fluoreszcensen jelölt hibridizációs szondákat alkalmaztunk, majd olvadási görbe analízist végeztünk. Az LC 480 készüléken végzett mérést követően összehasonlítottuk a minták olvadási profilját, amelynek segítségével a genotipizálás elvégezhető. A különböző genotípusú minták olvadási görbéit a 14. ábra szemlélteti.



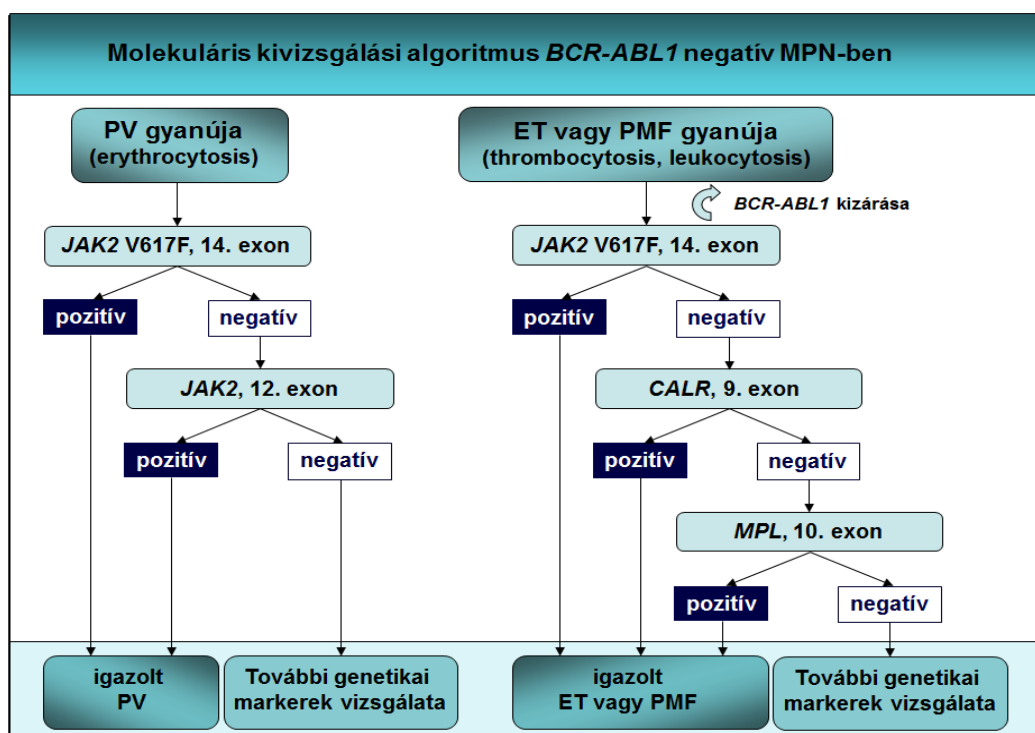
14. ábra A *TERT* rs2736100 polimorfizmus kimutatása. Normál allél esetén az olvadáspont 55°C; a polimorfizmusra illeszkedő szonda bázis eltérés esetén olvadáspont csökkenést okoz (43°C), amelynek segítségével az adott allél rs2736100 genotípusa meghatározható. A három genotípus egymástól jól elkülöníthető: zöld színnel a homozigóta CC, piros színnel a heterozigóta CA és kék színnel a homozigóta AA genotípusok olvadási görbéi láthatók.

Rövidítések: A: adenin; C: citozin; T: timin; *TERT* rs2736100: telomeráz reverz transzkriptáz gén polimorfizmusa.

4.2 Onkogén mutációk klasszikus MPN-ben

4.2.1 Molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus

Tanulmányunkban a *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN kórképek genetikai háttérében álló mutációk kimutatását szekvenciálisan végeztük, mivel az egyes szomatikus mutációk egy adott betegnél csak nagyon ritka esetekben fordulnak elő együtt. Az egyes mutációk vizsgálati sorrendjét az irodalomban leírt gyakorisági adatok alapján állítottuk fel. A molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus az 15. ábrán látható.

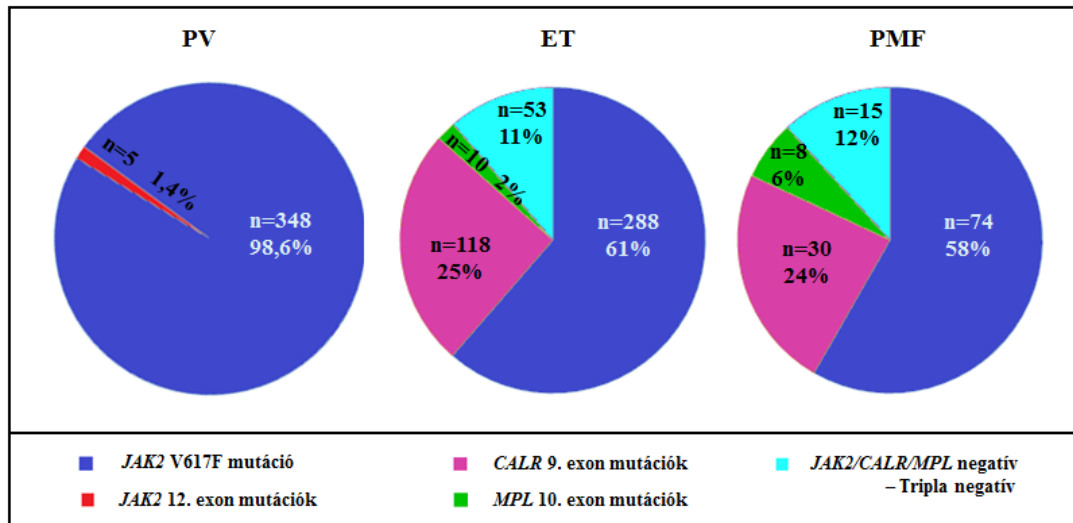


15. ábra Rutinszerű, molekuláris diagnosztikai vizsgálatok egymáshoz viszonyított folyamatábrája az irodalomban megállapított mutáció gyakoriságok alapján *BCR-ABL1* negatív, klasszikus myeloproliferatív neopláziákban.

Rövidítések: *BCR-ABL1*: breakpoint cluster region – Abelson1 fúziós gén; *CALR*: calreticulin gén; *ET*: esszenciális thrombocythaemia; *JAK2*: 2. típusú Janus kináz gén; *MPL*: thrombopoetin receptor gén; *MPN*: myeloproliferatív neopláziák; *PMF*: primer myelofibrosis; *PV*: polycythaemia vera; *V617F*: a *JAK2* gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra.

A vizsgálandó mutációk kiválasztása a klinikai diagnózis alapján történt. PV gyanúja esetén elsőként a *JAK2* V617F mutációt szűrjük, ami ebben a betegségben a genetikai eltérések több mint 95%-át adja. A *JAK2* gén 12. exon mutációi ritkán fordulnak elő, vizsgálatuk csak *JAK2* V617F hiányában és alacsony EPO szint, vagy PV-re utaló csontvelő szövettan esetén indokolt [88]. ET és PMF gyanújakor a molekuláris vizsgálatokat szintén a *JAK2* V617F mutációval kezdjük, és a negatív esetekben először a *CALR*, majd az *MPL* gént érintő változások szűrésével folytatjuk.

Az AS-PCR, a valós idejű PCR TaqMan szondával, a fragmens analízis, a nagy felbontású olvadási görbe analízis és a Sanger szekvenálás kombinációit alkalmazva 353 PV-ben, 469 ET-ben és 127 PMF-ben szenvedő betegnél kerestük az MPN hátterében álló onkogén mutációt. Minőségi, allélspecifikus multiplex PCR-rel a *JAK2* V617F mutáció PV-ben az esetek 98,6%-ában (348/353), ET-ben 61,4%-ában (288/469), MF-ben pedig 58,3%-ában (74/127) fordult elő. 5 PV-beteg (1,4%) esetében az alábbi *JAK2* 12. exon mutációkat azonosítottuk: F537-K539delinsL, K539L, I540-E543delinsMK, R541-E543delinsK, E543-D544del. A *JAK2* V617F mutáció negatív ET és PMF betegeknél a *CALR* gén olvasási keret eltolódásával járó deléciós és inszerciós mutációit vizsgáltuk. A leggyakrabban előforduló *CALR* mutációk 52 bázispár delécióval (1. típusú mutáció: L367fs*46), vagy 5 bázispár inszercióval (2. típusú mutáció, K385fs*47) járnak. A *CALR* mutáció gyakorisága ET-ben 25,2% (118/469), míg PMF-ben 23,6% (30/127) volt. A *JAK2* V617F és a *CALR* mutáció negatív ET, illetve PMF betegeknél az *MPL* gén mutációit vizsgáltuk. ET-ben 10 betegnél (2,1%, 10/469), PMF-ben pedig 8 betegnél (6,3%, 8/127) találtunk eltérést az *MPL* génben. Az ET-ben szenvedők 11%-a (n=53), míg a PMF betegek 12%-a (n=15) volt tripla negatív, náluk a *JAK2*, *CALR* vagy *MPL* mutációk egyikét sem tudtuk kimutatni. Az onkogén mutációk eloszlását MPN-ben a 16. ábrán látható kördiagramok szemléltetik.



16. ábra *JAK2, CALR és MPL mutációk gyakorisága PV-ben, ET-ben és PMF-ben.*

Rövidítések: *CALR*: calreticulin gén; *JAK2*: 2. típusú Janus kináz gén; *MPL*: thrombopoetin receptor gén; *n*: betegszám; *PMF*: primer myelofibrosis; *V617F*: a *JAK2* gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra.

4.2.2 A klinikai jellemzők összehasonlítása alcsoportonként

A klinikai jellemzők és az egyes onkogén mutációk jelenléte közötti összefüggéseket tanulmányozva megállapítottuk, hogy a *JAK2* V617F^{poz} PV betegekhez viszonyítva a 12. exon mutáció pozitív PV betegek fiatalabbak voltak diagnózisukor (medián életkor: 63 vs 40 év, $p=0,005$). Részletesebb klinikai adatok (hemoglobin, fehérvérsejt, és thrombocytá értékek valamint lépmeagnagyobbodással, vénás trombólissal, MF és AL transzformációval kapcsolatos információk) hiányában további összehasonlítás a PV csoportban nem volt lehetséges. A PV-ben szenvedőknél csak minőségi és mennyiségi *JAK2* V617F tesztek végeztünk, a *CALR* és *MPL* mutációk jelenlétét nem vizsgáltuk. A *JAK2*^{poz} PV csoportot összehasonlítva a *JAK2*^{poz} ET csoporttal azt tapasztaltuk, hogy a *JAK2*^{poz} ET betegek között több a nő ($p<0,001$), alacsonyabb a hemoglobin szintjük ($p<0,001$), magasabb a thrombocytaszámuk ($p<0,001$), kevesebbszer fordul elő lépmeagnagyobbodás ($p<0,001$), gyakrabban fordul elő vénás trombólis ($p=0,033$) és kisebb a myelofibrotikus transzformáció gyakorisága ($p=0,003$) (1. táblázat).

1. táblázat PV-ben és ET-ben szenvedő betegek klinikai és laboratóriumi adatai onkogén mutációkra lebontva.

	(A) PV (n=348)	(B) ET, <i>JAK2</i> ^{poz} (n=288)	P (A) vs (B)	(C) ET, <i>CALR</i> ^{poz} (n=118)	P (C) vs (B)	(D) ET, <i>MPL</i> ^{poz} (n=10)	(E) ET, tripla negatív (n=53)	P (E) vs (B)	P (E) vs (C)
Életkor: év (25-75 percentilis)	63 (52-71)	62 (51-72)	0,414	53 (38-70)	0,007	57 (46-77)	59 (40-66)	0,020	0,986
Férfi/nő (%/%)	187/161 (54%/46%)	88/200 (31%/69%)	<0,001	51/67 (43%/57%)	0,016	4/6 (40%/60%)	13/40 (25%/75%)	0,417	0,026
Hb: g/L (25-75 percentilis)	183 (172-199)	146 (134-156)	<0,001	134 (120-143)	<0,001	129 (115-139)	134 (122-145)	<0,001	0,787
WBC: G/L (25-75 percentilis)	11 (9-14)	11 (9-14)	0,793	10 (8-12)	0,002	10 (7-12)	9 (8-12)	0,006	0,606
Plt: G/L (25-75 percentilis)	460 (329-608)	781 (652-989)	<0,001	1022 (809-1310)	<0,001	968 (742-1286)	798 (600-970)	0,503	<0,001
Lépmegnagyobbodás n (%)	124/322 (39%)	59/258 (23%)	<0,001	21/95 (22%)	1,00	0/9 (0%)	12/45 (27%)	0,571	0,670
Vénás trombózis n (%)	34/301 (11%)	41/228 (18%)	0,033	6/92 (7%)	0,008	0/8 (0%)	3/39 (8%)	0,159	1,00
MF transzformáció n (%)	37/301 (12%)	11/227 (5%)	0,003	18/96 (19%)	<0,001	0/8 (0%)	2/40 (5%)	1,00	0,060
AL transzformáció n (%)	19/296 (6%)	6/226 (3%)	0,061	4/95 (4%)	0,490	1/8 (12,5%)	2/39 (5%)	0,334	1,00

Megjegyzés: Tripla negatívnak (E) azokat az ET betegeket neveztük, akik nem hordozták a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk egyikét sem. A klinikai (lépmegnagyobbodás) és a laboratóriumi adatok (életkor diagnóziskor, WBC, Hb, Plt) a betegek diagnóziskori állapotára vonatkoznak. A vénás trombózis, a myelofibrotikus és akut leukémiás transzformáció előfordulását a teljes követési idő alatt regisztráltuk. A 0,05 alatti p értékeket szignifikánsnak tekintettük, és félkövér karakterekkel kiemeltük.

Rövidítések: AL: akut leukémiás; CALR: calreticulin gén; ET: esszenciális thrombocythaemia; Hb: hemoglobin szint; JAK2: 2. típusú Janus kináz gén; MF: myelofibrotikus, MPL: thrombopoietin receptor gén; n: esetszám; Plt: thrombocytaszám; poz: pozitív; PV: polycythemia vera; WBC: fehérvérsejtszám

A $CALR^{poz}$ és a $JAK2\ V617F^{poz}$ ET-betegek klinikai és laboratóriumi adatait összevetve a következőket tapasztaltuk: a $CALR^{poz}$ ET betegek csoportjában több a férfi ($p=0,016$), alacsonyabb az életkor diagnóziskor ($p=0,007$), alacsonyabb a hemoglobin szint ($p<0,001$) és a fehérvérsejtszám ($p=0,002$) valamint magasabb a vérlemezkeszám ($p<0,001$). A koagulációs komplikációk (vénás és artériás trombózisok, vérzések együttesen véve) a $JAK2^{poz}$ ET betegek körében gyakoribbak voltak (36%, 84/231), mint a $CALR^{poz}$ ET betegeknél (19%, 18/93; $p=0,002$). A vénás trombózis gyakrabban fordult elő a $JAK2^{poz}$ ET csoportban, mint $CALR^{poz}$ ET-ben ($p=0,008$). Artériás trombózisok a $JAK2^{poz}$ ET esetek 14%-ában (32/230), a $CALR^{poz}$ ET esetek 11%-ában (10/92) ($p=0,3$) fordultak elő. Vérzés a $JAK2^{poz}$ ET esetek 10%-ában (22/228) és a $CALR^{poz}$ ET esetek 7%-ában (6/93) lépett fel ($p=0,2$). Myelofibrotikus transzformáció a $CALR^{poz}$ csoportban fordult elő gyakrabban ($p<0,001$). Az MPL^{poz} betegeket az alacsony esetszám miatt kihagytuk a további elemzésekből. A tripla negatív ET-ben szenvedőket összehasonlítva a $JAK2^{poz}$ ET csoporttal az alábbiakat találtuk: a tripla negatív ET betegek esetében alacsonyabb az életkor diagnóziskor ($p=0,020$), alacsonyabb a hemoglobin szint ($p<0,001$) és a fehérvérsejtszám ($p=0,006$). A $CALR^{poz}$ ET betegekkal összevetve a tripla negatív ET betegek csoportjában több a nő ($p=0,026$), és alacsonyabb a vérlemezkeszám ($p<0,001$, 1. táblázat).

A PMF-ben szenvedő betegeknél a fentihez hasonló elemzést végeztünk (2. táblázat): a $CALR^{poz}$ betegek a diagnóziskor fiatalabbak voltak ($p=0,003$), a vérlemezkeszámuk magasabb volt ($p<0,001$), valamint kevesebbszer fordult elő lépmeagnagyobbodás ($p=0,007$), mint a $JAK2^{poz}$ csoportban. A többi változó nem mutatott szignifikáns különbséget. A tripla negatív PMF betegek között az akut leukémiás transzformáció gyakoribb volt (33% vs 12% a $JAK2^{poz}$, $p=0,058$ vagy vs 16% a $CALR^{poz}$ csoporthoz viszonyítva, $p=0,26$), azonban meg kell jegyezni, hogy a tripla negatív PMF-ben az esetszám nagyon alacsony volt ($n=15$).

2. táblázat PMF-ben szenvedő betegek klinikai és laboratóriumi adatai onkogén mutációkra lebontva.

