

**Örökletes és szerzett genetikai tényezők szerepének vizsgálata  
myeloid hematopoietikus őssejtbetegségek  
patomechanizmusában**

Doktori értekezés

**Meggyesi Nóra**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD és  
Dr. Tordai Attila, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Szakács Gergely, PhD  
Dr. Kiss András, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet, egyetemi tanár, az MTA  
levelező tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bán Zoltán, egyetemi tanársegéd, PhD  
Dr. Béres Judit, PhD

Budapest  
2011

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1. Bevezetés</b> .....	5
1.1 Myeloproliferatív neopláziák – irodalmi háttér.....	6
1.2 Akut myeloid leukémia – irodalmi háttér.....	15
<b>2. Célkitűzések</b> .....	19
<b>3. Módszerek</b> .....	21
3.1. Vizsgált egyének.....	21
3.2 Nukleinsav izolálás.....	23
3.3 Citogenetikai vizsgálat .....	24
3.4 A BCR-ABL tirozin kináz domén mutáció kimutatása.....	24
3.5 A BCR-ABL 7. exon deléció kimutatása .....	25
3.6 A JAK2 V617F mutáció kimutatása.....	27
3.8 A JAK2 46/1 haplotípus vizsgálata .....	27
3.9 Statisztikai feldolgozás.....	28
<b>4. Eredmények</b> .....	29
4.1 A BCR-ABL TKD mutációk és további kromoszóma eltérések szerepe CML-ben..	29
4.2 A BCR-ABL 7. exon deléció szerepe CML-ben.....	36
4.4 A JAK2 V617F mutáció vizsgálata BCR-ABL negatív MPN-ban .....	42
4.4 A JAK2 46/1 haplotípus vizsgálata BCR-ABL negatív MPN-ban és AML-ban .....	45
4.5 A JAK2 46/1 haplotípus prognosztikai szerepe AML-ben .....	52
<b>5. Megbeszélés</b> .....	58
5.1 Myeloproliferatív neopláziák .....	58
5.2 Akut myeloid leukémia .....	66
<b>6. Következtetések</b> .....	71
<b>7. Összefoglalás</b> .....	73
<b>8. Summary</b> .....	73
<b>9. Irodalomjegyzék</b> .....	74
<b>10. Saját publikációk jegyzéke</b> .....	93
<b>11. Köszönetnyilvánítás</b> .....	95

**Rövidítések jegyzéke**

ABL	Abelson tirozin kináz
ACA	additional chromosome abnormalities – a Philadelphia kromoszóma mellé társuló kromoszómaeltérések
AF	allélfrekvencia
ALL	akut lymphoid leukémia
AML	akut myeloid leukémia
AP	akcelerált fázis
AS	alternatív splicing
BCR	breakpoint cluster region gén
BCR-ABL	breakpoint cluster region-Abelson fúziós gén
BP	blasztos fázis
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CML	krónikus myeloid leukémia
CI	konfidencia intervallum
CP	krónikus fázis
CR	complete remission (teljes remisszió)
DFS	disease free survival (betegségmentes túlélés)
EFS	event free survival (eseménymentes túlélés)
EJC	exon junction complex
ET	essentialis thrombocythemia
FISH	fluoreszcencia in situ hibridizáció
FLT3	3. típusú, fms-szerű tirozin kináz
IBD	inflammatory bowel disease (gyulladásos bélbetegség)
ITD	internal tandem duplikáció
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
JAK2	2. típusú Janus kináz
MPN	myeloproliferatív neoplázia
NK-AML	normál karyotipusú akut myeloid leukémia
NPM1	nucleophosmin 1