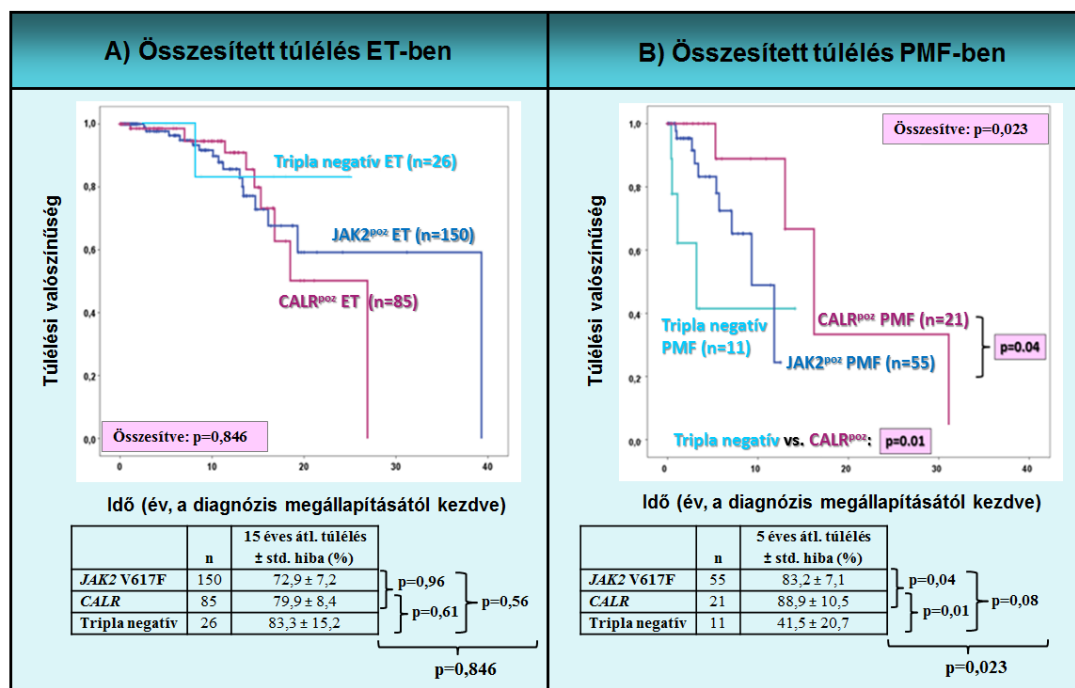
	(A) PMF, <i>JAK2</i> ^{poz} (n=74)	(B) PMF, <i>CALR</i> ^{poz} (n=30)	P (A) vs (B)	(C) PMF, <i>MPL</i> ^{poz} (n=8)	(D) PMF, tripla negatív (n=15)	P (D) vs (A)	P (D) vs (B)
Életkor: év (25-75 percentilis)	68 (57-73)	58 (39-66)	0,003	71 (49-82)	53 (50-72)	0,233	0,665
Férfi/nő (%/%)	31/43 (42%/58%)	13/17 (43%/57%)	1,00	4/4 (50%/50%)	10/5 (67%/33%)	0,095	0,208
Hb: g/L (25-75 percentilis)	116 (98-130)	108 (96-120)	0,296	100 (94-118)	95 (82-122)	0,052	0,161
WBC: G/L (25-75 percentilis)	12 (7-19)	9 (5-13)	0,083	17 (8-51)	13 (7-23)	0,618	0,138
Plt: G/L (25-75 percentilis)	250 (119-461)	523 (320-712)	<0,001	260 (205-739)	156 (54-427)	0,094	<0,001
Lépmegnagyobbodás n (%)	64/73 (88%)	16/26 (62%)	0,007	7/7 (100%)	11/14 (79%)	0,400	0,316
Vénás trombózis n (%)	9/67 (13%)	1/23 (4%)	0,442	0/6 (0%)	1/15 (7%)	0,680	1,00
AL transzformáció n (%)	8/66 (12%)	4/25 (16%)	0,730	0/6 (0%)	5/15 (33%)	0,058	0,255

Megjegyzés: Tripla negatívnak (D) azokat a PMF betegeket neveztük, akik nem hordozták a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk egyikét sem. A klinikai és a laboratóriumi adatok a betegek diagnóziskori állapotára vonatkoznak. A 0,05 alatti p értékeket szignifikánsnak tekintettük, és félkövér karakterekkel kiemeltük.

Rövidítések: AL: akut leukémiás; CALR: calreticulin gén; Hb: hemoglobinszint; JAK2: 2. típusú Janus kináz gén; MPL: thrombopoietin receptor gén; n: esetszám; Plt: trombocytaszám; PMF: primer myelofibrosis; poz: pozitív; WBC: fehérvérsejtszám

4.2.3 Összesített túlélés az ET és a PMF betegcsoportokban

A betegségek kimenetelét is megvizsgáltuk (összesített túlélés, OS) Kaplan-Meier megközelítést alkalmazva az ET (17/A ábra) és a PMF (17/B ábra) betegcsoportokban, a különböző onkogén mutációk szerint lebontva.



17. ábra Kaplan-Meier-féle túlélési elemzés ET-ben (A panel, n=261) és PMF-ben (B panel, n=87) szenvedő betegeknél, onkogén mutációk szerint lebontva. Tripla negatívoknak azokat a betegeket neveztük, akik nem hordozták a JAK2, a CALR és az MPL mutációk egyikét sem. A betegek egy részénél (ET: n=2, PMF: n=11) hematopoetikus őssejt transzplantáció történt, náluk a követési időt a transzplantáció napjáig vettük figyelembe. ET esetén univariancia analízissel p=0,846 (A panel), míg PMF-nél p=0,023 (B panel) értékeket kaptunk. Páronkénti összehasonlítást végezve a CALR^{poz} betegek túlélési esélye jelentősen jobbnak bizonyult, mint JAK2^{poz} (p=0,04) és a tripla negatív (p=0,01) PMF betegeké, míg a JAK2^{poz} betegek csak tendenciát mutattak a hosszabb túlélésre a tripla negatívokhoz viszonyítva (p=0,076).

Rövidítések: CALR: calreticulin gén; ET: esszenciális thrombocythaemia; JAK2: 2. típusú Janus kináz gén; n: betegszám; PMF: primer myelofibrosis; V617F: a JAK2 gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra.

A túlélési adatok nem voltak elérhetőek minden esetben, így a túlélési elemzést egy szűkített csoporton végeztük el. Az ET betegek közül 261 esetben rendelkezünk megfelelő követési adatokkal [$JAK2^{poz}$ (n=150), $CALR^{poz}$ (n=85) és tripla negatív (n=26) alcsoportok]. Univariancia elemzéssel (17/A ábra) ET-ben nem volt különbség az összesített túlélést tekintve (p=0,846). A 87 főből álló PMF csoportban az alcsoportok a következők szerint alakultak: $JAK2^{poz}$ (n=55), $CALR^{poz}$ (n=21) és tripla negatív (n=11). Az ET csoporttal ellentétben, PMF-ben az összesített túlélés eltérőnek mutatkozott a különböző genetikai háttérű alcsoportokban (p=0,023, 17/B ábra). Az összesített túlélés a $CALR^{poz}$ csoportban bizonyult a legjobbnak, míg a tripla negatívban a legrosszabbnak. Ezeket az eredményeket a továbbiakban megerősítettük páronkénti univariancia elemzéssel, ami p=0,04 értéket eredményezett a $CALR^{poz}$ vs $JAK2^{poz}$ és p=0,01 értéket $CALR^{poz}$ vs tripla negatív összehasonlításokban. A $JAK2^{poz}$ PMF betegeket összevetve a tripla negatívokkal, csak tendencia mutatkozott a kedvezőbb túlélésre (p=0,076).

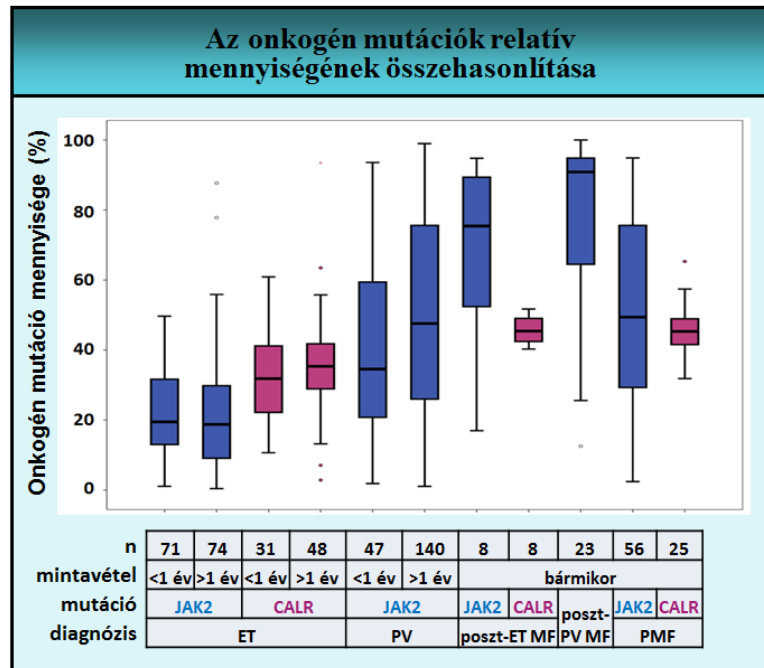
Az onkogén mutációk lehetséges hatását a túlélésre a továbbiakban Cox proporcionális hazard regresszióval vizsgáltuk a PMF csoportban, amelyben a tripla negatív PMF alcsoportot tekintettük referenciának. Ebben a modellben az életkor jelentős hatással volt a túlélésre (HR=1,082, 95% CI: 1,023-1,144; p=0,006), míg az onkogén mutáció meglehetősen nem befolyásolta szignifikánsan a túlélést, csak tendencia mutatkozott (p=0,059). A páronkénti összehasonlítást elvégezve a $CALR^{poz}$ alcsoport túlélése kedvezőbbnek bizonyult, mint a tripla negatív betegek túlélése (HR=0,131, 95% CI: 0,023-0,739; p=0,021). A $CALR^{poz}$ betegeket összehasonlítva a $JAK2^{poz}$ alcsoporttal, a jobb túlélési esélyre csak tendencia volt megfigyelhető $CALR$ 9. exon mutációk jelenlétében (HR=0,159, 95% CI: 0,018-1,391; p=0,097).

4.2.4 A $JAK2$ és $CALR$ mutáns allélok mennyiségi hatása

A $JAK2$ és $CALR$ mutációk mennyiségi meghatározását rutinszerűen csak 2014 óta végezzük laboratóriumunkban, ezáltal a mennyiségi adatok összehasonlítását csak egy szűkebb betegcsoporton tudtuk elvégezni. A $JAK2$ V617F allélra vonatkozóan PV-ben 215, ET-ben 154, míg PMF-ben 56 esetben volt elérhető mennyiségi adat. A $CALR$ mutációt tekintve ET-ben 96, PMF-ben pedig 25 beteg mennyiségi adata állt rendelkezésre. A mutáns allél mennyiségét a $JAK2$ V617F és a $CALR$ mutációt hordozó

betegek esetében egy egyszerű képlettel számoltuk ki: a mutáns allél mennyiségeket a teljes gén-kópiák (mutáns plusz normál gén kópiák) százalékában fejeztük ki. Ez lehetővé tette a különböző mutációk mennyiségi összehasonlítását az MPN alcsoportok között. Az egészséges csontvelő donorok (n=30) csoportjában a *JAK2* V617F mennyiségi meghatározás a következő eredményeket adta: medián: 0,003%, tartomány: 0-0,0399%; 95. percentilis: 0,0035%. Hasonlóan alacsony értékeket figyeltünk meg a *JAK2*^{neg} MPN betegek (n=59) csoportjában [medián: 0,002%, tartomány: 0-0,199%; 95. percentilis: 0,049%]. A *JAK2* V617F^{poz} betegek csoportjában a *JAK2* V617F allél mennyisége széles tartományban (0,5-100%) változott. Szignifikáns különbségeket találtunk a különböző diagnózisú betegcsoportokban [medián és tartomány ET-ben 19% (0,5-96%), PV-ben 44% (1-99%), PMF-ben 48% (3-95%); ET vs PV vagy PMF p<0,001]. A betegség progressziójakor kialakuló szekunder myelofibrosisban is magasabb *JAK2* V617F allél mennyiséget találtunk [post-PV MF-ben: 85% (1-99%); p<0,001; post-ET MF-ben: 66% (1-95%); p=0,002], mint a myelofibrosisos szövődmény nélküli PV és ET esetekben.

Az MPN alcsoportok további összehasonlításakor elkülönítettük a diagnózis időpontjában, illetve a betegség előrehaladt állapotában levett minták esetében talált mennyiségi értékeket. Ezen összehasonlításokat a jelenlévő onkogén mutációk mennyiségének függvényében a 18. ábra szemlélteti.



18. ábra A *JAK2 V617F* vagy a *CALR* mutációk relatív mennyiségének összehasonlítása a különböző MPN alcsoportokban, diagnózis szerint, és a diagnózistól számított mintavételi időpontok szerint lebontva. Az x tengely alatti első sor az adott alcsoporthoz tartozó betegszámot (n) tartalmazza. Amennyiben a mintavételkor primer vagy szekunder myelofibrosis nem jelentkezett, úgy a diagnózistól számított egy éven belüli mintavételekre a második sorban látható “<1 év” jelölést alkalmaztuk, minden egyéb eset a “>1 év” csoportba került. Primer vagy szekunder myelofibrosis fennállása esetén az előbbi csoportosítást nem alkalmaztuk. A *JAK2 V617F* mutáció mennyiségét valós idejű AS-PCR-rel, a *CALR* 9. exon mutációk mennyiségét pedig szemi-quantitatív módon fragmens analízissel határoztuk meg. A páronkénti összehasonlításokat Mann-Whitney teszttel végeztük el.

Rövidítések: *CALR*: calreticulin gén; *ET*: esszenciális thrombocythaemia; *JAK2*; 2. típusú Janus kináz gén; *PMF*: primer myelofibrosis; *MF*: myelofibrosis; *n*: betegszám; *PV*: polycythemia vera.

Páronkénti összehasonlítást végezve az alábbi megfigyeléseket tettük (18. ábra):

(i) A *JAK2* V617F^{poz} vagy a *CALR*^{poz} ET betegeknél nem volt jelentős különbség a mutáns allél mennyiségeket illetően, sem a diagnóziskori mintákat, sem a diagnózistól számított egy éven belüli, sem a későbbi mintavételeket tekintve. Másrészt viszont a két PV alcsoportban (44 beteg: diagnózistól számított egy éven belüli mintavétellel, és 140 beteg: későbbi mintavétellel, de myelofibrotikus transzformáció nélkül) emelkedő tendenciát találtunk a mutáns allél mennyiségeket illetően ($p=0,066$). (ii) A *JAK2* V617F allél mennyisége fokozatosan emelkedett párhuzamosan az egyre előrehaladottabb betegségek megjelenésével (*JAK2* V617F^{poz} ET vs PV: $p<0,001$, PV vs post-PV MF: $p<0,001$). (iii) Az ET-ben szenvedők között a mutáns *CALR* allél mennyisége jelentősen magasabb volt, mint a mutáns *JAK2* V617F allélé ($p<0,001$). (iv) A mutáns *CALR* allél mennyisége jelentős, de a *JAK2* V617F allélhoz viszonyítva kevésbé meredeken emelkedik az előrehaladottabb betegségek megjelenésével (*CALR*^{poz} ET vs *CALR*^{poz} post-ET MF: $p=0,01$; *CALR*^{poz} ET vs *CALR*^{poz} PMF: $p<0,001$). (v) Ellentétben a *JAK2* V617F mutáns allél mennyiségekkel, a *CALR* mutáns allél mennyisége csak ritkán haladta meg az 50%-ot (11 esetben mértünk 51-75% közötti és 1 esetben 75% feletti értéket).

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a *CALR* mutáns allél mennyisége hatással van-e a klinikai paraméterekre. Ennek érdekében azon *CALR*^{poz} ET betegek csoportjában, ahol a mintavétel a diagnózistól számítva egy éven belül történt ($n=31$), három különböző küszöbértéknél dichotóm csoportokat képeztünk: (i) 34,6%: az összes ET beteg *CALR* mutáns allél mennyiségének medián értéke (a myelofibrotikus transzformációs eseteket kizárva). (ii) 38,5%: az összes ET beteg *CALR* mutáns allél mennyiségének medián értéke (ET-t követő myelofibrotikus esetekkel együtt) (iii) 40,1%: az összes MPN (ET és PMF) beteg *CALR* mutáns allél mennyiségének medián értéke.

3. táblázat *ET-ben szenvedő betegek laboratóriumi adatainak összehasonlítása a CALR mutáns allél mennyiségének függvényében.*

Küszöbérték	CALR mutáns allél mennyiség					
	34,6%		38,5%		40,1%	
	alatt	felett	alatt	felett	alatt	felett
n	17	14	20	11	22	9
Hb: g/L (25-75 percentilis)	136 (127-143)	130 (116-151)	138 (130-154)	122 (105-141)	138 (131-147)	120 (100-158)
	p=0,47		p=0,04		p=0,018	
WBC: G/L (25-75 percentilis)	8 (6-11)	11 (9-16)	9 (7-11)	11 (9-18)	9 (7-11)	11 (9-18)
	p=0,005		p=0,025		p=0,046	
Plt: G/L (25-75 percentilis)	828 (707-1099)	1319 (849-1669)	847 (706-1210)	1406 (850-1819)	884 (707-1401)	1123 (849-1719)
	p=0,04		p=0,04		p=0,20	

Megjegyzés: A rendelkezésre álló 31 ET betegnél a páronkénti összehasonlítások során dichotóm csoportokat képeztünk a CALR mutáns allél mennyisége alapján három küszöbértéknél: (i) 34,6%; (ii) 38,5%; (iii) 40,1%. A p értékek a dichotóm csoportok páronkénti összehasonlításaira vonatkoznak (Mann-Whitney teszt). A 0,05 alatti p értékeket szignifikánsnak tekintettük, és félkövér karakterekkel kiemeltük.

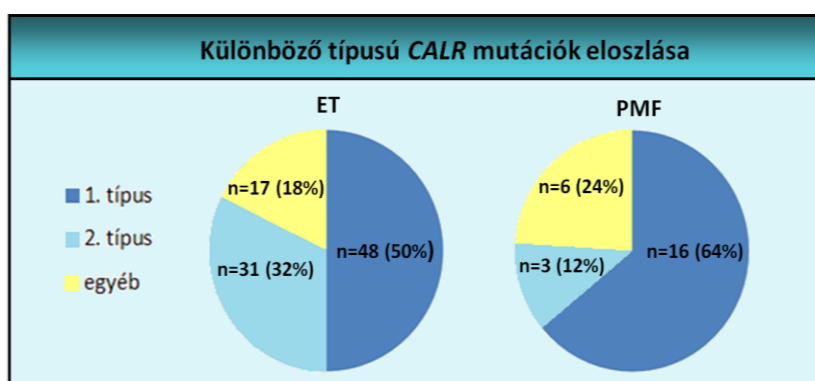
Rövidítések: CALR: calreticulin gén; ET: esszenciális thrombocythaemia; Hb: hemoglobin; n: esetszám; Plt: thrombocytaszám; WBC: fehérvérsejtszám.

A CALR mutáns allél 38,5%-os küszöbértékénél, az alacsony CALR allél mennyiség alacsonyabb fehérvérsejt- (9 vs 11 G/L, p=0,025) és vérlemezkesszámmal (848 vs 1406 G/L, p=0,04), valamint magasabb hemoglobin szinttel (138 vs 122 g/dL, p=0,04) társult. A fehérvérsejtszám a másik két küszöbérték esetén is alacsonyabb maradt az alacsonyabb mutáns allél mennyiségű csoportokban, azonban egyre magasabb küszöbértéket választva a csoportok közötti különbség egyre csökkent. Míg a hemoglobin szintek közötti különbség az alacsonyabb és a magasabb CALR mutáns allél mennyiségű csoportok között csak 38,5%-os vagy e feletti küszöbértéknél jelentkezett, addig a thrombocytaszámbeli eltérések 38,5% felett eltűntek.

4.2.5 A CALR mutáció klinikai jellemzői a mutáció típusa szerint

A CALR 9. exon mutációk jelenlétét összesen 121 esetben (96 ET és 25 PMF betegnél) erősítettük meg Sanger szekvenálással. 64 (53%) 1. típusú (52 bázispáros deléció, c.1092_1143del), 34 (28%) 2. típusú (5 bázispáros inszerció,

c.1154_1155insTTGTC) és 23 (19%) egyéb típusú mutációt azonosítottunk. Ez a 23 egyéb típusú mutáció a 3. (c.1095_1140del), 4. (c.1102_1135del), 5. (c.1091_1142del), 19. (c.1110_1140del), 22. (c.1120_1123del), 24. (c.1120_1138del), 29. (c.1135_1152delinsCCTCCTCTTTGTCT), 33. (c.1154_1155insATGTC), 34. (c.1154_delins CTTGTC) és 35. (c.1154delinsTTTGTC) típusú mutációkat, valamint potenciálisan új variánsokat (n=8) tartalmazott. A fent felsorolt variánsok megoszlását a 19.ábra szemlélteti. ET-ben szenvedőknél 48 (50%) 1. típusú, 31 (32%) 2. típusú és 17 (18%) egyéb, míg PMF-ben szenvedőknél 16 (64%) 1. típusú, 3 (12%) 2. típusú és 6 (24%) egyéb mutációt találtunk.



19. ábra A CALR mutációk megoszlása ET és PMF betegek körében.

Rövidítések: CALR: calreticulin gén; ET: esszenciális thrombocythaemia; n: betegszám; PMF: primer myelofibrosis.

Csak az 1. és 2. típusú mutációkat alapul véve, az ET és PMF betegek összehasonlításakor különböző eloszlásokat tapasztaltunk. Az ET-ben szenvedők körében 48 1. típusú (61%) és 31 2. típusú (39%) mutációt, míg PMF esetén 16 1. típusú (84%) és 3 2. típusú (16%) mutációt találtunk ($p=0,064$). A 2. típusú mutáció a nem 2. típusú mutációkhoz képest ET-ben gyakrabban fordult elő (32%), mint PMF-ben (12%, $p=0,049$). Az 1. típusú mutációt hordozóknál a CALR mutáns allél mennyisége magasabb volt ($n=14$, 41%), mint a 2. típusú mutációt hordozó ET betegek esetén ($n=15$, 27%, $p=0,023$). Ez a különbség adódhat abból, hogy a PCR során az 1. típusú mutációnál (52 bp-os deléció) a rövidebb DNS fragmentumok könnyebben amplifikálódnak, ezért ezt az eredményt egy másik mennyiségi meghatározást lehetővé tevő módszerrel lehetne biztosan igazolni.

A továbbiakban a demográfiai és a klinikai paramétereket hasonlítottuk össze mutáció típusonként a *CALR* mutációt hordozó ET betegek között. Azt találtuk, hogy a 2. típusú mutációt hordozók átlag életkora magasabb, mint az 1. típusú (átlag életkor diagnóziskor: 59 vs 51 év, $p=0,06$) vagy mint a nem 2. típusú mutációt hordozóké (átlag életkor diagnóziskor: 59 vs 51 év, $p=0,09$). Hasonló tendenciát találtunk a thrombocytaszámokat illetően, diagnóziskor magasabb volt a 2. típusú mutációt hordozók körében, mind az 1. típusú mutációt hordozókhöz képest [1237 G/L (25-75. percentilis: 884-1472) vs 946 G/L (25-75. percentilis: 764-1280) ($p=0,081$)]; mind a nem 2. típusú mutációt hordozókhöz képest [865 G/L (25-75. percentilis: 755-1218) ($p=0,041$)]. Citoreduktív terápiát gyakrabban alkalmaztak a 2. típusú mutációt hordozó ET betegeknél, mint 1. típusú mutáció esetén (89% vs 67%, $p=0,05$). A demográfiai és a klinikai paraméterek tekintetében (beleértve az összesített túlélést is) további eltéréseket nem találtunk a két ET alcsoport között. Hasonló elemzést a PMF betegek körében nem tudtunk elvégezni a 2. típusú *CALR* mutációt hordozók alacsony esetszáma miatt ($n=3$).

4.3 A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok

4.3.1 A vizsgált SNP-k *BCR-ABL1* negatív MPN-re hajlamosító hatása

A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok MPN-re hajlamosító szerepét 584 fős betegcsoporton és 400 egészséges személynél vizsgáltuk meg. A szerzett onkogén mutációk megoszlása az 584 fős betegcsoportban az alábbiak szerint alakult. Minden PV-ben szenvedő beteg *JAK2* V617F pozitív volt ($n=209$). Az ET-ben szenvedők között, 148-an (53%) a *JAK2* V617F, 95-en (34%) a *CALR*, és 9-en (3%) az *MPL* gén mutációt hordozták, 29-en pedig (10%) tripla negatívak voltak; a PMF csoportban 51 (54%) *JAK2* V617F, 25 (27%) *CALR*, és 7 (7%) *MPL* gén mutációra pozitív, valamint 11 (12%) tripla negatív esetet regisztráltunk. Az MPN csoportban mind a *TERT* rs2736100, mind a *JAK2* rs12343867 variánsok allélfrekvenciája ($AF\pm 95\%CI$) emelkedett volt a kontroll csoporthoz viszonyítva (*TERT* rs2736100_C: $62,7\pm 2,8\%$ vs $48,8\pm 3,5\%$, $p<0,0001$; *JAK2* rs12343867_C: $45,7\pm 2,9\%$ vs $29,8\pm 3,2\%$, $p<0,0001$) az allélikus modellt alkalmazva. A különbség szignifikáns maradt mindegyik vizsgált modell esetén (domináns, recesszív, genotípusos), amit a 4. táblázat foglal össze.

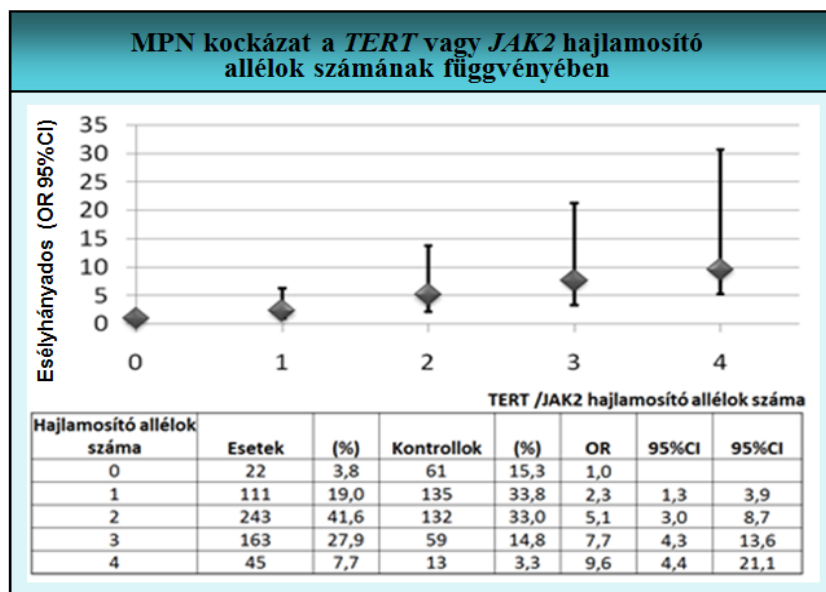
4. táblázat A TERT rs2736100 genotípusok megoszlása a kontroll és a különböző betegcsoportokban.

	n	AA	AC	CC	'C' AF ± 95% CI (%)	p ^{allélikus}	OR	(95% CI)	OR _(AA)	p	OR _(AC)	(95% CI)	p	OR _(CC)	(95% CI)
Kontroll	400	111	188	101	48,8 ± 3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN (teljes)	584	77	282	225	62,7 ± 2,8	<0,0001	1,77	(1,47 - 2,12)	1	<0,001	2,17	(1,54-3,06)	<0,001	3,23	(2,22-4,69)
PV	209	26	106	77	62,2 ± 4,7	<0,0001	1,73	(1,36 - 2,20)	1	<0,001	2,41	(1,48-3,93)	<0,001	3,26	(1,94-5,47)
ET	281	38	139	104	61,7 ± 4,1	<0,0001	1,70	(1,36 - 2,11)	1	<0,001	2,16	(1,41-3,32)	<0,001	3,01	(1,90-4,76)
PMF	94	13	37	44	66,5 ± 6,9	<0,0001	2,09	(1,50 - 2,91)	1	0,131	1,68	(0,86-3,30)	<0,001	3,72	(1,89-7,31)
<i>JAK2 V617F</i> ^{poz}	408	49	198	161	63,7 ± 3,4	<0,0001	1,85	(1,51 - 2,25)	1	<0,001	2,39	(1,61-3,53)	<0,001	3,61	(2,38-5,49)
<i>CALR</i> ^{poz}	120	17	55	48	62,9 ± 6,2	<0,0001	1,78	(1,33 - 2,40)	1	0,032	1,91	(1,06-3,45)	<0,001	3,10	(1,68-5,74)
<i>MPL</i> ^{poz}	16	1	10	5	62,5 ± 17,1	0,1501	1,75	(0,85 - 3,63)	1	0,093	5,90	(0,75-46,74)	0,123	5,50	(0,63-47,83)
tripla negatív	40	10	19	11	51,3 ± 11,2	0,7254	1,11	(0,70 - 1,75)	1	0,778	1,12	(0,50-2,50)	0,680	1,21	(0,49-2,97)
CML (teljes)	86	25	43	18	45,9 ± 7,6	0,5562	0,89	(0,64 - 1,24)	1	0,956	1,02	(0,59-1,75)	0,489	0,79	(0,41-1,54)
AML (teljes)	308	71	153	84	52,1 ± 4,0	0,2178	1,14	(0,93 - 1,41)	1	0,198	1,27	(0,88-1,84)	0,215	1,30	(0,86-1,97)
NK AML	122	28	64	30	50,8 ± 6,4	0,6088	1,09	(0,82 - 1,45)	1	0,242	1,35	(0,82-2,23)	0,582	1,18	(0,66-2,11)
nem NK AML	169	40	80	49	52,7 ± 5,4	0,2431	1,17	(0,91 - 1,51)	1	0,465	1,18	(0,76-1,85)	0,241	1,35	(0,82-2,21)

Rövidítések: A: adenin; AF: allélfrekvencia; AML: akut myeloid leukémia; C: citozin; CI: konfidencia intervallum; CALR: calreticulin gén; CML: krónikus myeloid leukémia; ET: esszenciális thrombocythaemia; JAK2 V617F: 2. típusú Janus kináz gén Val617Phe mutációja; MPL: thrombopoetin receptor gén; MPN: myeloproliferatív neoplázia; NK AML: normál kariotípusú AML; OR: odds ratio, esélyhányados, PMF: primer myelofibrosis; poz: pozitív; PV: polycythemia vera; TERT: telomeráz reverz transzkriptáz gén.

Az eddigi MPN tanulmányokkal megegyezően, a *TERT* variánst hordozók (AC és CC genotípusok együttesen) mind a *JAK2* V617F^{poz}, mind a *CALR*^{poz} MPN-re egyforma mértékben hajlamosítanak ($p=0,5$ a *JAK2* V617F^{poz} vs *CALR*^{poz} összehasonlításban). Ezzel ellentétben a *JAK2* rs12343867_C allél hajlamosító hatása hangsúlyosabb volt a *JAK2* V617F^{poz} MPN betegek körében (*JAK2* V617F^{poz} MPN esetén a *JAK2* rs12343867_C AF=49,8±3,5%; *CALR*^{poz} MPN esetén: 35,8±6,2%, $p\leq 0,001$). Az *MPL*^{poz} MPN betegek kis csoportját tekintve a *TERT* rs2736100_C allélfrekvenciája szintén emelkedett volt (62,5±17,1%, de nem volt szignifikáns az alacsony esetszám miatt). Mindezekkel ellentétben a tripla negatív csoportban a genotípusos megoszlás a kontroll csoporthoz hasonlított (AF=51,3±11,2%). A tripla negatív csoportot diagnózis szerint felosztva (ET vagy PMF) a PMF betegek körében a *TERT* variáns allélfrekvenciája magasabb volt (AF=68,2±19,9%), azonban az ET betegek *TERT* allélfrekvenciája nem volt emelkedett (AF=44,8±13,1%) a kontroll csoportéhoz képest (további statisztikai elemzést a tripla negatív betegek körében nem tudtunk végezni az alacsony esetszám miatt). A *TERT* variáns mind heterozigóta, mind homozigóta formája összefüggést mutatott a myeloproliferatív megbetegedésekkel a teljes *BCR-ABL1* negatív MPN csoportunkat nézve [OR (heterozigóta): 2,2 (1,5–3,1) és OR (homozigóta): 3,2 (2,2–4,7), mindkét esetben $p<0,001$]. A *TERT* heterozigótához képest a *TERT* homozigótaság az MPN-re való hajlamot additívan megnövelte ($p=0,009$). Hasonlóan a *TERT* variánshoz a *JAK2* rs12343867 hetero- vagy homozigótaság szintén jelentősen megemelte az MPN kialakulásának kockázatát [OR (heterozigóta): 2,5 (1,9–3,4) és OR (homozigóta): 3,4 (2,2-5,1), mindkét esetben $p<0,001$].

Mivel egy *TERT* vagy *JAK2* allél jelenléte is megnövelte az MPN-re való hajlamot, megvizsgáltuk több allél együttes hatását az MPN kialakulásának kockázatára. Egy *TERT* vagy *JAK2* allél jelenléte az MPN kockázatát 2,3-szorosára (95% CI: 1,3-3,9) emelte. Minden további *TERT* vagy *JAK2* allél külön-külön is tovább növelte a rizikót. Mind a négy hajlamosító allél együttes jelenléte (*TERT* és *JAK2* polimorfizmusokra nézve is homozigóta egyedek) a klasszikus MPN kialakulásának kockázatát 9,6-szorosára (95% CI: 4,4-21,1) emelte (20. ábra).



20. ábra Az MPN kockázata a *TERT* vagy *JAK2* hajlamosító allélok számának függvényében. A *TERT* rs2736100 vagy a *JAK2* rs12343867 allélok számának növekedésével az MPN-re való hajlam emelkedik. A heterozigóta genotípust egynek, a homozigótát kettő hajlamosító allélnak vettük.

Rövidítések: CI: konfidencia intervallum; *JAK2*: 2. típusú Janus kináz gén; MPN: myeloproliferatív neoplázia; OR: odds ratio, esélyhányados; *TERT*: telomeráz reverz transzkriptáz gén.

A továbbiakban a különböző MPN alcsoportokban megvizsgáltuk a *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 allélok együttes hatását (5. táblázat). A *TERT* és a *JAK2* rizikó alléljai egymástól függetlenül és egymást erősítve befolyásolják az MPN kockázatát. A kombinált heterozigótaság az MPN rizikóját 6-szorosára, míg a kombinált homozigótaság közel 10-szeresére növelte. A két variáns kölcsönhatása a *JAK2* V617F^{poz} csoportban szembetűnőbb volt, mint a *CALR*^{poz} betegek körében, ahol a kombinált *JAK2* hetero- és homozigótaság hatása nem különbözött jelentősen egymástól. A *CALR*^{poz} alcsoportban már egy *JAK2* rizikó allél jelenléte hasonló hatással bírt, mint a *JAK2* homozigótaság (5. táblázat).

5. táblázat A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 allélok kölcsönhatása különböző MPN alcsoportokban.

		<i>TERT</i> rs2736100								
		AA			AC			CC		
		OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p
Teljes MPN MPN vs kontroll <i>JAK2</i> rs12343867	TT	1	-	-	2,24	(1,26 - 3,98)	0,006	3,62	(1,96 - 6,69)	<0,001
	TC	2,37	(1,22 - 4,60)	0,011	5,96	(3,40 - 10,43)	<0,001	8,25	(4,49 - 15,14)	<0,001
	CC	6,16	(2,44 - 15,55)	<0,001	6,52	(3,19 - 13,32)	<0,001	9,60	(4,37 - 21,07)	<0,001
<i>JAK2</i> V617F ^{poz} MPN MPN vs kontroll <i>JAK2</i> rs12343867		<i>TERT</i> rs2736100								
		AA			AC			CC		
		OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p
	TT	1	-	-	2,49	(1,22 - 5,07)	0,012	3,63	(1,71 - 7,73)	0,001
	TC	2,60	(1,16 - 5,87)	0,021	7,76	(3,91 - 15,40)	<0,001	11,73	(5,69 - 24,20)	<0,001
	CC	9,04	(3,24 - 25,18)	<0,001	9,91	(4,36 - 22,52)	<0,001	14,08	(5,80 - 34,15)	<0,001
<i>CALR</i> ^{poz} MPN MPN vs kontroll <i>JAK2</i> rs12343867		<i>TERT</i> rs2736100								
		AA			AC			CC		
		OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p
	TT	1	-	-	2,27	(0,87 - 5,95)	0,095	4,36	(1,63 - 11,63)	0,003
	TC	1,98	(0,64 - 6,14)	0,235	3,98	(1,55 - 10,22)	0,004	5,47	(2,03 - 14,77)	0,001
	CC	3,39	(0,72 - 16,01)	0,123	2,54	(0,70 - 9,23)	0,156	4,69	(1,30 - 16,88)	0,018

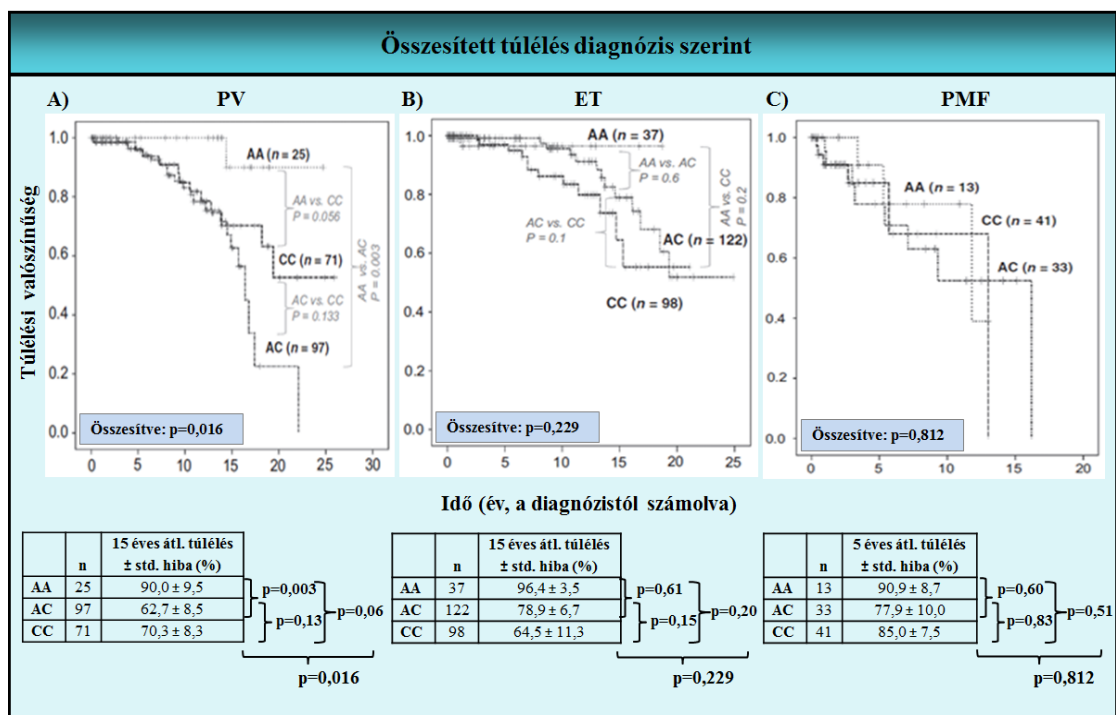
Rövidítések: A: adenin; C: citozin; *CALR*: calreticulin gén; CI: konfidencia intervallum; *JAK2*: 2. típusú Janus kináz gén; MPN: myeloproliferatív neoplázia; OR: odds ratio, esélyhányados; poz: pozitív; T: timin; *TERT*: telomeráz reverz transzkriptáz gén; V617F: a *JAK2* gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra.