OR	odds ratio (esélyhányados)
OS	overall survival (összesített túlélés)
NMD	nonsense mediated decay
PCR	polimeráz láncreakció
PDGFR	platelet derived growth factor receptor (thrombocyta eredetű növekedési faktor receptor)
Ph+	Philadelphia kromoszóma pozitív
PMF	primer myelofibrosis
PTC	premature termination codon – korai stop kodon
PV	polycythemia vera
Q-PCR	kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció
SNP	single nucleotide polymorphism
TKD	tirozin kináz domén
TKI	tirozin kináz inhibitor
UPD	uniparentális diszómia
UPR	unfolded protein response
V617F	a JAK2 gén 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje
vs.	versus
$\Delta$ exon7	7. exon deléción
+Ph	Philadelphia kromoszóma duplikáció

## 1. Bevezetés

A myeloid hematopoietikus őssejtbetegségek genetikai háttere igen heterogén, örökletes és szerzett eltérések is szerepet játszhatnak kialakulásukban. A szerzett genetikai eltéréseket két csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportba azok a mutációk tartoznak, amelyek proliferációs előnyt biztosítanak a sejteknek, vagyis egyes sejtípusok szabályozatlanul, konstitutív aktivitással osztódnak. A másik csoportba a sejtek differenciációját gátló mutációk tartoznak, és a differenciációs blokk következménye a kóros érési alakok megjelenése a csontvelőben és az érett sejtek számának csökkenése a periférián. A különböző myeloid sejtvonalak differenciált sejtjeinek felszaporodásával járó heterogén betegségcsoport a myeloproliferatív neopláziák (MPN) csoportja, míg az érett sejtek hiányával járó betegség a myelodysplasias szindróma (MDS). Előfordul, hogy a kétféle típusú mutáció együtt alakul ki azonos sejtben, ekkor az éretlen sejtek szabályozatlan osztódása következtében akut myeloid leukémia (AML) alakul ki [1].

A sejtek szabályozatlanul fokozott proliferációjáért gyakran a tirozin kinázok, illetve az általuk aktivált jelátviteli útvonalak fehérjéinek mutációi a felelősek.

A tirozin kinázok (TK) két csoportba sorolhatók. A receptor tirozin kinázok transzmembrán fehérjék, melyek egy ligandumot kötő extracelluláris domént és egy katalitikus intracelluláris kináz domént tartalmaznak, míg a nem receptor tirozin kinázoknál hiányoznak a transzmembrán domének és a citoszólban, a sejtmagban, illetve a plazma membrán belső felületén található. Mindkét típusú TK enzimatis aktivitása szorosan kontrollált. A TK-ok kináz doménja egy N-terminális ATP-kötő helyből és egy C-terminális aktivációs hurokból áll, a kettő közé, a katalitikus helyre kötődik a polipeptid szubsztrát.

A receptor tirozin kinázok aktivációja a ligandnak a TK extracelluláris doménjéhez való kötődésével történik meg, aminek következtében a receptor oligomerizálódik, majd bekövetkezik a receptoron található tirozin aminosavak autofoszforilációja. Ezután a receptor tirozin kináz további intracelluláris jelátvivő fehérjék komplementer szekvenciáival létesít kapcsolatot, amelyek aztán közvetlenül, vagy közvetve befolyásolják a sejt szintű folyamatokat. A nem receptor tirozin kinázok aktivációjához más kinázok általi

foszforiláció, valamint az inhibitoraik különböző intracelluláris szignálok miatt bekövetkező lebomlása szükséges. Hematológiai malignus megbetegedésekben a TK aktiváció létrejöhet ligand kötődése nélkül, a receptor vagy nem receptor TK-ok aktiváló mutációja, vagy egy partner fehérjével való fúziója következtében, ez utóbbi általában egy kiegyensúlyozott kromoszóma transzlokáció eredménye. A partner fehérjének gyakori jellemzője egy olyan domén, amely a TK konstitutív oligomerizációját okozza, ami miatt autofoszforiláció és aktiváció jön létre [2]. A kóros aktivitású TK-ok kis molekulású célzott tirozin kináz inhibitorokkal (TKI) gátolhatóak. A TKI-k működésének elve, hogy az ATP kötő helyet blokkolják, ezáltal a tirozin kináz nem képes az ATP-ből származó foszfát csoport segítségével a szubsztrát foszforiláció általi aktivációjára.

Az egyes betegségek kialakulásában a jelátviteli útvonalaknak nem csak a szerzett, hanem az örökletes mutációi is szerepet játszhatnak. Ezek a mutációk befolyásolhatják a betegség fenotípusát, kimenetelét, hajlamosító- illetve védőfaktorok lehetnek. A molekuláris genetikai vizsgálatoknak mind az örökletes, mind pedig a szerzett mutációk vizsgálatában fontos szerepe van. Egy-egy betegség-specifikus genetikai eltérés kimutatása jelenleg már kulcsfontosságú eleme a diagnózisnak homogén genetikai háttérű betegségek esetén, heterogén háttérű betegségek esetén pedig a prognózis becslésnek, a célzott terápia kiválasztásának és a terápiás válasz követésének. Az örökletes és szerzett genetikai faktorok felmérése lehetővé teszi a betegség pontosabb megismerését és személyre szabott célzott terápia kialakítását.

### 1.1 Myeloproliferatív neopláziák – irodalmi háttér

Myeloproliferatív neopláziáknak (MPN) az érett myeloid sejtek felszaporodásával járó betegségeket nevezünk. A MPN-on belül elkülöníthető a krónikus myeloid leukémia (CML), a polycythemia vera (PV), a primer myelofibrosis (PMF), az essentialis thrombocythemia (ET), valamint a krónikus neutrophil leukémia, a krónikus eosinophil leukémia (CEL), a mastocytosis és a máshova nem besorolható myeloproliferatív neopláziák [3]. A különböző betegségcsoportokra különböző típusú sejtek szabályozatlan proliferációja jellemző. CML-ben a fehérvérsejtek száma emelkedik, PV-ben a

vörösvérsejtek, ET-ben a thrombocyták, PMF-ban pedig a granulocyták és a megakaryocyták sejtek felszaporodása jellemző. A myeloproliferatív kórképek közül először a CML és a CEL genetikai háttere volt ismert. CML-ben a 9. és 22. kromoszómát érintő reciprok transzlokáció [t(9;22)(q34;q11); Philadelphia kromoszóma (Ph<sup>+</sup>), BCR-ABL fúzió] a betegek mintegy 98%-ában, CEL-ben a 4. kromoszóma intersticiális deléciója [del(4q12); FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fúzió] a betegek közel felében igazolható [4]. PV-ben, ET-ben és PMF-ben a 2. típusú Janus kináz (JAK2) aktiváló pontmutációját (V617F) azonosították [5-8], amelynek hasonlóan fontos szerepe van a BCR-ABL negatív MPN diagnosztikai algoritmusában, mint a BCR-ABL kimutatásnak CML-ben. Az ABL és a JAK2 is a nem receptor tirozin kinázok csoportjába tartozik, míg a PDGFR $\alpha$  (platelet derived growth factor receptor alfa) receptor tirozin kináz.

#### 1.1.1 BCR-ABL pozitív MPN - Krónikus myeloid leukémia (CML)

A krónikus myeloid leukémia a myeloid neopláziák csoportjába tartozó, pluripotens hematopoietikus őssejt eredetű daganatos megbetegedés. Incidenciája 1,06-1,1/100 000 lakos/év. A CML típusosan a középkorúak betegsége, a betegek átlagéletkora 50 év, mintegy negyedük 60 évnél idősebb. Férfiakban másfélszer gyakoribb, mint nőkben.