A *TERT* és *JAK2* polimorfizmusok, mint kockázati tényezők esetleges szerepét a betegség kialakulásában a “population attributable fraction” (PAF) hányadossal jellemeztük. A korábban közöltekhez hasonlóan [38, 78], a magyar populációra is igaznak bizonyult, hogy a *TERT* rs2736100_C polimorfizmusra számolt PAF érték magasabb (52,5%) a *JAK2* rs12343867_C polimorfizmusra számoltnál (46,0%). A két polimorfizmus együttes PAF értéke 74,4%, amely azt mutatja, hogy a sporadikus MPN genetikai hátteréért főként ez a két polimorfizmus felelős.

4.3.2 A *TERT* rs2736100_C polimorfizmus szerepe MPN-ben

A továbbiakban megvizsgáltuk a *TERT* rs2736100_C polimorfizmus lehetséges hatását az MPN megjelenésére, tüneteire. A teljes MPN csoportunkat tekintve a *TERT* rs2736100_C hordozóknál a fehérvérsejtszám magasabbnak bizonyult (9 vs 11 G/L, $p=0,019$), mint a homozigóta AA betegeknél (domináns modell). Hasonló eredményeket kaptunk a *JAK2* V617F^{Poz} (9 vs 11 G/L, $p=0,001$) és a PV alcsoportokban (10 vs 11 G/L, $p=0,035$). A vizsgált *TERT* polimorfizmus nem volt hatással a különböző komplikációk gyakoriságára (lépmegnagyobbodás, vénás és artériás trombólízis, vérzés, myelofibrotikus vagy leukémiás transzformáció) sem önmagában, sem a *JAK2* haplotípussal együttesen. Annak ellenére, hogy nem találtunk összefüggést a különböző életet veszélyeztető komplikációk gyakorisága és a *TERT* polimorfizmus között, PV-ben az eltérő *TERT* genotípusú betegek hosszú távú összesített túlélése eltérőnek mutatkozott. A különböző *TERT* genotípusú MPN betegek összesített túlélését (PV, ET és PMF diagnózisok szerint lebontva) a 21. ábra szemlélteti.

PV-ben a 15 éves összesített túlélés a *TERT* rs2736100 AA genotípusú betegek körében $90,0\pm 9,5\%$, az AC heterozigóták esetén $62,7\pm 8,5\%$, és a CC genotípusnál $70,3\pm 8,3\%$ volt ($p_{\text{együttes}}=0,016$, $p_{AA\text{vs}AC}=0,003$, $p_{AA\text{vs}CC}=0,056$, 21/A ábra). Esszenciális thrombocythaemiában a 15 éves összesített túlélés az alábbiak szerint alakult: AA genotípusnál $96,4\pm 3,5\%$, AC genotípusnál $78,9\pm 6,7\%$, és CC genotípusnál $64,5\pm 11,3\%$ ($p_{\text{együttes}}=0,229$; $p_{AA\text{vs}AC}=0,6$, $p_{AA\text{vs}CC}=0,2$, 21/B ábra). Primer myelofibrosis esetén az összesített túlélésben nem volt különbség a különböző genotípusú betegek között (21/C ábra).



21. ábra A különböző *TERT* genotípusú MPN betegek összesített túlélése diagnózis szerint csoportosítva: PV (A panel), ET (B panel) és PMF (C panel).

Rövidítések: A: adenin; C: citozin; ET: esszenciális thrombocythaemia; n: esetszám; PMF: primer myelofibrosis; PV: polycythemia vera.

A teljes *BCR-ABL1* negatív MPN csoportban a különböző *TERT* genotípusú betegek halálozási okait megvizsgálva azt találtuk, hogy a homozigóta CC genotípusú betegek gyakrabban haltak meg az alap hematológiai megbetegedéstől független szolid tumorok következtében [CC genotípus: 44,4%; 12/27: 4 tüdőrák, 4 végbélrák, 3 laphámrák és 1 egyéb típusú (foramen jugulare területén elhelyezkedő) tumor], mint a *TERT* rs2736100 polimorfizmusra nézve vad típusú vagy heterozigóta betegek (AA és AC genotípusok: 5,3%; 2/38: 2 gyomor és epeúti rák; p=0,0004). Kórtörténet - beleértve a nem hematológiai megbetegedések jelenlétét vagy hiányát - 356 betegnél volt elérhető. Szolid tumorok a vad típusú betegek (AA genotípus) 8,2%-ában (4/49), a heterozigóták (AC genotípus) 16,2%-ában (28/173) és a homozigóták (CC genotípus) 23,1%-ában (31/134) jelentkeztek (p=0,014). A leggyakoribb tumorok az alábbiak voltak: bazalioma (n=10), bőrlaphám (n=9), végbél (n=8), tüdő (n=7), prosztata (n=7), és húgyhólyag karcinóma (n=5). Mivel feltételeztük, hogy a szolid tumorok gyakoribb előfordulásának hátterében a myeloszuppresszív kezelés is állhat, megvizsgáltuk a *TERT*

polimorfizmus és a myeloszuppresszív kezelés közötti kölcsönhatás lehetőségét. Megállapítottuk, hogy a citoreduktív kezelés megnöveli a szolid tumorok kialakulásának valószínűségét: másodlagos daganat a citoreduktív kezelésben nem részesülő betegek 6,0%-ában (5/84); a hidroxiaurea kezelésben részesülők 20,1%-ában (48/239); a buszulfán vagy radiofoszfor kezelésben részesülő betegek 40,9%-ában (9/22) jelentkezett (6% vs 40,9% $p < 0,001$; 6% vs 20,1% $p = 0,002$). Multivariancia elemzéssel a *TERT* rs2736100_C genotípus a citoreduktív kezeléstől független kockázati tényezőnek bizonyult a szolid tumorok kialakulásának szempontjából [$p = 0,045$; OR: 3,08 (1,03–9,26)]. A *TERT* rs2736100_C genotípus homozigóta formája nagyobb rizikót jelent, mint a heterozigóta forma [$p = 0,021$; CC genotípus, OR=3,86 (1,23–12,08) vs $p = 0,108$; AC genotípus, OR=2,54 (0,82–7,94)].

4.3.3 A *TERT* rs2736100_C polimorfizmus CML-ben és AML-ben

86 CML-ben és 308 AML-ben szenvedő betegnél vizsgáltuk meg a *TERT* variáns és a betegségek közötti esetleges összefüggést. A kontroll csoporthoz képest a *TERT* rs2736100_C allélfrekvenciák nem mutattak szignifikáns eltérést sem a CML, sem az AML csoportban (CML AF=45,9±7,6%, $p = 0,56$; AML AF=52,1±4,0%, $p = 0,22$; 4. táblázat). A *TERT* genotípusok megoszlását a normál és a kóros kariotípusú AML betegek körében is elemeztük, de nem találtunk statisztikailag jelentős eltérést a különböző AML alcsoportokban (4. táblázat). A komplex kariotípusú AML betegeknél (akiknél ≥ 3 kromoszóma érintett a leukémiás sejtklonban) a *TERT* rs2736100_C homozigótaság gyakrabban fordult elő, de az eltérés statisztikailag nem volt szignifikáns [40% (16/40) komplex kariotípusú AML-ben vs 25% (63/251) nem komplex kariotípusú AML-ben vagy 25% (101/400) a kontroll csoportban, mindkét esetben $p = 0,06$].

5 Megbeszélés

5.1 Onkogén mutációk MPN-ben

5.1.1 A genetikai eltérések optimális meghatározási módszerei

Az onkogén mutációk ismeretében eltérő klinikai jellemzőkkel rendelkező, és eltérő prognózisú alcsoportok definiálhatók *BCR-ABL1* negatív MPN-ben. A szerzett mutációk meghatározásához különböző mérési módszerek kiválasztása és beállítása volt szükséges. A V617F mutáció kimutatására például számos módszer áll rendelkezésre [87]. Az egyszerű kivitelezhetősége miatt az 1-5% érzékenységgű, minőségi AS-PCR módszert gyakran alkalmazzák, amely azonban 5% alatti mutáció mennyiség esetében nem mindig reprodukálható. Tanulmányunk során a V617F pontmutáció mérésére az alacsony tartományban is megbízhatóan érzékeny mennyiségi AS-PCR-t állítottuk be [89], amelynek köszönhetően meghatározható a V617F allél mennyisége (V617F%: mutáns *JAK2* allél / összes *JAK2* allél) [36]. A QPCR további előnye, hogy általa a terápia hatékonysága, illetve a reziduális betegség három nagyságrend (0,1-100%) tartományban monitorozható. A hagyományos Sanger szekvenálás, a HRM és a nagy hatékonyságú folyadék kromatográfiás (HPLC) módszerek érzékenysége 5-20% közé tehető, alkalmazásuk csak akkor javasolt, ha más ritka *JAK2* 14. exon mutációt kell kimutatni [36].

A *JAK2* 12. exon mutációkat tekintve a Sanger szekvenálás vagy az 5-10% érzékenységgű HRM módszer nem optimális, lévén hogy ezek a mutációk gyakran kis mennyiségben vannak jelen. Az érzékeny AS-QPCR technika pedig mutációnként egyedi módszertervezést igényel, ezért a mutációk nagy variabilitása miatt ez nehezen oldható meg. Mivel a mutációk többsége méretváltozással járó deléció és inszerció, munkánk során az 1-2%-os érzékenységgű kapilláris elektroforézist (fragmens analízist) alkalmaztuk [36, 54].

A *JAK2* 12. exon mutációkhoz hasonlóan a PCR termék méretváltozással járó *CALR* mutációk többsége is kiszűrhető a PCR termék méretének meghatározásával, azaz fragmens analízissel. A mutációk pontos azonosítását tanulmányunk során szekvenálással valósítottuk meg. Alternatív módszerként a HRM szűrőmódszer alkalmazható, de a fragmens analízis érzékenysége és specifikussága jobbnak bizonyul [90].

Az *MPL* mutációk kimutatására is különböző módszerek terjedtek el: mutációnként külön allélspecifikus technikák, vagy a teljes 10. exon szűrése szekvenálással, HRM-mel [36]. Az *MPL* eltérések esetén előfordulhat mind alacsony (1–15%), mind magas (50% feletti) mutáció arány, ami tovább nehezíti a megfelelő mérési metodika kiválasztását. A W515K mutáció mennyisége gyakran meghaladja az 50%-ot, homozigóta eseteket is leírtak, ami biallélikus mutációt vagy a heterozigótaság elvesztését feltételezi. A 3-15%-os alacsony mutáció mennyiségek általában W515L mutációk esetén fordulnak elő [36]. Az *MPL* mutációk kimutatására elsőként a HRM módszert alkalmaztuk, amellyel ritka mutációk is kiszűrhetők. Mivel ez a meghatározás nem definitív, a pozitív eseteket szekvenálással erősítettük meg. A HRM-mel pozitív, de szekvenálással negatív eredményeket mutációnként külön AS-PCR-rel vizsgáltuk tovább. Az 1-5% érzékenységgű AS-PCR technika azonban mutációnként egyedi módszertervezést igényel, ezért csak a leggyakoribb *MPL* mutációk kimutatására célszerű alkalmazni. Az *MPL* génben találtak már mutációt a receptor extracelluláris doménjében, ill. további ritka mutációkat azonosítottak az 501, 505, 506, 507, 509, 510, 514 és W515-P518delinsKT, 519. pozíciókban. Ezek mindegyikére AS-PCR-t tervezni időigényes és költséges.

Munkánk során a beállított molekuláris genetikai szűrő és megerősítő módszerekkel az MPN-ben szenvedő betegcsoportunkban az esetek 90%-ában tudtuk azonosítani a betegséget okozó genetikai eltérést. PV-ben a betegek 98,6%-ában *JAK2* V617F, 1,4%-ában *JAK2* 12. exon mutációkat találtunk. Irodalmi adatok szerint a *JAK2* 12. exon mutáció gyakorisága az európai populációban 1,9-7,4% [54, 91]. Mivel a nemzetközi tanulmányok szerint a *JAK2* gén közel 100%-ban érintett PV-ben, a 6. összehasonlító táblázatban a PV gyanúval vizsgált *JAK2* mutáció negatív eseteket nem elemeztük. ET-ben és PMF-ben a mutációk előfordulási gyakorisága hasonlóan alakult: 61-58%-ban *JAK2* V617F, 25-24%-ban *CALR* és 2-6%-ban *MPL* mutációkat azonosítottunk. Betegcsoportunkban a talált mutációk előfordulási gyakorisága megfelel az irodalomban ismert adatoknak (6. táblázat).

6. táblázat A *JAK2 V617F*, *CALR* és *MPL* mutációk előfordulási gyakorisága ET-ben és PMF-ben a nemzetközi közlemények alapján.

Publikáció	Dg	n	<i>JAK2 V617F</i> ^{poz}		<i>CALR</i> ^{poz}		<i>MPL</i> ^{poz}		Tripla negatív	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Klampfl [33]*	ET	894	581	(65)	186	(21)	35	(4)	92	(10)
Rumi [92]*	ET	717	466	(65)	176	(25)	0	(0)	75	(10)
Li [93]	ET	614	349	(57)	124	(20)	31	(5)	110	(18)
Rotunno [94]	ET	576	369	(64)	89	(15)	25	(4)	93	(16)
Fu [95]	ET	436	240	(55)	99	(23)	6	(1)	91	(21)
Guo [96]	ET	407	248	(61)	34	(8)	4	(1)	121	(30)
Tefferi [97]	ET	402	227	(56)	114	(28)	11	(3)	50	(12)
Nangalia [34]	ET	312	173	(55)	98	(31)	5	(2)	36	(12)
Sun [98]	ET	310	149	(48)	92	(30)	4	(1)	-	-
Okabe [99]	ET	294	180	(61)	47	(16)	11	(4)	57	(19)
Chi [100]	ET	289	189	(65)	25	(9)	8	(3)	67	(23)
Palandri [101]	ET	217	133	(61)	54	(25)	2	(1)	28	(13)
Chen [102]	ET	147	94	(64)	33	(22)	4	(3)	16	(11)
Trifa [103]	ET	141	76	(54)	40	(28)	3	(2)	22	(16)
Kim [104]	ET	84	43	(51)	23	(27)	1	(1)	17	(20)
Wu [105]	ET	80	45	(56)	20	(25)	4	(5)	-	-
Kim [106]	ET	79	50	(63)	14	(18)	2	(3)	13	(17)
Lundberg [91]	ET	69	41	(59)	17	(25)	2	(3)	9	(13)
Ben Said [107]	ET	40	23	(58)	12	(30)	0	(0)	5	(13)
Nunes [108]	ET	23	12	(52)	3	(13)	1	(4)	7	(31)
Saját közlemény	ET	468	287	(61)	118	(25)	10	(2)	53	(11)

Publikáció	Dg	n	<i>JAK2 V617F</i> ^{poz}		<i>CALR</i> ^{poz}		<i>MPL</i> ^{poz}		Tripla negatív	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Guglielmelli [109] [§]	PMF	394	-	-	70	(18)	-	-	-	-
Tefferi [110] [§]	PMF	358	195	(54)	95	(27)	-	-	-	-
Li [111]	PMF	357	178	(50)	76	(21)	11	(3)	96	(27)
Klampfl [33]	PMF	321	189	(59)	99	(31)	18	(6)	15	(5)
Tefferi [112] [§]	PMF	254	147	(58)	63	(25)	21	(8)	22	(9)
Nangalia [34]	PMF	168	125	(74)	26	(15)	2	(1)	15	(9)
Panagiota [113]	PMF	133	74	(56)	28	(21)	5	(4)	-	-
Gou [96]	PMF	133	60	(45)	7	(5)	2	(2)	64	(48)
Li [93]	PMF	132	70	(53)	28	(21)	12	(9)	22	(17)
Kim [106]	PMF	54	31	(57)	8	(15)	5	(9)	11	(20)
Kim [104]	PMF	50	27	(54)	11	(22)	2	(4)	10	(20)
Wu [105]	PMF	50	29	(58)	16	(32)	3	(6)	-	-
Lundberg[91]	PMF	34	15	(44)	11	(32)	3	(9)	5	(15)
Nunes [108]	PMF	21	11	(52)	8	(38)	0	(0)	2	(10)
Saját közlemény	PMF	127	74	(58)	30	(24)	8	(6)	15	(12)

Megjegyzés: *,§ Átfedő betegcsoportokon végzett vizsgálatok.

Rövidítések: *CALR*: *calreticulin* gén; *Dg*: *diagnózis*; *ET*: *esszenciális thrombocythaemia*; *JAK2*: *2. típusú Janus kináz gén*; *MPL*: *thrombopoetin receptor gén*; *n*: *esetszám*; *PMF*: *primer myelofibrosis*; *poz*: *pozitív*; *V617F*: *a JAK2 gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra*.

5.1.2 A rutin diagnosztikai vizsgálati sorrend meghatározása

A laboratóriumi hatékonyság és gazdaságosság növelése érdekében a klasszikus, *BCR-ABL1* negatív MPN gyanúja esetén meghatároztunk egy rutin diagnosztikai vizsgálati sorrendet az irodalomban megállapított mutáció gyakoriságok alapján (15. ábra) [33, 34, 87, 114]. Mivel az egyes szomatikus mutációk kölcsönösen kizárják egymást [33, 34], azaz a mutációk együttes előfordulása egy betegnél irodalmi ritkaságnak számít, a mutációk vizsgálatát szekvenciálisan végeztük a diagnózis alapján. Irodalmi ajánlások is a párhuzamos helyett a szekvenciális vizsgálati sorrendet

ajánlják [87, 114]. Első lépésként PV gyanúja esetén a *JAK2* V617F pontmutációt szűrtük, ami a *JAK2* mutációk több mint 90%-át adja. A *JAK2* gén 12. exonját érintő változások ritkák, vizsgálatuk csak *JAK2* V617F hiányában és alacsony EPO szint, vagy PV-re utaló csontvelő szövettan esetén indokolt [88]. Míg PV-ben a Philadelphia-kromoszóma kizárása nem diagnosztikai kritérium, addig ET-ben és PMF-ben elsődleges [115]. ET és PMF gyanújakor a molekuláris diagnosztikát a *JAK2* V617F vizsgálatával kezdjük, és a negatív betegeknél a *CALR* mutáció szűrésével folytatjuk. A *CALR* vizsgálatok bevezetésével nemcsak a rutin molekuláris diagnosztika algoritmus módosult, de lehetővé vált az ET és PMF megbetegedések genetikai hátterének pontosabb meghatározása is. Azokban az esetekben, ahol kétszeresen (mind *JAK2* V617F-re, mind *CALR*-ra nézve) negatív eredményeket kapunk, a továbbiakban az *MPL* gén 10. exonját elemezzük. A *JAK2* V617F, a *CALR* és az *MPL* mutációk MPN-re (PV, ET, PMF) jellemző eltérések, ritkán fordulnak elő egyéb myeloid malignitásokban [116, 117]. Mivel a három gén mutációja a klasszikus MPN esetek 90%-ánál pozitív, a mutációk kimutatását felhasználhatjuk a reaktív hematológiai válasz (pl. tüdő- illetve szívbetegségek által kiváltott polyglobulia, vagy gyulladás által kiváltott thrombocytosis) és a klonális csontvelői betegségek elkülönítéséhez.