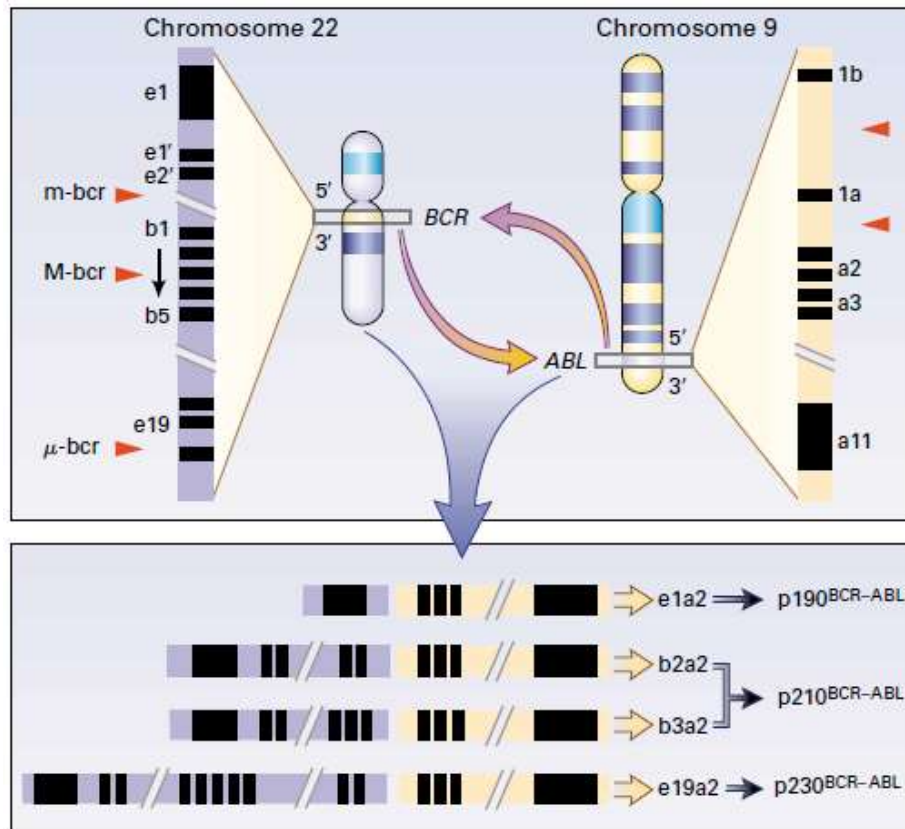
A CML természetes lefolyása három szakaszból áll, amelyekre eltérő klinikai tünetek jellemzők. Krónikus fázisban (CP) fehérvérsejt szám emelkedés és splenomegália észlelhető, ezen kívül enyhe általános tünetek, mint pl. fáradékonyság, fogyás, étvágytalanság jelentkezhetnek, de a betegek 30-40%-a tünetmentes. Akcelerált fázisban (AP) jellemző tünet a fehérvérsejt szám további emelkedése, láz, éjszakai izzadás, fogyás, progresszív splenomegália, valamint gyakori a mérsékelt anémia. A blasztos fázis (BP) morfológiailag az akut leukémiához hasonló állapot. A csontvelőben és/vagy a perifériás vérben a blasztok száma meghaladja a 20%-ot. Egyes esetekben a blasztos transzformáció előfordulhat extramedulláris szövetekben, például a bőrben, nyirokcsomóban, a lépben, vagy a központi idegrendszerben [9, 10]. A CML kezelése 2000 előtt alfa-interferonnal, valamint hydroxyureával vagy busulfannal történt. Teljes gyógyulást csak a csontvelő transzplantáció biztosíthatott, ha a beteg rendelkezett hisztokompatibilis donorral. A legjobb eredményt akkor érték el, ha a krónikus fázisban az első 12-18 hónapban végezték

a csontvelő transzplantációt. A kezeléssel kapcsolatos halálozás leggyakoribb oka a graft versus host betegség volt. Ma a krónikus myeloid leukémia standard első-vonalbeli kezelése, valamint a Ph<sup>+</sup> akut lymphoid leukémia (ALL) kezelésének része a célzott tirozin kináz inhibitor (TKI), az imatinib mesylate, vagy Glivec [11].