Negatív *JAK2* V617F vizsgálat esetén a molekuláris genetikai laboratórium számára a megfelelő klinikai adatok ismerete nélkülözhetetlen a további vizsgálatok elvégzéséhez. A dolgozatban elemzett betegcsoport klinikai jellemzői megfelelnek a WHO 2008-as kritérium rendszerének, azonban a mindennapi rutin diagnosztikai tevékenység során számos polyglobuliával, szekunder thrombocytosissal vagy leukocytosissal vizsgált betegnél végezzük el a molekuláris diagnosztikai tesztek. A 2005-2016 közötti 11 évben közel 7300 *JAK2* V617F tesztet végeztünk, amelyek 28%-a bizonyult V617F pozitívnak. Más laboratóriumok is hasonló V617F pozitivitási arányokról (14-38%) számoltak be [114, 118]. A *JAK2* V617F vizsgálata viszonylag egyszerű és olcsó, tartós, ismeretlen ok miatt fennálló polyglobulia, thrombocytosis vagy leukocytosis esetén a reaktív okok kizárására irányuló vizsgálatokkal párhuzamosan elvégezhető. *JAK2* V617F negativitás esetén PV-ben az EPO szint meghatározása, illetve ET-ben és PMF-ben a csontvelő szövettani vizsgálata indokolt a további molekuláris genetikai vizsgálatok előtt. A *JAK2* V617F jelenléte olyan betegnél, akinél nem teljesülnek az MPN diagnosztikai kritériumok, felhívhatja a

figyelmet a háttérben meghúzódó MPN lehetőségére (pl. splanchnikus véna trombózis esetén a splenomegalia anémiát, thrombocytopeniát eredményezhet, amely elfedi az MPN tüneteit).

Azokban az esetekben, ahol a molekuláris diagnosztikai tesztek során háromszorosan (*JAK2* V617F-re, *CALR*-ra és *MPL*-re nézve) negatív eredményeket kapunk, az MPN lehetősége nem zárható ki. Előfordulhat, hogy a mutáns klón a választott molekuláris genetikai módszer kimutathatósági szintje alatti mennyiségben van jelen (a fragmens analízis 1-5%, a HRM 5-10%, a szekvenálás 20-25% mutáns klón jelenlétét mutatja ki), vagy a betegséget egy nem vizsgált génmutáció okozza. A végleges diagnózis felállítását a vérkép, a klinikai kép, a csontvelő szövettani vizsgálata és a molekuláris genetikai vizsgálatok együttesen segítik.

5.1.3 A V617F allél mennyiségi meghatározása, prognosztikai jelentősége

Az MPN-ben előforduló mutációk kimutatása nemcsak diagnosztikai jelentőségű, azonosításukkal a várható szövődmények gyakorisága és az MPN prognózisa is megbecsülhető. A mutációk mennyiségi meghatározása további prognosztikai információt adhat: magasabb allél arány előrehaladottabb betegségre utal. A V617F% diagnóziskor 1-100% között változhat. Nemzetközi ajánlások szerint a V617F mutáció jelenléte legalább 1-3% mennyiségben patogenetikai jelentőségű [87]. A *JAK2* V617F kimutatására számos módszer elfogadott [87]. Az allélspecifikus multiplex PCR agaróz gélelektroforetikus minőségi kimutatása egy egyszerű, olcsó, 1-5% érzékenységű módszer, amely azonban az 1-5%-os tartományban nem minden esetben reprodukálható. Az esetek kis hányadában álnegatív eredményt kaphatunk. Ajánlott a 0,1-1% tartományban is megbízható érzékenységgel rendelkező mennyiségi, valós-idejű PCR bevezetése [89], ami reziduális betegség monitorozására is alkalmas (pl. HSCT, interferon és JAK inhibitor kezelés után) három nagyságrend (0,1-100%) tartományban. A laboratóriumunkban 2014-ben bevezetésre került V617F mennyiségi meghatározását lehetővé tevő QPCR módszer esetében az álpozitív eredmények elkerülése miatt közel 100 *JAK2* V617F negatív személy mintáját analizáltuk. A nemzetközi ajánlások nyomán 1% felett értékeltük az eredményt V617F pozitívnak. 1% alatt a V617F allél jelenlétének nincs biztos klinikai jelentősége, az eredmények véleményezését 0,1-1% között a klinikai, hematológiai, morfológiai és egyéb

laboratóriumi eredmények integrált kiértékelésétől tesszük függővé (pl. citoreduktív kezelés, HSCT, több MPN klón, többféle onkogén mutáció egyidejű jelenléte). Ilyen esetekben 3-6 hónapon belüli ismétlés és megfigyelés szükséges. MPN kifejezett klinikai gyanúja esetén további onkogén mutációk (*CALR*, *MPL*, *JAK2* 12. exon) vizsgálata javasolt, ha a beteg nem részesült interferon vagy HSCT kezelésben.

A kvantitatív PCR további jelentősége, hogy a V617F allél mennyisége összefüggést mutat a klinikai tünetek súlyosságával. Az MPN természetes evolúciós folyamatának megfelelően a V617F% ET-ben a legalacsonyabb (általában 50% alatti), PV-ben gyakori az 50%-ot meghaladó érték, míg a legmagasabb (közel 100%-os) értékeket az ET-ből vagy PV-ből transzformálódott myelofibrosis mutatja. PV-ben a V617F% emelkedésekor magasabb hemoglobin szint és fehérvérsejtszám, alacsonyabb thrombocytaszám észlelhető, valamint nő a splenomegalia, a trombózis és a myelofibrotikus transzformáció esélye. ET-ben a magasabb V617F% magasabb fehérvérsejt- és alacsonyabb vérlemezkeszámmal, valamint a trombotikus szövödmények magasabb kockázatával társul. Érdekes, hogy PMF esetén az alacsony V617F% (<25%) jelent rosszabb prognózist [36]. Az 50%-nál magasabb allél mennyiség ET esetén rejtett PV fenotípust (pl. vashiány), közelebbi PV-be vagy myelofibrosisba történő transzformációt jelez. Az 50% feletti V617F% az MPN klonális evolúciójának a markere, mert homozigóta V617F mutációt igazol [51].

5.1.4 Szövödménygyakoriság és összesített túlélés *CALR*^{poz} betegeknél

Munkánk során egy független betegcsoportot vizsgálva az irodalomban [33, 34, 100, 112] leírtakhoz hasonló *CALR* mutáció előfordulásokat tapasztaltunk a különböző MPN alcsoportokban. Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányában a *JAK2* V617F pozitív és negatív MPN betegek (n=328) klinikai adatait összehasonlítva [119] már megállapította, hogy a *JAK2*^{poz} betegek idősebbek diagnóziskor, több közöttük a nő, magasabb a hemoglobin szintjük és többször fordul elő koagulációs komplikáció, mint a *JAK2*^{neg} társaiknál (beleértve a *CALR* mutációt hordozókat is). Jelen tanulmányunkban is jelentős eltéréseket találtunk a *JAK2*^{poz} és a *CALR*^{poz} ET alcsoportok klinikai tulajdonságainak összehasonlítása során. Ez megerősíti a korábbi megfigyeléseinket, miszerint a *CALR*^{poz} betegek fiatalabbak diagnóziskor, a nemek megoszlását tekintve a *CALR*^{poz} ET betegek között több a férfi, alacsonyabb a hemoglobin szint, alacsonyabb a

fehérvérsejtszám (a PMF csoportban nem szignifikáns) és magasabb a vérlemezkeszám [33, 34, 92, 94, 100].

Az irodalmi adatokkal megegyezően azt találtuk, hogy a $CALR^{poz}$ ET betegeknél kisebb a trombózis kockázata, mint a $JAK2^{poz}$ ET csoportban [33]. Rumi és munkatársai közleményében [92] a $CALR^{poz}$ betegeknél ritkábban fordul elő trombózis (1000 betegből évente 10 vs 25 alkalommal, $p=0,001$), illetve diagnóziskori előfordulásuk is alacsonyabb a $CALR^{poz}$ csoportban (2,8% vs $JAK2^{poz}$: 7,1%; $p=0,059$). Egy független ET betegcsoporton megvizsgálva Rotunno és munkatársai [94] is azt találták, hogy a $CALR^{poz}$ betegek körében ritkábban jelentkezik komplikációként trombózis (13,5% vs $JAK2^{poz}$: 30,1%; $p=0,011$).

Az ET betegeknél fellépő myelofibrotikus transzformációkat tekintve betegcsoportunkban a $CALR^{poz}$ betegeknél több mint kétszeres volt a transzformációs arány (15%) a $JAK2^{poz}$ betegekhez viszonyítva (6%, $p=0,034$). Nangalia és munkatársai egy kisebb ET betegcsoportot megvizsgálva a myelofibrotikus transzformáció kockázatát szintén magasabbnak találták a $CALR^{poz}$ betegeknél (19% vs $JAK2^{poz}$: 2%; $p=0,03$) [34]. Egy nagyobb tanulmányban azonban a myelofibrotikus transzformáció előfordulása 7% (95% CI: 3-13) volt a $CALR^{poz}$ betegeknél, 5% (95% CI: 3-8) a $JAK2^{poz}$ ET és 8% (95% CI: 5-12) a $JAK2^{poz}$ PV betegeknél, míg a 15 éves összesített előfordulások százalékos aránya az alábbiak szerint alakult: 13,4% (95% CI: 5,4-25,2) a $CALR^{poz}$ vs 8,4% (95% CI: 3,9-15,3) a $JAK2^{poz}$ ET vs 13,6% (95% CI: 7,3-21,9) a $JAK2^{poz}$ PV betegeknél (p =nem szignifikáns) [92]. A saját betegcsoportunkban a medián követési idő a $CALR^{poz}$ ET csoportban hosszabb volt (8 év a $CALR^{poz}$ és 4 év a $JAK2^{poz}$ betegcsoportban; $p=0,09$), ami a myelofibrotikus transzformációk emelkedett előfordulását eredményezheti.

Az összesített túlélést vizsgálva onkogén mutációk szerint lebontva, nem találtunk különbségeket az ET-ben szenvedő betegek körében. Ezzel ellentétben Klampfl és munkatársai tanulmányában a $CALR^{poz}$ betegek túlélési esélyei jobbak voltak, mint a $JAK2$ mutációt hordozóké ($p=0,04$) [33]. Rumi és munkatársai egy nagyobb ET betegcsoportot elemezve - amely tartalmazza a Klampfl által vizsgált egyéneket is - már nem találták szignifikánsan jobbnak a $CALR^{poz}$ betegek 15 éves túlélési esélyeit ($p=0,085$) a $JAK2^{poz}$ betegtársaikéhoz képest, sőt trend sem volt kimutatható, ha az életkort is figyelembe vették a multivariancia elemzésben [92].

Rotunno és munkatársai is megerősítették, hogy az összesített túlélést tekintve nincs különbség a különböző onkogén mutációt hordozó ET-ben szenvedő betegek között [94].

Az ET betegcsoporthoz, és az irodalomban leírtakhoz hasonlóan a $CALR^{poz}$ PMF betegeinket is fiatalabb diagnóziskori életkor és emelkedett thrombocytaszám jellemez. A PMF betegeknél talált megfigyeléseink egyeznek a korábbi tanulmányokban közölt eredményekkel [33, 112], miszerint a $CALR$ mutáció jelenléte pozitívan befolyásolja az összesített túlélést a $JAK2$ mutációt hordozókhoz képest. Páronkénti összehasonlításokkal (multivariancia analízis Cox regressziós modellben) a $CALR^{poz}$ betegek összesített túlélése jobbnak bizonyult a $JAK2^{poz}$ betegekhez képest, és szignifikánsan jobbnak bizonyult a tripla negatív PMF betegekhez képest. A Tefferi és munkatársai által közölt [112] leukémia mentes túlélési esélyek csökkenése a tripla negatív PMF betegeknél összhangban van az általunk regisztrált akut leukémiás transzformációk számának megnövekedésével a tripla negatív PMF betegeink körében (2. táblázat). Egy magas kockázatú mutáció jelenléte az $ASXLI$, $EZH2$, $SRSF2$ és $IDH1/2$ génekben rövidebb túlélést eredményezhet, és megnövelheti a betegség leukémiás transzformációjának esélyét. A PMF betegek túlélését tekintve a $CALR$ mutáció független védőfaktornak bizonyult [109]. A leggyakoribb, kedvezőtlen kimenetelre utaló $ASXLI$ mutációk az irodalomban leírtak szerint [112] a $JAK2^{poz}$, $CALR^{poz}$ és tripla negatív PMF betegeknél hasonló gyakorisággal fordulnak elő; így a $CALR^{poz}$ PMF betegeink körében tapasztalt kedvezőbb túlélési esély valószínűleg nem az $ASXLI$ mutációk egyenlőtlen eloszlásából ered. A $CALR$ mutáció jelenléte a PMF betegeinknél kedvező prognosztikai tényezőnek bizonyult, más irodalmi adatokhoz hasonlóan [111, 120].

Betegcsoportunkban az 1. és a 2. típusú $CALR$ mutációk gyakorisága megegyezik a már korábban leírt gyakoriságokkal mind ET [33, 34, 92, 100], mind PMF [33, 112] esetén. PMF-ben a 2. típusú $CALR$ mutáció gyakoriságát relatíve alacsonynak találtuk Klampfl és munkatársai eredményeihez hasonlóan (PMF: 21/105, 20%; ET: 74/195, 38%) [33].

A mutáció típusától függően a mutáns fehérjék C terminálisa különböző mennyiségű negatív töltésű aminosavat tartalmaz. Az 1. típusú mutáció (52 bp-os deléción) majdnem az összes negatív töltésű aminosavat eliminálja, míg a 2. típusú

mutáció (5 bp-os inszerció) ezeknek közel a felét megtartja [47]. Ezek a szerkezeti eltérések a *CALR* fehérjében megmagyarázhatják a *CALR* mutációk egyenlőtlen eloszlását, valamint az egyes variánsok patogén hatásainak különbözőségét. A mutációk egyenlőtlen eloszlása arra sarkallt minket, hogy mutáció típusonként módszeresen végigelemezzük az ET betegcsoportunkban talált klinikai és kimenetelbeli különbségeket. Az elemzés során az alábbi megfigyeléseket tettük: a 2. típusú mutációt hordozó betegek diagnóziskor idősebbek, magasabb a vérlemezkeszámuk, és gyakrabban alkalmaznak náluk citoreduktív terápiát, mint az 1. típusú vagy nem 2. típusú mutációt hordozóknál. Összhangban a megfigyeléseinkkel Tefferi és munkatársai [110] is eltérő PMF-en belüli tulajdonságokat közöltek összefüggésben a 2. típusú *CALR* mutációval.

5.1.5 A *CALR* mutáns allél mennyiségének hatása

A *CALR* mutáns allél mennyiségi meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy ET-ben a *CALR* mutáns klón százalékbán kifejezett értékei magasabbak a *JAK2* mennyiségi adatokhoz viszonyítva. A *JAK2* V617F% adataival ellentétben a *CALR* csak ritkán lépi túl az 50%-os értéket, ami egyúttal azt jelzi, hogy a mutáns *CALR* lókuszt ritkábban megy keresztül mitotikus rekombináción. Az irodalmi adatok alapján is az uniparentális diszómia kevesebbszer fordul elő a *CALR* (19p13.3-p13.2), mint a *JAK2* lókuszon (9p24). Egy alternatív szemikvantitatív PCR technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a *CALR* mutáns allél mennyisége diagnóziskor magasabb az 1. típusú mutációt hordozóknál, mint a 2. típus esetén. Az eredményeink tanúsítják, hogy a *CALR* daganatos klón mennyiségének hatása a betegségre a *JAK2* V617F%-hoz hasonlítható, ahol egyértelmű trend mutatkozik a mutáns allél emelkedésével párhuzamosan az egyre súlyosabb MPN fenotípusok megjelenésére. Campbell és munkatársai [121] feltételezése szerint a *JAK2* V617F pozitív ET, PV, post-ET/PV MF vagy PMF egy biológiai kontinuum, ahol a *JAK2* V617F allél mennyisége határozza meg a különböző MPN fenotípusokat, amiket egyéb környezeti és örökölt tényezők is befolyásolnak. Az ET-PV-PMF fenotípusoknál a növekvő *JAK2* V617F allél mennyiséget később több tanulmány is igazolta [52, 122, 123].

Mi közöltük elsőként, hogy ET betegek esetében a *CALR* mutáns allél mennyisége közvetlenül befolyásolhatja a hematológiai laboratóriumi paramétereket

(a hemoglobinszintet, a fehérvérsejt- és a vérlemezkeszámot). Kjær és munkatársai is megerősítették a fenti megállapításunkat: erős összefüggést találtak a *CALR* mutáns allél mennyisége és bizonyos klinikai paraméterek között (Plt, WBC, LDH és Hb) [124]. Hasonlóan a *JAK2^{POZ}* MPN-hez, a *CALR^{POZ}* ET és PMF klinikai jellemzői is átfedést mutatnak. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a közös molekuláris háttér a *CALR^{POZ}* ET és *CALR^{POZ}* PMF között is egy biológiai folytonosságot teremt, ahol a klinikai fenotípust a *CALR* mutáns allél mennyisége befolyásolja [92, 124].

5.2 A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok

5.2.1 A *TERT* rs2736100_C allél, mint MPN-re hajlamosító faktor

A telomer hosszúság fenntartásáért felelős génekben bekövetkező változások összefüggésbe hozhatók bizonyos daganatos megbetegedések megnövekedett kockázatával. A *TERT* gén különböző csírasejtvonalbeli polimorfizmusai befolyásolják a telomeráz enzim aktivitását és ezáltal a telomer hosszúságot. Bár nem tudjuk, hogy a *TERT* gén intronikus régiójában az rs2736100_C variáns pontosan milyen mechanizmuson keresztül fejt ki hatását, bizonyos adatok arra utalnak, hogy az rs2736100_C variáns jelenléte hosszabb telomer szakaszt eredményez [125, 126]. Az elmúlt években GWAS vizsgálatok kimutatták, hogy a *TERT* gén 5p15.33-as lókusza (a 8q24 és 9p21 mellett) számos szolid tumorról kapcsolatba hozható [74]. Az irodalomban közöltek szerint a *TERT* gént bőr- [127], tüdő- [128-130], vastagbél- [131], prosztata- [132], mell- [133], here- [134], hólyag- [135] valamint agydaganattal [136] hozták összefüggésbe. Az említett *TERT* lókuszt olyan hematológiai megbetegedések kialakulásáért is felelős lehet, mint például az akut lymphoid leukémia [126], a krónikus lymphoid leukémia [137, 138] és az MPN [38, 78, 79]. Hasonlóan a korábbi tanulmányokhoz, mi is megerősítettük az MPN és a *TERT* rs2736100_C variáns illetve az MPN és a *JAK2* 46/1 haplotípus közötti összefüggéseket. A *JAK2* 46/1 haplotípus vizsgálatára az rs12343867 SNP-t választottuk, mivel ez a haplotípussal kapcsolatosan öröklődik és a *JAK2* V617F mutáció közvetlen közelében (attól 418 bp távolságra) található [84]. Tanulmányunkban meghatároztuk az említett SNP-k allélfrekvenciáját az MPN, CML és AML betegcsoportjainkban, valamint megvizsgáltuk a betegségek kialakulásában betöltött szerepüket. Az irodalomban leírtakkal megegyezően a *TERT* rs2736100_C allélfrekvenciája minden MPN betegcsoportunkban emelkedett volt,

nemcsak diagnózis szerint lebontva (PV, ET, PMF), hanem onkogén mutációk szerint csoportosítva is (*JAK2* V617F^{poz}, *CALR*^{poz}) [38, 78]. Ez a megállapítás a későbbiekben román [139], valamint svéd és kínai [140] betegek körében is igazolódott. Tanulmányunkban a *TERT* rs2736100_C allél jelenléte az MPN-re való hajlamot hasonló mértékben növelte meg mind a *JAK2* V617F^{poz}, mind a *CALR*^{poz} esetekben, míg a *JAK2* rs12343867_C allél hatása a *JAK2* V617F^{poz} csoportban jobban érvényesült. Jäger és munkatársai is hasonló eredményeket közöltek 2014-ben [78], míg 2016-ban Trifa és munkatársai a *TERT* SNP hatását hangsúlyosabbnak találták a *CALR*^{poz} betegek körében a *JAK2* V617F^{poz} esetekhez viszonyítva [139]. A korábban leírtakkal szintén összhangban van jelenlegi megfigyelésünk, miszerint a *TERT* és *JAK2* allélok egymástól függetlenül is, illetve együttesen, egymás hatását erősítve hajlamosítanak MPN-re. Ez arra enged következtetni, hogy a *TERT* és *JAK2* allélok MPN-re hajlamosító hatása mögött különböző patomechanizmus rejlik.

CML-ben és AML-ben szenvedőknél is megvizsgáltuk a *TERT* variáns esetleges szerepét, de ugyanúgy, ahogy Oddsson és munkatársai, mi sem találtunk összefüggést az említett hematológiai malignitások és a *TERT* rs2736100_C allél jelenléte között [38]. Másrészt viszont az AML heterogén genetikai és etiológiai háttére miatt kizárni sem tudjuk a *TERT* variáns különböző AML betegségtípusokban (mint pl. komplex kariotípusú AML) betöltött szerepét. Nemrégiben Mosrati és munkatársai mérsékelt, mégis szignifikáns AML kockázatot mutattak ki rs2736100_CC homozigóta genotípust hordozók esetén (OR=1,5) [141].

Az izlandi és japán populációkban [38, 142] a *TERT* variánst hordozó egészséges emberek körében fennálló emelkedett erythrocyta-, thrombocyta-, granulocyta- és monocytaszám alapján azt feltételeztük, hogy a *TERT* variáns MPN-ben is befolyásolhatja a vérképet. Azonban az emelkedett fehérvérsejtszám kivételével (PV-ben, a *JAK2* V617F^{poz} és a teljes MPN csoportban) ezt nem tudtuk igazolni, vagyis MPN-ben a hematológiai paraméterek alakulása főként a szerzett mutációk típusától és mennyiségétől függ. A jelentősebb hematológiai komplikációk (vénás trombózis, MF és AL transzformáció) sem mutattak összefüggést a *TERT* variánssal az MPN betegcsoportunkban.

5.2.2 A társuló nem hematológiai malignitások

Bár eredményeink alapján sem a laboratóriumi paraméterek alakulása, sem a hematológiai komplikációk nem hozhatók összefüggésbe a *TERT* variánssal, PV-ben a variánst hordozók hosszú távú túlélési esélyei mégis rosszabbnak bizonyultak. Ennek hátterében valószínűleg a társuló szolid tumorok gyakoribb előfordulása áll. Az irodalomban ismert tény, hogy a *BCR-ABL1* negatív és pozitív MPN-ben szenvedők körében egy újabb nem hematológiai daganatos megbetegedés kialakulásának magasabb a kockázata [143]. Ezek a másodlagosan kialakuló tumorok az általános feltételezések szerint a myeloszuppresszív kezelések következményei. MPN betegcsoportunkban mi is igazoltuk a szolid tumorok (főként bőr bazalioma és laphámrák) gyakoribb előfordulását a hidroxüreával kezelt betegeknél, valamint megállapítottuk, hogy a másodlagos daganatok kialakulása még fokozottabban jelentkezik buszulfán vagy radiofoszfor (^{32}P) izotóp alkalmazása esetén. A bőr károsodása - beleértve a bőrdaganatot is - a hosszú távú hidroxürea kezelés jól ismert mellékhatása. Betegcsoportunkban gyakran előfordult továbbá vastagbél-, tüdő-, prosztatata- és hólyag daganat is, melyek kialakulását összefüggésbe hozták a *TERT* rs2736100_C variánssal [74, 77, 131]. Multivariancia analízissel kimutattuk, hogy a citoreduktív terápia és a *TERT* genotípusok a nem hematológiai tumorok kialakulása szempontjából egymástól független kockázati tényezők *BCR-ABL1* negatív MPN-ben. Egy nemrégiben közölt epidemiológiai tanulmányban az MPN betegek körében megnövekedett szolid tumorszámról számoltak be a teljes populációhoz viszonyítva, akár 3 évvel az MPN diagnózisát megelőzően [144]. Ez a megfigyelés felhívja a figyelmünket arra, hogy az MPN-ben szenvedőknél citoreduktív terápia nélkül is fennáll a szolid tumorok kialakulására való hajlam. Különböző tanulmányok feltételezései szerint a hematológiai és a nem hematológiai malignitások gyakori együttes megjelenéséért krónikus gyulladás tehető felelőssé [144, 145]. Adataink alapján azonban arra következtetünk, hogy az MPN és a szolid tumorok együttes előfordulását a mindkettőre hajlamosító *TERT* variáns is okozhatja. A *TERT* rs2736100_C polimorfizmus hetero- és homozigóta formájának magas előfordulási aránya a normál populációban (70%) és az MPN betegek körében (85%) figyelmeztető jel arra vonatkozóan, hogy a citoreduktív ágensek hosszú távú alkalmazását lehetőleg elkerüljük fiatal MPN betegek esetén. A *TERT* variáns szerepét az MPN kórfejlődésében a legújabb kutatások is alátámasztják,

amelyek egy specifikus telomeráz inhibitor (imetelstat: egy lipid-konjugált oligonukleotid szekvencia, amely a telomeráz RNS templátját célozza meg) lehetséges pozitív hatásait tanulmányozzák olyan ET [146] és PMF [147] betegeknél, ahol a hagyományos terápia kudarcot vallott. Bár a *TERT* inhibitor mellékhatásaként myeloszupresszió (thrombocytopenia) jelentkezett, az általa elért hematológiai, morfológiai és molekuláris remisszió ígéretesnek tűnik az MPN jövőbeni kezelését illetően [148].

6 Következtetések

1) Tanulmányunk során laboratóriumunkban olyan molekuláris genetikai, szűrő és megerősítő módszereket vezettünk be, amelyek segítségével a PV, ET vagy PMF esetek több mint 90%-ában meghatározhatók a szerzett onkogén mutációk. A *JAK2*, *CALR* és *MPL* géneket érintő eltérések kimutatásához az allélspecifikus PCR, a valós idejű PCR (TaqMan módszer), a fragmens analízis, a nagy felbontású olvadási görbe analízis és a Sanger szekvenálás kombinációit alkalmaztuk.

2) MPN betegcsoportunkban a talált mutációk előfordulási gyakorisága megfelelt az irodalomban ismertett adatoknak. PV-ben a betegek 98,6%-ában *JAK2* V617F, 1,4%-ában *JAK2* 12. exon mutációkat találtunk. ET-ben és PMF-ben a mutációk előfordulási gyakorisága hasonlóan alakult: 61-58%-ban *JAK2* V617F, 25-24%-ban *CALR* és 2-6%-ban *MPL* mutációkat azonosítottunk. A klinikai jellemzőket tanulmányozva szignifikáns eltéréseket mutattunk ki a különböző fenotípusú, valamint a különböző mutációt hordozó betegcsoportok között. Az összesített túlélést elemezve a PMF betegcsoportunkban a *CALR*^{poz} betegek túlélési esélye jelentősen jobb volt, mint a *JAK2*^{poz} ($p=0,04$) és a tripla negatív ($p\leq 0,01$) PMF betegeké. Ez a megállapításunk egyezik a korábbi tanulmányokban közölt eredményekkel.

3) Már korábban felismerték, hogy a *JAK2* V617F allél mennyisége prognosztikai értékű, és összefüggést mutat az MPN klinikai tüneteinek súlyosságával. Egy alternatív szemikvantitatív PCR technikát alkalmazva elsőként vizsgáltuk a *CALR* mutációk mennyiségének fenotípust és klinikai paramétereket befolyásoló hatását. Mi közöltük elsőként, hogy ET betegek esetében a *CALR* mutáns allél mennyisége közvetlenül befolyásolhatja a hematológiai laboratóriumi paramétereket (a hemoglobin szintet, a fehérvérsejt- és vérlemezkeszámot). Az eredményeink tanúsítják, hogy a *CALR* allél mennyiségének betegségre gyakorolt hatása hasonlít a *JAK2* V617F alléléhoz, ahol egyértelmű trend mutatkozik a mutáns allél emelkedésével párhuzamosan az egyre súlyosabb MPN fenotípusok megjelenésére. Megállapítottuk a különböző típusú *CALR* mutációk egyenlőtlen eloszlását az ET és PMF betegcsoportunkban, továbbá kimutattuk, hogy a *CALR* daganatos klón mennyisége diagnóziskor magasabb az 1. típusú mutációt hordozóknál, mint a 2. típus esetén. ET-ben szenvedőknél klinikai és kimenetelbeli különbségeket találtunk az 1. és 2. típusú *CALR* mutációt hordozó

betegek között. A fenti különbségekből adódóan az inszercióval vagy delécióval járó *CALR* mutációk eltérő patomechanizmusára következtethetünk.

4) A *TERT* rs2736100_C polimorfizmus vizsgálatára alléldiszkriminációs, hibridizációs szondákat alkalmazó módszert vezettünk be, majd olvadási görbe analízist végeztünk. Az irodalomban leírtakkal megegyezően MPN esetén mind a *TERT* rs2736100, mind a *JAK2* rs12343867 variánsok allélfrekvenciája emelkedett volt, nemcsak diagnózis szerint lebontva, de onkogén mutációk szerint csoportosítva is. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a *TERT* és a *JAK2* rizikó allélok egymástól függetlenül és egymás hatását erősítve hajlamosítanak MPN-re. A *TERT* és a *JAK2* kombinált heterozigótaság az MPN kialakulásának kockázatát 6-szorosára, míg a kombinált homozigótaság közel 10-szeresére növelte. Mindez arra enged következtetni, hogy a *TERT* és *JAK2* allélok MPN-re hajlamosító hatása mögött különböző patomechanizmus rejlik. CML-ben és AML-ben azonban a *TERT* rs2736100_C allélfrekvenciák nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest. Jelen vizsgálatunk megerősíti, hogy a *TERT* variáns mind heterozigóta, mind homozigóta formája *BCR-ABL1* negatív myeloproliferatív megbetegedésekre hajlamosít, míg CML-re és AML-re nem rizikófaktor.

5) Tanulmányunk során megállapítottuk, hogy a *TERT* polimorfizmus jelenléte az emelkedett fehérvérsejtszám kivételével nem befolyásolja a vérkép paramétereit, vagyis MPN-ben a hematológiai paraméterek alakulása főként a szerzett mutációk típusától és mennyiségétől függ. A vizsgált *TERT* variáns nem volt hatással a különböző komplikációk gyakoriságára sem, mégis az eltérő *TERT* genotípusú PV betegek hosszú távú túlélési esélyei különbözőek voltak. Ennek okait kutatva felfedtük, hogy a homozigóta (*TERT* rs2736100_CC) genotípusú betegek magasabb mortalitása a hematológiai megbetegedéstől független szolid tumorok következtében emelkedett. Az MPN és a szolid tumorok együttes előfordulásának hátterében a mindkettőre hajlamosító *TERT* variáns is állhat. Multivariancia elemzést végezve elsőként mutattuk ki, hogy a társuló nem hematológiai tumorok kialakulására nézve a citoreduktív terápia és a *TERT* rs2736100_C polimorfizmus egymástól független kockázati tényezők.

7 Összefoglalás

A *BCR-ABL1* negatív, klasszikus myeloproliferatív neopláziák (MPN) genetikai hátterében a Janus kináz 2 (*JAK2*), a calreticulin (*CALR*) és a thrombopoetin receptor (*MPL*) gének mutációit azonosították. A szerzett mutációkon túl örökletes faktorok is befolyásolhatják a betegség kialakulására való hajlamot: a *JAK2* 46/1-es haplotípus mellett nemrégiben a telomeráz reverz transzkriptáz (*TERT*) rs2736100_C variáns hozták összefüggésbe MPN és szolid tumorok kialakulásának kockázatával. Munkánk során polycythemia verában (PV), esszenciális thrombocythaemiában (ET) és primer myelofibrosisban (PMF) szenvedő betegek körében kombinált molekuláris genetikai módszeregyüttest alkalmazva határoztuk meg a mutációk gyakoriságát. Egy nagy, független MPN betegcsoportot elemezve megerősítettük, hogy a *CALR* mutációk ET-ben és PMF-ben különböző fenotípusok kialakulásáért felelősek, és jelentős hatással vannak a betegek összesített túlélésére. A *JAK2* V617F mutációhoz hasonlóan a *CALR* mutáns allél mennyisége közvetlenül befolyásolja az MPN klinikai megjelenését, és a mutáns allél arány emelkedésével párhuzamosan egyre súlyosabb MPN fenotípusok jelennek meg. Az öröklött genetikai faktorok tekintetében megerősítettük, hogy a *TERT* rs2736100_C polimorfizmus *BCR-ABL1* negatív MPN kialakulására hajlamosít a molekuláris háttértől és a betegség típusától függetlenül. A kombinált *TERT* rs2736100 és *JAK2* rs12343867 homozigótaság jelentős mértékben megnöveli az MPN kialakulásának kockázatát. Kimutattuk továbbá *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN betegek körében, hogy a másodlagos szolid tumorok megjelenését tekintve a *TERT* rs2736100_C variáns a citoreduktív terápiától független kockázati tényező. A *CALR* mutációk felfedezésével nemcsak az MPN nem-invazív diagnosztikai precizitása javult, de a szerzett mutációk azonosítása befolyásolhatja a prognózist és a terápia kiválasztását is. A szerzett genetikai eltérések mennyiségi meghatározása pedig további prognosztikai információt adhat, és reziduális betegség követési markerként szolgálhat. A veleszületett genetikai variánsok vizsgálata szintén segítheti az MPN betegek egyénre szabott, optimális kezelési stratégiájának kiválasztását.

Summary

Somatic mutations in Janus kinase 2 (*JAK2*), calreticulin (*CALR*) and thrombopoietin receptor (*MPL*) genes have been identified in the genetic background of *BCR-ABL1* negative, classic myeloproliferative neoplasms (MPN). Beyond somatic mutations germline genetic factors can predispose to disease development. Beside the previously identified *JAK2* 46/1 haplotype, rs2736100_C variant of telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene was recently found to be a susceptibility factor for MPN and solid tumors. A complex array of molecular techniques was applied to determine the frequency of mutations in polycythemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primer myelofibrosis (PMF) patients. Analyzing a large, independent cohort of MPN, we confirmed recent observations that *CALR* mutations are responsible for distinct clinical features in both ET and PMF and have a significant effect on overall survival. Similarly to *JAK2* V617F mutation, clinical presentation is directly influenced by mutant *CALR* allele burden and mutant *CALR* loads increase gradually in parallel with the appearance of more advanced stages of MPN. Concerning germline variants we confirmed that *TERT* rs2736100_C polymorphism predisposes to the development of *BCR-ABL1* negative MPN regardless of the molecular background or disease type. Combined *TERT* rs2736100 and *JAK2* rs12343867 homozygosity significantly increases MPN risk. Furthermore, we showed that cytoreductive therapy and *TERT* rs2736100_C variant were independent risk factors for secondary solid tumor formation in *BCR-ABL1* negative, classic MPN. The discovery of somatic *CALR* mutations not only improves the precision of noninvasive diagnostics of patients with MPN, but identification of somatic mutations may influence prognosis and therapy. Quantitativation of somatic mutations can contribute to additional prognostic information and serve as residual disease follow-up marker. The investigation of inherited genetic variants may also help in choosing personalised, optimal treatment strategy.

8 Irodalomjegyzék

1. Dameshek W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6(4): 372-375.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20): 2391-2405.
3. Roaldsnes C, Holst R, Frederiksen H, Ghanima W. (2016) Myeloproliferative neoplasms: trends in incidence, prevalence and survival in Norway. *Eur J Haematol*, 98(1): 85-93.
4. Geyer HL, Kosiorek H, Dueck AC, Scherber R, Slot S, Zweegman S, Te Boekhorst PA, Senyak Z, Schouten HC, Sackmann F, Fuentes AK, Hernandez-Maraver D, Pahl HL, Griesshammer M, Stegelmann F, Dohner K, Lehmann T, Bonatz K, Reiter A, Boyer F, Etienne G, Ianotto JC, Ranta D, Roy L, Cahn JY, Harrison CN, Radia D, Muxi P, Maldonado N, Besses C, Cervantes F, Johansson PL, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, Paoli C, Passamonti F, Andreasson B, Ferrari ML, Rambaldi A, Samuelsson J, Cannon K, Birgegard G, Xiao Z, Xu Z, Zhang Y, Sun X, Xu J, Kiladjian JJ, Zhang P, Gale RP, Mesa RA. (2017) Associations between gender, disease features and symptom burden in patients with myeloproliferative neoplasms: an analysis by the MPN QOL International Working Group. *Haematologica*, 102(1): 85-93.
5. Tefferi A, Barbui T. (2017) Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 92(1): 94-108.
6. Udvardy M, Fekete S. Myeloproliferatív betegségek. In: Z. Tulassay (szerk.), *A belgyógyászat alapjai 2*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011.
7. Tefferi A, Barbui T. (2015) Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 90(2): 162-173.

8. Cerquozzi S, Tefferi A. (2015) Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J*, 5: e366.
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5): 937-951.
10. Rumi E, Cazzola M. (2016) How I treat essential thrombocythemia. *Blood*, 128(20): 2403-2414.
11. Cervantes F. (2011) Management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011: 215-221.
12. Birgegard G. (2015) Advances and challenges in the management of essential thrombocythemia. *Ther Adv Hematol*, 6(3): 142-156.
13. Michiels JJ. (1997) Erythromelalgia and vascular complications in polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost*, 23(5): 441-454.
14. Vannucchi AM. (2017) From leeches to personalized medicine: evolving concepts in the management of polycythemia vera. *Haematologica*, 102(1): 18-29.
15. Vannucchi AM, Harrison CN. (2017) Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129(6): 693-703.
16. Blum S, Martins F, Alberio L. (2016) Ruxolitinib in the treatment of polycythemia vera: patient selection and special considerations. *Journal of Blood Medicine*, 7: 205-215.
17. Saeed I, McLornan D, Harrison CN. (2017) Managing side effects of JAK inhibitors for myelofibrosis in clinical practice. *Expert Rev Hematol*, 10(7): 617-625.
18. O'Sullivan JM, Harrison CN. (2017) JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Mol Cell Endocrinol*, 451: 71-79.
19. Tefferi A. (2016) Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 91(12): 1262-1271.