#### *1.1.1.1 A BCR-ABL transzlokáció szerepe CML-ben*

A betegség hátterében a 9. és 22. kromoszómát érintő reciprok transzlokáció [t(9;22)(q34;q11)] során létrejött BCR-ABL fúziós gén által kódolt kiméra fehérje fokozott és szabályozatlan tirozin kináz aktivitása áll. A transzlokáció során a 9. kromoszóma hosszú karján lévő ABL gén (Abelson) egy része fuzionál a 22. kromoszóma hosszú karján található BCR (breakpoint cluster region) gén egy szakaszával. A transzlokáció következtében létrejött abnormális 22. kromoszómát Philadelphia (Ph) kromoszómának nevezük. Az ABL gén konstans törésponttal rendelkezik (1. intron, ritkán 2. exon), azonban a BCR gén különböző régiókban törhet, ezáltal különböző fúziós gének és géntermékek jönnek létre. Az 1. intronban bekövetkező törés esetén minor (m-BCR), a 13. vagy a 14. intronokban bekövetkező törés esetén major (M-BCR) és a 19. intronban bekövetkezett törés esetén mikro töréspontról ( $\mu$ -BCR) beszélünk (1.ábra).





**1. ábra** A  $t(9;22)(q34;q11)$  transzlokáció CML-ben. A megrövidült 22. kromoszómát Philadelphia (Ph) kromoszómának nevezzük. Az ábrán a piros nyilhegyek jelölik a lehetséges töréspontokat. Attól függően, hogy a BCR gén hol törik, különböző méretű BCR fragmensek kapcsolódnak az ABL gén 3' végéhez. Ennek következtében különböző méretű mRNS molekulák jönnek létre (e1a2, b2a2, b3a2, és e19a2), amelyek különböző méretű kiméra fehérjéket kódolnak (p190, p210, and p230) [12].

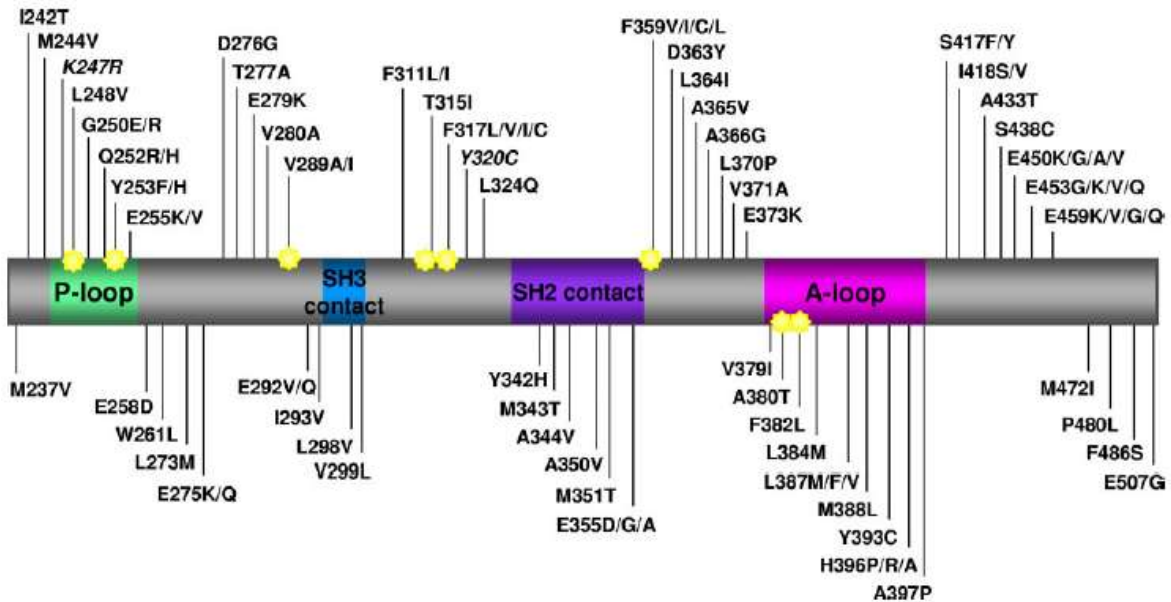
Rövidítések: m-bcr, minor töréspont; M-bcr, major töréspont;  $\mu$ -bcr, mikro töréspont.