20. Shantzer L, Berger K, Pu JJ. (2016) Primary myelofibrosis and its targeted therapy. *Ann Hematol*, 96(4): 531-535.
21. Nazha A, Khoury JD, Rampal RK, Daver N. (2015) Fibrogenesis in Primary Myelofibrosis: Diagnostic, Clinical, and Therapeutic Implications. *Oncologist*, 20(10): 1154-1160.
22. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, Catalano JV, Deininger M, Miller C, Silver RT, Talpaz M, Winton EF, Harvey JH, Jr., Arcasoy MO, Hexner E, Lyons RM, Paquette R, Raza A, Vaddi K, Erickson-Viitanen S, Koumenis IL, Sun W, Sandor V, Kantarjian HM. (2012) A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*, 366(9): 799-807.
23. Jabbour E, Kantarjian H. (2016) Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*, 91(2): 252-265.
24. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. (2012) Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*, 118(12): 3123-3127.
25. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Muller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Saussele S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6): 872-884.
26. Patel AB, Wilds BW, Deininger MW. (2017) Treating the chronic-phase chronic myeloid leukemia patient: which TKI, when to switch and when to stop? *Expert Rev Hematol*, 10(7): 659-674.
27. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. (2016) 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*, 6(7): e441.
28. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365(9464): 1054-1061.

29. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434(7037): 1144-1148.
30. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 352(17): 1779-1790.
31. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7(4): 387-397.
32. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 3(7): e270.
33. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schonegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, 369(25): 2379-2390.
34. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham

- D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 369(25): 2391-2405.
35. Cahu X, Constantinescu SN. (2015) Oncogenic Drivers in Myeloproliferative Neoplasms: From JAK2 to Calreticulin Mutations. *Curr Hematol Malig Rep*, 10(4): 335-343.
36. Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, Kjaer L, Lippert E, Mansier O, Oppliger Leibundgut E, Percy MJ, Porret N, Palmqvist L, Schwarz J, McMullin MF, Schnittger S, Pallisgaard N, Hermouet S. (2015) Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*, 95(4): 270-279.
37. Tefferi A, Pardanani A. (2015) Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol*, 1(1): 97-105.
38. Oddsson A, Kristinsson SY, Helgason H, Gudbjartsson DF, Masson G, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Steingrimsdottir H, Vidarsson B, Reykdal S, Eyjolfsson GI, Olafsson I, Onundarson PT, Runarsson G, Sigurdardottir O, Kong A, Rafnar T, Sulem P, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. (2014) The germline sequence variant rs2736100_C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 28(6): 1371-1374.
39. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 41(4): 450-454.
40. Arbouzova NI, Zeidler MP. (2006) JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, 133(14): 2605-2616.
41. Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos RA, Gardon O, Tunny KA, Blucher KM, Morton CJ, Parker MW, Sierecki E, Gambin Y, Gomez GA, Alexandrov K, Wilson IA, Doxastakis M, Mark AE, Waters MJ. (2014) Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science*, 344(6185): 1249783.

42. Linher-Melville K, Singh G. (2017) The complex roles of STAT3 and STAT5 in maintaining redox balance: Lessons from STAT-mediated xCT expression in cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 451: 40-52.
43. Duek A, Lundberg P, Shimizu T, Grisouard J, Karow A, Kubovcakova L, Hao-Shen H, Dirnhofer S, Skoda RC. (2014) Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood*, 123(25): 3943-3950.
44. Chen E, Mullally A. (2014) How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014(1): 268-276.
45. Tefferi A, Vainchenker W. (2011) Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*, 29(5): 573-582.
46. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. (2016) The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. *Blood Rev*, 30(6): 453-459.
47. Saeidi K. (2016) Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Crit Rev Oncol Hematol*, 98: 375-389.
48. Teofili L, Martini M, Cenci T, Petrucci G, Torti L, Storti S, Guidi F, Leone G, Larocca LM. (2007) Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood*, 110(1): 354-359.
49. Barcelos MM, Santos-Silva MC. (2011) Molecular approach to diagnose BCR/ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 33(4): 290-296.
50. Skoda R. (2007) The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 1-10.
51. Passamonti F, Rumi E. (2009) Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica*, 94(1): 7-10.
52. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. (2006) Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and

- constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*, 107(9): 3676-3682.
53. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. (2006) Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*, 108(7): 2435-2437.
 54. Scott LM. (2011) The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol*, 86(8): 668-676.
 55. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 356(5): 459-468.
 56. Stanley RF, Steidl U. (2016) Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. *Cancer Discov*, 6(4): 344-346.
 57. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, Peisker F, Florescu N, Giannini S, Wolach O, Morgan EA, Tothova Z, Losman JA, Schneider RK, Al-Shahrour F, Mullally A. (2016) Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov*, 6(4): 368-381.
 58. Yokoyama M, Hirata K. (2005) New function of calreticulin: calreticulin-dependent mRNA destabilization. *Circ Res*, 97(10): 961-963.
 59. Cazzola M. (2016) Mutant calreticulin: when a chaperone becomes intrusive. *Blood*, 127(10): 1219-1221.
 60. He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. (2013) Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J Hematol Oncol*, 6: 11.
 61. Bennett M, Stroncek DF. (2006) Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Transl Med*, 4: 41.
 62. Nangalia J, Green TR. (2014) The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014(1): 287-296.
 63. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen

- M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, McCarroll SA. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371(26): 2477-2487.
64. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. (2014) Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 371(26): 2488-2498.
65. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. (2010) LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med*, 363(12): 1189-1190.
66. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., Merker JD, Zehnder JL, Nolan GP, Gotlib J. (2010) Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 116(6): 988-992.
67. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. (2010) LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*, 24(10): 1713-1718.
68. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, Marzac C, Le Couedic JP, Droin N, Chachoua I, Favier R, Diop MK, Ugo V, Casadevall N, Debili N, Raslova H, Bellanne-Chantelot C, Constantinescu SN, Bluteau O, Plo I, Vainchenker W. (2016) Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*, 127(3): 333-342.
69. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, Bagienski K, Kubsova B, Pietra D, Gisslinger B, Milanesi C, Jager R, Chen D, Berg T, Schalling M, Schuster M, Bock C, Constantinescu SN, Cazzola M, Kralovics R. (2016) Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2

- mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 127(3): 325-332.
70. Hermouet S, Vilaine M. (2011) The JAK2 46/1 haplotype: a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection? *Haematologica*, 96(11): 1575-1579.
 71. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. (2009) JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 41(4): 446-449.
 72. Andrikovics H, Nahajevszky S, Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Halm G, Lueff S, Lovas N, Matrai Z, Csomor J, Rasonyi R, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kozma A, Adam E, Fekete S, Masszi T, Tordai A. (2010) JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 24(10): 1809-1813.
 73. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, Elliott MA, Litzow MR, Hanson CA, Pardanani A. (2010) JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*, 24(1): 105-109.
 74. Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadóttir H, Thorlacius S, Aben KK, Blondal T, Thorgeirsson TE, Thorleifsson G, Kristjansson K, Thorisdóttir K, Ragnarsson R, Sigurgeirsson B, Skuladóttir H, Gudbjartsson T, Isaksson HJ, Einarsson GV, Benediktsdóttir KR, Agnarsson BA, Olafsson K, Salvarsdóttir A, Bjarnason H, Asgeirsdóttir M, Kristinsson KT, Matthiasdóttir S, Sveinsdóttir SG, Polidoro S, Hoiom V, Botella-Estrada R, Hemminki K, Rudnai P, Bishop DT, Campagna M, Kellen E, Zeegers MP, de Verdier P, Ferrer A, Isla D, Vidal MJ, Andres R, Saez B, Juberias P, Banzo J, Navarrete S, Tres A, Kan D, Lindblom A, Gurzau E, Koppova K, de Vegt F, Schalken JA, van der Heijden HF, Smit HJ, Termeer RA, Oosterwijk E, van Hooij O, Nagore E, Porru S, Steineck G, Hansson J, Buntinx F, Catalona WJ, Matullo G, Vineis P, Kiltie AE, Mayordomo JI, Kumar

- R, Kiemeny LA, Frigge ML, Jonsson T, Saemundsson H, Barkardottir RB, Jonsson E, Jonsson S, Olafsson JH, Gulcher JR, Masson G, Gudbjartsson DF, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. (2009) Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet*, 41(2): 221-227.
75. Calado RT, Regal JA, Hills M, Yewdell WT, Dalmazzo LF, Zago MA, Lansdorp PM, Hogge D, Chanock SJ, Estey EH, Falcao RP, Young NS. (2009) Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(4): 1187-1192.
76. Gramatges MM, Bertuch AA. (2013) Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. *Transl Res*, 162(6): 353-363.
77. Li C, Yin Z, Wu W, Li X, Zhou B. (2013) Genetic variants in TERT-CLPTM1L genetic region associated with several types of cancer: a meta-analysis. *Gene*, 526(2): 390-399.
78. Jager R, Harutyunyan AS, Rumi E, Pietra D, Berg T, Olcaydu D, Houlston RS, Cazzola M, Kralovics R. (2014) Common germline variation at the TERT locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*, 89(12): 1107-1110.
79. Tapper W, Jones AV, Kralovics R, Harutyunyan AS, Zoi K, Leung W, Godfrey AL, Guglielmelli P, Callaway A, Ward D, Aranaz P, White HE, Waghorn K, Lin F, Chase A, Baxter EJ, Maclean C, Nangalia J, Chen E, Evans P, Short M, Jack A, Wallis L, Oscier D, Duncombe AS, Schuh A, Mead AJ, Griffiths M, Ewing J, Gale RE, Schnittger S, Haferlach T, Stegelmann F, Dohner K, Grallert H, Strauch K, Tanaka T, Bandinelli S, Giannopoulos A, Pieri L, Mannarelli C, Gisslinger H, Barosi G, Cazzola M, Reiter A, Harrison C, Campbell P, Green AR, Vannucchi A, Cross NC. (2015) Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun*, 6: 6691.
80. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. (2007) The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of

- patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*, 136(5): 745-751.
81. Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. (2013) A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. *J Mol Diagn*, 15(5): 592-599.
 82. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernandez A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, Huntly B, Erber WN. (2010) Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol*, 149(2): 250-257.
 83. Bergamaschi GM, Primignani M, Barosi G, Fabris FM, Villani L, Reati R, Dell'era A, Mannucci PM. (2008) MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd-Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. *Blood*, 111(8): 4418.
 84. Andrikovics H, Nahajevszky S, Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Rásonyi R, Halm G, Lovas N, Lueff S, Egyed M, Várkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kozma A, Ádám E, Fekete S, Masszi T, Tordai A. (2010) JAK2 46/1 haplotípus mint a myeloproliferatív neoplasiák és a normal kariotípusú akut myeloid leukaemia közös rizikófaktora. *Hemat Transzf*, 43:277-287.
 85. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, Wild R, Sullivan K, Vijayakrishnan J, Wang Y, Pittman AM, Sunter NJ, Hall AG, Dyer MJ, Matutes E, Dearden C, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Hillmen P, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Allan JM, Catovsky D, Houlston RS. (2008) A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 40(10): 1204-1210.
 86. Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Broderick P, Chandler I, Houlston RS. (2012) Comprehensive evaluation of the impact of 14 genetic variants on colorectal cancer phenotype and risk. *Am J Epidemiol*, 175(1): 1-10.
 87. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, Awan A, Carter I, Goday-Fernandez A, Langabeer SE, Clench T, Clark J, Evans PA, Grimwade D, Schuh A, McMullin MF, Green AR, Harrison CN, Cross NC. (2013) Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines

- for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol*, 160(1): 25-34.
88. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, Kiladjian JJ, McMullin MF, Ruggeri M, Besses C, Vannucchi AM, Lippert E, Gisslinger H, Rumi E, Lehmann T, Ortman CA, Pietra D, Pascutto C, Haferlach T, Cazzola M. (2011) Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*, 117(10): 2813-2816.
 89. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E, Oppliger Leibundgut E, Cassinat B, Pallisgaard N, Maroc N, Hermouet S, Nickless G, Guglielmelli P, van der Reijden BA, Jansen JH, Alpermann T, Schnittger S, Bench A, Tobal K, Wilkins B, Cuthill K, McLornan D, Yeoman K, Akiki S, Bryon J, Jeffries S, Jones A, Percy MJ, Schwemmers S, Gruender A, Kelley TW, Reading S, Pancrazzi A, McMullin MF, Pahl HL, Cross NC, Harrison CN, Prechal JT, Chomienne C, Kiladjian JJ, Barbui T, Grimwade D. (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia*, 27(10): 2032-2039.
 90. Park JH, Sevin M, Ramla S, Truffot A, Verrier T, Bouchot D, Courtois M, Bas M, Benali S, Bailly F, Favre B, Guy J, Martin L, Maynadie M, Carillo S, Girodon F. (2015) Calreticulin Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: Comparison of Three Diagnostic Methods. *PLoS One*, 10(10): e0141010.
 91. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, Girsberger S, Lehmann T, Passweg J, Stern M, Beisel C, Kralovics R, Skoda RC. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123(14): 2220-2228.
 92. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Elena C, Casetti IC, Milanesi C, Sant'antonio E, Bellini M, Fugazza E, Renna MC, Boveri E, Astori C, Pascutto C, Kralovics R, Cazzola M. (2014) JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia

- with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 123(10): 1544-1551.
93. Li N, Yao QM, Gale RP, Li JL, Li LD, Zhao XS, Jiang H, Jiang Q, Jiang B, Shi HX, Chen SS, Liu KY, Huang XJ, Ruan GR. (2015) Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations. *Leuk Res*, 39(5): 510-514.
 94. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, Fanelli T, Bosi A, Vannucchi AM. (2014) Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*, 123(10): 1552-1555.
 95. Fu R, Xuan M, Zhou Y, Sun T, Bai J, Cao Z, Zhang L, Li H, Zhang D, Zhang X, Lv C, Xue F, Liu X, Yang R, Zhang L. (2014) Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia*, 28(9): 1912-1914.
 96. Guo H, Chen X, Tian R, Chang J, Li J, Tan Y, Xu Z, Ren F, Zhao J, Pan J, Zhang N, Wang X, He J, Yang W, Wang H. (2015) Frequencies, Laboratory Features, and Granulocyte Activation in Chinese Patients with CALR-Mutated Myeloproliferative Neoplasms. *PLoS One*, 10(9): e0138250.
 97. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Wolanskyj AP, Maffioli M, Casalone R, Pacilli A, Vannucchi AM, Passamonti F. (2014) Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol*, 89(8): E121-124.
 98. Sun C, Zhou X, Zou ZJ, Guo HF, Li JY, Qiao C. (2016) Clinical Manifestation of Calreticulin Gene Mutations in Essential Thrombocythemia without Janus Kinase 2 and MPL Mutations: A Chinese Cohort Clinical Study. *Chin Med J (Engl)*, 129(15): 1778-1783.
 99. Okabe M, Yamaguchi H, Usuki K, Kobayashi Y, Kawata E, Kuroda J, Kimura S, Tajika K, Gomi S, Arima N, Mori S, Ito S, Koizumi M, Ito Y, Wakita S, Arai K, Kitano T, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K. (2016) Clinical features of Japanese polycythemia vera and essential thrombocythemia patients harboring CALR,

- JAK2V617F, JAK2Ex12del, and MPLW515L/K mutations. *Leuk Res*, 40: 68-76.
100. Chi J, Nicolaou KA, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou A, Pierides C, Manoloukos M, Barbouti K, Melanthiou F, Prokopiou C, Vassiliou GS, Costeas P. (2014) Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*, 28(5): 1152-1154.
 101. Palandri F, Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Crugnola M, Martino B, Perricone M, Breccia M, Ottaviani E, Testoni N, Merli F, Aversa F, Alimena G, Cavo M, Martinelli G, Catani L, Baccarani M, Vianelli N. (2015) Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. *Leukemia*, 29(6): 1344-1349.
 102. Chen CC, Gau JP, Chou HJ, You JY, Huang CE, Chen YY, Lung J, Chou YS, Leu YW, Lu CH, Lee KD, Tsai YH. (2014) Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol*, 93(12): 2029-2036.
 103. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, Banescu C, Tevet M, Martin B, Murat M, Vesa SC, Dima D, Candea M, Militaru MS, Pop IV. (2015) CALR versus JAK2 mutated essential thrombocythaemia - a report on 141 patients. *Br J Haematol*, 168(1): 151-153.
 104. Kim BH, Cho YU, Bae MH, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Choi Y, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Park YM, Lee JK, Park CJ. (2015) JAK2 V617F, MPL, and CALR Mutations in Korean Patients with Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. *J Korean Med Sci*, 30(7): 882-888.
 105. Wu Z, Zhang X, Xu X, Chen Y, Hu T, Kang Z, Li S, Wang H, Liu W, Ma X, Guan M. (2014) The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol*, 7: 48.
 106. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Lee DS. (2015) CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable. *Am J Clin Pathol*, 143(5): 635-644.

107. Ben Said M, Gandrille S, Fischer AM, Darnige L. (2015) [Clinical and biological features of patients with essential thrombocythaemia according to their mutational status JAK2 or CALR: Single-center study of 40 patients and review of the literature]. *Pathol Biol (Paris)*, 63(3): 117-121.
108. Nunes DP, Lima LT, Chauffaille Mde L, Mitne-Neto M, Santos MT, Cliquet MG, Guerra-Shinohara EM. (2015) CALR mutations screening in wild type JAK2(V617F) and MPL(W515K/L) Brazilian myeloproliferative neoplasm patients. *Blood Cells Mol Dis*, 55(3): 236-240.
109. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, Biamonte F, Pardanani A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Fanelli T, Pietra D, Rumi E, Finke C, Gangat N, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, Bosi A, Pereira A, Manfredini R, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Vannucchi AM, Tefferi A. (2014) The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*, 28(9): 1804-1810.
110. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A. (2014) Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*, 28(7): 1568-1570.
111. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, Belachew AA, Pancrazzi A, Wassie EA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Vannucchi AM. (2014) CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia*, 28(7): 1494-1500.
112. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A. (2014) CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*, 28(7): 1472-1477.
113. Panagiota V, Thol F, Markus B, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Lehmann U, Koenecke C, Shahswar R, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Gohring G, Koenigsmann M, Kloos A, Trummer A, Schroeder T, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Kroger N, Heuser M.

- (2014) Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*, 28(7): 1552-1555.
114. Schnittger S, Bacher U, Eder C, Dicker F, Alpermann T, Grossmann V, Kohlmann A, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. (2012) Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow. *Haematologica*, 97(10): 1582-1585.
 115. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. (2014) An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 28(7): 1407-1413.
 116. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. (2005) Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(6): 2162-2168.
 117. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW. (2005) The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106(10): 3377-3379.
 118. Langabeer SE. (2012) Referral centre variation in requesting JAK2 V617F mutation analysis for the investigation of a myeloproliferative neoplasm. *J Clin Pathol*, 65(12): 1149-1150.
 119. Andrikovics H, Meggyesi N, Szilvasi A, Tamaska J, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kalasz L, Masszi T, Tordai A. (2009) HFE C282Y mutation as a genetic modifier influencing disease susceptibility for chronic myeloproliferative disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(3): 929-934.

120. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. (2014) CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. *Am J Hematol*, 89(5): 453-456.
121. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR. (2005) Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 366(9501): 1945-1953.
122. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM. (2008) Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*, 93(1): 41-48.
123. Wang J, Xu Z, Liu L, Gale RP, Cross NC, Jones AV, Qin T, Ai X, Xu J, Zhang T, Sun X, Li Q, Zhang P, Zhang Y, Xiao Z. (2013) JAK2V617F allele burden, JAK2 46/1 haplotype and clinical features of Chinese with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 27(8): 1763-1767.
124. Kjaer L, Cordua S, Holmstrom MO, Thomassen M, Kruse TA, Pallisgaard N, Larsen TS, de Stricker K, Skov V, Hasselbalch HC. (2016) Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. *PLoS One*, 11(10): e0165336.
125. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I, Broer L, Nyholt DR, Mateo Leach I, Salo P, Hagg S, Matthews MK, Palmen J, Norata GD, O'Reilly PF, Saleheen D, Amin N, Balmforth AJ, Beekman M, de Boer RA, Bohringer S, Braund PS, Burton PR, de Craen AJ, Denniff M, Dong Y, Douroudis K, Dubinina E, Eriksson JG, Garlaschelli K, Guo D, Hartikainen AL, Henders AK, Houwing-Duistermaat JJ, Kananen L, Karssen LC, Kettunen J, Klopp N, Lagou V, van Leeuwen EM, Madden PA, Magi R, Magnusson PK, Mannisto S, McCarthy MI, Medland SE, Mihailov E, Montgomery GW, Oostra BA, Palotie A, Peters A, Pollard H, Pouta A, Prokopenko I, Ripatti S, Salomaa V, Suchiman HE, Valdes AM, Verweij N, Vinuela A, Wang X, Wichmann HE, Widen E, Willemsen G, Wright MJ, Xia K,

- Xiao X, van Veldhuisen DJ, Catapano AL, Tobin MD, Hall AS, Blakemore AI, van Gilst WH, Zhu H, Erdmann J, Reilly MP, Kathiresan S, Schunkert H, Talmud PJ, Pedersen NL, Perola M, Ouwehand W, Kaprio J, Martin NG, van Duijn CM, Hovatta I, Gieger C, Metspalu A, Boomsma DI, Jarvelin MR, Slagboom PE, Thompson JR, Spector TD, van der Harst P, Samani NJ. (2013) Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet*, 45(4): 422-427, 427e421-422.
126. Sheng X, Tong N, Tao G, Luo D, Wang M, Fang Y, Li J, Xu M, Zhang Z, Wu D. (2013) TERT polymorphisms modify the risk of acute lymphoblastic leukemia in Chinese children. *Carcinogenesis*, 34(1): 228-235.
127. Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Sigurdsson A, Gudbjartsson DF, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Scherer D, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Botella-Estrada R, Soriano V, Juberias P, Saez B, Gilaberte Y, Fuentelsaz V, Corredera C, Grasa M, Hoiom V, Lindblom A, Bonenkamp JJ, van Rossum MM, Aben KK, de Vries E, Santinami M, Di Mauro MG, Maurichi A, Wendt J, Hochleitner P, Pehamberger H, Gudmundsson J, Magnusdottir DN, Gretarsdottir S, Holm H, Steinhorsdottir V, Frigge ML, Blondal T, Saemundsdottir J, Bjarnason H, Kristjansson K, Bjornsdottir G, Okamoto I, Rivoltini L, Rodolfo M, Kiemenev LA, Hansson J, Nagore E, Mayordomo JJ, Kumar R, Karagas MR, Nelson HH, Gulcher JR, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Olafsson JH, Kong A, Stefansson K. (2009) New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. *Nat Genet*, 41(8): 909-914.
128. Brenner DR, Brennan P, Boffetta P, Amos CI, Spitz MR, Chen C, Goodman G, Heinrich J, Bickeboller H, Rosenberger A, Risch A, Muley T, McLaughlin JR, Benhamou S, Bouchardy C, Lewinger JP, Witte JS, Chen G, Bull S, Hung RJ. (2013) Hierarchical modeling identifies novel lung cancer susceptibility variants in inflammation pathways among 10,140 cases and 11,012 controls. *Hum Genet*, 132(5): 579-589.
129. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, McLaughlin J, Shepherd F,

- Montpetit A, Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Vatten L, Njolstad I, Axelsson T, Chen C, Goodman G, Barnett M, Loomis MM, Lubinski J, Matyjasik J, Lener M, Oszutowska D, Field J, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, Gonzalez CA, Ramon Quiros J, Martinez C, Navarro C, Ardanaz E, Larranaga N, Kham KT, Key T, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulou A, Linseisen J, Boeing H, Hallmans G, Overvad K, Tjonneland A, Kumle M, Riboli E, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P. (2008) Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet*, 40(12): 1404-1406.
130. Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, Spitz MR, Eisen T, Amos CI, Houlston RS. (2008) Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet*, 40(12): 1407-1409.
131. Kinnersley B, Migliorini G, Broderick P, Whiffin N, Dobbins SE, Casey G, Hopper J, Sieber O, Lipton L, Kerr DJ, Dunlop MG, Tomlinson IP, Houlston RS. (2012) The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk. *Br J Cancer*, 107(6): 1001-1008.
132. Kote-Jarai Z, Olama AA, Giles GG, Severi G, Schleutker J, Weischer M, Campa D, Riboli E, Key T, Gronberg H, Hunter DJ, Kraft P, Thun MJ, Ingles S, Chanock S, Albanes D, Hayes RB, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Pharoah P, Schumacher F, Henderson BE, Stanford JL, Ostrander EA, Sorensen KD, Dork T, Andriole G, Dickinson JL, Cybulski C, Lubinski J, Spurdle A, Clements JA, Chambers S, Aitken J, Gardiner RA, Thibodeau SN, Schaid D, John EM, Maier C, Vogel W, Cooney KA, Park JY, Cannon-Albright L, Brenner H, Habuchi T, Zhang HW, Lu YJ, Kaneva R, Muir K, Benlloch S, Leongamornlert DA, Saunders EJ, Tymrakiewicz M, Mahmud N, Guy M, O'Brien LT, Wilkinson RA, Hall AL, Sawyer EJ, Dadaev T, Morrison J, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As N, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Cooper CS, Lophatonanon A, Southey MC, Hopper JL, English DR, Wahlfors T, Tammela TL, Klarskov P, Nordestgaard BG, Roder MA, Tybjaerg-Hansen A, Bojesen SE, Travis R,

- Canzian F, Kaaks R, Wiklund F, Aly M, Lindstrom S, Diver WR, Gapstur S, Stern MC, Corral R, Virtamo J, Cox A, Haiman CA, Le Marchand L, Fitzgerald L, Kolb S, Kwon EM, Karyadi DM, Orntoft TF, Borre M, Meyer A, Serth J, Yeager M, Berndt SI, Marthick JR, Patterson B, Wokolorczyk D, Batra J, Lose F, McDonnell SK, Joshi AD, Shahabi A, Rinckleb AE, Ray A, Sellers TA, Lin HY, Stephenson RA, Farnham J, Muller H, Rothenbacher D, Tsuchiya N, Narita S, Cao GW, Slavov C, Mitev V, Easton DF, Eeles RA. (2011) Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet*, 43(8): 785-791.
133. Haiman CA, Chen GK, Vachon CM, Canzian F, Dunning A, Millikan RC, Wang X, Ademuyiwa F, Ahmed S, Ambrosone CB, Baglietto L, Balleine R, Bandera EV, Beckmann MW, Berg CD, Bernstein L, Blomqvist C, Blot WJ, Brauch H, Buring JE, Carey LA, Carpenter JE, Chang-Claude J, Chanock SJ, Chasman DI, Clarke CL, Cox A, Cross SS, Deming SL, Diasio RB, Dimopoulos AM, Driver WR, Dunnebie T, Durcan L, Eccles D, Edlund CK, Ekici AB, Fasching PA, Feigelson HS, Flesch-Janys D, Fostira F, Forsti A, Fountzilas G, Gerty SM, Giles GG, Godwin AK, Goodfellow P, Graham N, Greco D, Hamann U, Hankinson SE, Hartmann A, Hein R, Heinz J, Holbrook A, Hoover RN, Hu JJ, Hunter DJ, Ingles SA, Irwanto A, Ivanovich J, John EM, Johnson N, Jukkola-Vuorinen A, Kaaks R, Ko YD, Kolonel LN, Konstantopoulou I, Kosma VM, Kulkarni S, Lambrechts D, Lee AM, Marchand LL, Lesnick T, Liu J, Lindstrom S, Mannermaa A, Margolin S, Martin NG, Miron P, Montgomery GW, Nevanlinna H, Nickels S, Nyante S, Olswold C, Palmer J, Pathak H, Pectasides D, Perou CM, Peto J, Pharoah PD, Pooler LC, Press MF, Pylkas K, Rebbeck TR, Rodriguez-Gil JL, Rosenberg L, Ross E, Rudiger T, Silva Idos S, Sawyer E, Schmidt MK, Schulz-Wendtland R, Schumacher F, Severi G, Sheng X, Signorello LB, Sinn HP, Stevens KN, Southey MC, Tapper WJ, Tomlinson I, Hogervorst FB, Wauters E, Weaver J, Wildiers H, Winqvist R, Van Den Berg D, Wan P, Xia LY, Yannoukakos D, Zheng W, Ziegler RG, Siddiq A, Slager SL, Stram DO, Easton D, Kraft P, Henderson BE, Couch FJ. (2011) A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. *Nat Genet*, 43(12): 1210-1214.

134. Kratz CP, Han SS, Rosenberg PS, Berndt SI, Burdett L, Yeager M, Korde LA, Mai PL, Pfeiffer R, Greene MH. (2011) Variants in or near KITLG, BAK1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular germ cell tumour. *J Med Genet*, 48(7): 473-476.
135. Gago-Dominguez M, Jiang X, Conti DV, Castelao JE, Stern MC, Cortessis VK, Pike MC, Xiang YB, Gao YT, Yuan JM, Van Den Berg DJ. (2011) Genetic variations on chromosomes 5p15 and 15q25 and bladder cancer risk: findings from the Los Angeles-Shanghai bladder case-control study. *Carcinogenesis*, 32(2): 197-202.
136. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, Simon M, Marie Y, Boisselier B, Delattre JY, Hoang-Xuan K, El Hallani S, Idhahbi A, Zelenika D, Andersson U, Henriksson R, Bergenheim AT, Feychting M, Lonn S, Ahlbom A, Schramm J, Linnebank M, Hemminki K, Kumar R, Hepworth SJ, Price A, Armstrong G, Liu Y, Gu X, Yu R, Lau C, Schoemaker M, Muir K, Swerdlow A, Lathrop M, Bondy M, Houlston RS. (2009) Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet*, 41(8): 899-904.
137. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, Camp NJ, Nieters A, Wang Z, Cozen W, Monnereau A, Wang SS, Kelly RS, Lan Q, Teras LR, Chatterjee N, Chung CC, Yeager M, Brooks-Wilson AR, Hartge P, Purdue MP, Birmann BM, Armstrong BK, Cocco P, Zhang Y, Severi G, Zeleniuch-Jacquotte A, Lawrence C, Burdette L, Yuenger J, Hutchinson A, Jacobs KB, Call TG, Shanafelt TD, Novak AJ, Kay NE, Liebow M, Wang AH, Smedby KE, Adami HO, Melbye M, Glimelius B, Chang ET, Glenn M, Curtin K, Cannon-Albright LA, Jones B, Diver WR, Link BK, Weiner GJ, Conde L, Bracci PM, Riby J, Holly EA, Smith MT, Jackson RD, Tinker LF, Benavente Y, Becker N, Boffetta P, Brennan P, Foretova L, Maynadie M, McKay J, Staines A, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS, Lanasa MC, Spector LG, Leis JF, Cunningham JM, Weinberg JB, Morrison VA, Caporaso NE, Norman AD, Linet MS, De Roos AJ, Morton LM, Severson RK, Riboli E, Vineis P, Kaaks R, Trichopoulos D, Masala G, Weiderpass E, Chirlaque MD, Vermeulen RC, Travis RC, Giles GG, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Clavel J, Zheng T, Holford TR, Offit K,

- Zelenetz A, Klein RJ, Spinelli JJ, Bertrand KA, Laden F, Giovannucci E, Kraft P, Krickler A, Turner J, Vajdic CM, Ennas MG, Ferri GM, Miligi L, Liang L, Sampson J, Crouch S, Park JH, North KE, Cox A, Snowden JA, Wright J, Carracedo A, Lopez-Otin C, Bea S, Salaverria I, Martin-Garcia D, Campo E, Fraumeni JF, Jr., de Sanjose S, Hjalgrim H, Cerhan JR, Chanock SJ, Rothman N, Slager SL. (2013) Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 45(8): 868-876.
138. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJ, Holroyd A, Wang Y, Sunter NJ, Mansouri L, Juliusson G, Smedby KE, Roos G, Jayne S, Majid A, Dearden C, Hall AG, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Rosenquist R, Catovsky D, Allan JM, Houlston RS. (2014) A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 46(1): 56-60.
139. Trifa AP, Banescu C, Tevet M, Bojan A, Dima D, Urian L, Torok-Vistai T, Popov VM, Zdrengea M, Petrov L, Vasilache A, Murat M, Georgescu D, Popescu M, Patrinoiu O, Balea M, Costache R, Coles E, Saguna C, Berbec N, Vladareanu AM, Mihaila RG, Bumbea H, Cucuianu A, Popp RA. (2016) TERT rs2736100 A>C SNP and JAK2 46/1 haplotype significantly contribute to the occurrence of JAK2 V617F and CALR mutated myeloproliferative neoplasms - a multicentric study on 529 patients. *Br J Haematol*, 174(2): 218-226.
140. Dahlstrom J, Liu T, Yuan X, Saft L, Ghaderi M, Wei YB, Lavebratt C, Li P, Zheng C, Bjorkholm M, Xu D. (2016) TERT rs2736100 genotypes are associated with differential risk of myeloproliferative neoplasms in Swedish and Chinese male patient populations. *Ann Hematol*, 95(11): 1825-1832.
141. Mosrati MA, Willander K, Falk IJ, Hermanson M, Hoglund M, Stockelberg D, Wei Y, Lotfi K, Soderkvist P. (2015) Association between TERT promoter polymorphisms and acute myeloid leukemia risk and prognosis. *Oncotarget*, 6(28): 25109-25120.
142. Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, Nakamura Y, Kamatani N. (2010) Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat Genet*, 42(3): 210-215.

143. Frederiksen H, Farkas DK, Christiansen CF, Hasselbalch HC, Sorensen HT. (2011) Chronic myeloproliferative neoplasms and subsequent cancer risk: a Danish population-based cohort study. *Blood*, 118(25): 6515-6520.
144. Pettersson H, Knutsen H, Holmberg E, Andreasson B. (2015) Increased incidence of another cancer in myeloproliferative neoplasms patients at the time of diagnosis. *Eur J Haematol*, 94(2): 152-156.
145. Hasselbalch HC. (2015) Perspectives on the increased risk of second cancer in patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Eur J Haematol*, 94(2): 96-98.
146. Baerlocher GM, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, Roth A, Daskalakis M, Burington B, Stuart M, Snyder DS. (2015) Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. *N Engl J Med*, 373(10): 920-928.
147. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, Finke CM, Laborde RR, Wassie E, Schimek L, Hanson CA, Gangat N, Wang X, Pardanani A. (2015) A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *N Engl J Med*, 373(10): 908-919.
148. Armanios M, Greider CW. (2015) Treating Myeloproliferation--On Target or Off? *N Engl J Med*, 373(10): 965-966.

9 Saját publikációk jegyzéke

9.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Krahling T, Balassa K, Kiss KP, Bors A, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Remenyi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Co-occurrence of myeloproliferative neoplasms and solid tumors is attributed to a synergism between cytoreductive therapy and the common TERT polymorphism rs2736100. *CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION* 25:(1) pp. 98-104. (2016) **IF**²⁰¹⁶: 4,142

Krahling T, Balassa K, Meggyesi N, Bors A, Csomor J, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Reményi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Komplex molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus myeloproliferatív neoplasiák diagnosztikájában. *ORVOSI HETILAP* 155:(52) pp. 2074-2081. (2014)

Andrikovics H, **Krahling T**, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, Batai A, Dolgos J, Csomor J, Egyed M, Sipos A, Remenyi P, Tordai A, Masszi T. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *HAEMATOLOGICA* 99:(7) pp. 1184-1190. (2014) **IF**²⁰¹⁴: 5,814

9.2 A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények

Balassa K, **Krahling T**, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, Torbagyi E, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Varga G, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *LEUKEMIA & LYMPHOMA* 58(2) pp. 391-398. (2017) **IF**²⁰¹⁶: 2,755

Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Batai A, Csacsovszki O, Lehoczky E, Adam E, Kozma A, Lovas N, Sipos A, **Krahling T**, Dolgos J, Remenyi P, Fekete S, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Medium-sized FLT3 internal tandem duplications confer worse prognosis than short and long duplications in a non-elderly acute myeloid leukemia cohort. *LEUKEMIA & LYMPHOMA* 55:(7) pp. 1510-1517. (2014) **IF**²⁰¹⁴: 2,891

10 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Andrikovics Hajnalkának, aki bevezetett a molekuláris genetika tudományába, és megismertetett a kutatói hivatás szépségeivel, nehézségeivel. Köszönöm, hogy idejét nem sajnálva folyamatos konzultációs lehetőséget biztosított számomra, és határtalan türelemmel mind emberi, mind szakmai támogatásával segítette témám feldolgozását. Fontos kiemelnem továbbá Dr. Tordai Attila doktori tanulmányaim során nyújtott minden segítségét, szakmai hozzájárulását.

Köszönettel tartozom munkahelyemnek, az Országos Vérellátó Szolgálat Molekuláris Diagnosztikai Laboratóriumának, és az itt dolgozó kollégáimnak. Szeretném kifejezni hálámat és nagyrabecsülésemet munkatársaimnak (Dr. Balassa Katalinnak, Dr. Bors Andrásnak, Dr. Magdalena Koszarska-nak és Dr. Meggyesi Nórának), akik egy számomra új tudományterület megismerése során türelemmel támogattak, gyakorlati tanácsokkal láttak el, és pozitív, vidám munkahelyi légkört teremtettek. Külön köszönet illeti a szakasszisztenseket (Csehné Bánhidi Klárát, Haluska Brigittát, Mezibroczy Martinát, Petró Péterné Csillát, Pfundt Antalné Júliát), akik precíz munkájukkal odaadással segítették az előrehaladásomat.

Betegcsoportunk klinikai adatainak retrospektív összegyűjtése az Egyesített Szent István és Szent László Kórház (ESZSZK) Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályán, valamint a kaposvári Kaposi Mór Kórházban történt, amely Dr. Batai Árpád, Dr. Csacsovsky Ottó, Dr. Dolgos János, Dr. Fekete Sándor, Dr. Gopcsa László, Dr. Halm Gabriella, Dr. Lehoczky Enikő, Dr. Lovas Nóra, Dr. Mátrai Zoltán, Dr. Mikala Gábor, Dr. Nahajevszky Sarolta, Dr. Reichardt Judit, Dr. Reményi Péter, Dr. Sipos Andrea, valamint Dr. Egyed Miklós érdeme. Külön kiemelném Prof. Dr. Masszi Tamás támogatását, hogy az ESZSZK Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztályán a kutatás létrejöhetett. A szövettani vizsgálatokat az ESZSZK Patológiai Osztályán Dr. Csomor Judit; a citogenetikai vizsgálatokat a Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály Citogenetikai Laboratóriumában Dr. Ádám Emma és Dr. Kozma András végezték.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családom kitartó támogatását. Külön köszönöm szüleimnek a nyugodt órákat, napokat, amelyeket a disszertációm megírásához biztosítottak.