A CML krónikus fázisból akcelerált vagy blasztos fázisba való transzformációjakor a Philadelphia kromoszóma mellé további citogenetikai eltérések társulhatnak. A leggyakoribb társuló kromoszómaeltérések (additional chromosome abnormalities – ACA) a Ph kromoszóma duplikáció (+Ph), a 8. kromoszóma triszómiája (+8) és az izokromoszóma 17q [i(17q)]. A BCR-ABL fúziós gén kimutatása fluoreszcens in-situ hibridizációval (FISH), valamint molekuláris genetikai módszerekkel (reverz transzkripciót követő PCR-rel) egyaránt lehetséges.

A CML-t egyéb myeloproliferatív betegségektől a Philadelphia kromoszóma, illetve a BCR-ABL fúziós gén jelenléte különíti el. A BCR-ABL fúziós gén azonban nem csak a CML-re jellemző, a felnőttkori B-ALL-ek (B sejtes akut lymphoid leukémiák) 20-40%-a, míg a gyermekkori B-ALL-ek 2-5 %-a hordozza. Philadelphia pozitív (Ph+) ALL-ben az esetek kb. egyharmad részében a töréspont a CML-lel ellentétben nem a BCR gén „major” régiójában (M-BCR), hanem az úgynevezett „minor” régióban (m-BCR) van [13].

Az imatinib egy kis molekulájú szignál transzdukció inhibitor, amellyel szelektíven gátolható több tirozin kináz is, mint az ABL, a KIT, a PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), valamint ezek onkogén formái, például a BCR-ABL [14]. Az imatinib úgy gátolja a BCR-ABL tirozin kináz fokozott aktivitását, hogy kötődik az inaktív formához és blokkolja az ATP kötő helyet, ezáltal a konformáció változás az aktív formába nem mehet végbe [15]. A CML korábbi standard kezelésével (interferon+cytarabin) történt összehasonlító vizsgálat azt mutatta, hogy az imatinibbel kezelt betegeknél szignifikánsan jobb mind az összesített, mind pedig a progressziómentes túlélés, azonban a betegek egy részénél rezisztencia alakulhat ki a tirozin kináz inhibitorral szemben [16]. Számos rezisztencia mechanizmust írtak le eddig, amelyeket két csoportba sorolhatunk: BCR-ABL függő illetve BCR-ABL független mechanizmusok. A BCR-ABL függő mechanizmusok csoportjába tartozik a BCR-ABL duplikáció és a BCR-ABL TKD mutációk. Az imatinib rezisztencia hátterében elsősorban a tirozin kináz domén (TKD) mutációk állhatnak, azonban az SH2-SH3 domének vizsgálatakor is találtak olyan mutációt, amely összefüggésben volt a relapszussal [17]. Eddig több, mint 90 különböző féle BCR-ABL TKD mutációt írtak le, amely több, mint 60 aminosavat érinthet. Ezek közül 15 aminosav cseréje kb. 85%-át, míg 7 aminosav cseréje mintegy 2/3 részét teszi ki az összes mutációnak. A leggyakoribb pozíciók a következők: G250, Y253, E255, T315, M351, F359, és H396. A BCR-ABL TKD szerkezeti elemei a P-loop (ATP kötő hurok), a katalitikus domén (SH3, SH2 kötő helyek) és az aktivációs hurok, amely a kináz aktiválást/inaktiválást szabályozza. Az ABL gén 944. pozíciójában egy C →T nukleotid csere miatt a 315. aminosav pozícióban létrejövő treonin – izoleucin cserének (Thr315→Ile315; T315I) kiemelt szerepe van, ennek következtében az imatinib és a BCR-ABL kináz közötti hidrogén kötéshez szükséges oxigén molekula eliminálódik, valamint az izoleucin

szterikus gátlása miatt az imatinib nem képes kötődni a BCR-ABL-hez. A BCR-ABL tirozin kináz domén sematikus rajzát és az imatinib rezisztenciában érintett mutációkat az 2. ábrán tüntettük fel.



**2. ábra** A BCR-ABL TKD imatinib rezisztens klinikai mintákban azonosított aminosavcserei.

Jelmagyarázat, rövidítések: A TKD szerkezeti elemei: P-loop, ATP kötő hely; SH3 kontakt hely, SH2 kontakt hely, A-loop, aktivációs hely. Az imatinib kötésben hidrogén-híd, vagy van der Waals kötéssel résztvevő aminosav pozíciókat csillaggal jelöltük. A K247R és az Y320C polimorfizmus, nem pedig mutáció. Az adatok 2001-2009 közötti publikált eredményeket áttekintő összefoglaló közleményből származnak [18].

Genetikai instabilitást és imatinib rezisztenciát okoznak továbbá a Ph kromoszóma mellé társuló további kromoszóma eltérések (ACA), vagy a klonális evolúció. Az ACA, illetve a BCR-ABL P-loop szakaszát vagy a T315 kodont érintő mutációk szignifikánsan rosszabb túlélést eredményeznek a betegeknél [19-25].

A BCR-ABL-től független rezisztencia mechanizmusok közé tartozik az export fehérjék [P-glikoprotein (Pgp), multidrog rezisztencia (MDR)] expressziójának növekedése, ami miatt a nem rezisztens sejteknél gyorsabban jut ki a gyógyszer a sejtekből; az alacsony humán organikus kation transzporter 1 (hOCT1) aktivitás, amelynek

következtében kevés gyógyszer jut be a sejtekbe; valamint az  $\alpha 1$ -savas glikoprotein ( $\alpha 1$ -AGP) emelkedett koncentrációja a plazmában, ami képes az imatinib fokozott megkötésére, és így a szer nem jut el terápiás koncentrációban a célsejtekhez [26].

A második generációs tirozin kináz inhibitorok, a nilotinib és a dasatinib hatásosak imatinib rezisztencia esetén [27, 28] és a T315I kivételével számos imatinib rezisztens BCR-ABL mutációra is hatnak. Az imatinibhez hasonlóan, a nilotinib is a BCR-ABL inaktív konformációjához kötődik és szintén az ABL és a PDGFR kinázokat gátolja, azonban hatáserőssége 20-30-szorosa az imatinibnek ABL gátlása esetén. A dasatinib a BCR-ABL aktív és inaktív konformációjához egyaránt képes kötődni, és egyéb, pl. Src kinázokat is gátol, tehát kevésbé specifikus, mint az imatinib és a nilotinib, viszont hatáserőssége több, mint 300-szorosa az imatinibnek. Mutációk és további kromoszóma eltérések megjelenhetnek a második generációs tirozin kináz inhibitor kezelés esetén is, azonban ezek jelentősége a betegség kimenetele szempontjából kevésbé jellemzett.

Nemrégiben a BCR-ABL alternatív splicing-gal (AS) kapcsolatban is felmerült, hogy imatinib rezisztencia mechanizmus lehet [29-33], mert többféle splice variánst találtak imatinib rezisztens betegek BCR-ABL vizsgálata során. Másrészt viszont, a több exonos humán gének ~92-97%-a érintett az AS által [34, 35]. Számos BCR-ABL splice variánst írtak le a közelmúltban, de a vizsgálatok többsége a következő három splice izoformára koncentrált: a 4. és 7. exon deléció ( $\Delta$ exon4 és  $\Delta$ exon7), illetve egy 35 bp-os inszerció a 8. és a 9. exon között (INS35) [29, 30, 36]. A  $\Delta$ exon4 esetében az olvasási keret megtartott, a deléció az ABL ATP-kötő helyét (P-loop szakaszát) érinti és ezáltal inaktív BCR-ABL fúziós fehérje keletkezik [37]. Az INS35 olvasási keret eltolódást okoz, csonka fehérje keletkezik, amelyben megtartott a katalitikus domén. A homológia modellek alapján az INS35 jelenlétében olyan globális konformáció változás történik, amely megváltoztatja az imatinib kötő helyet. Ennek alapján egyes tanulmányokban azt következtetik, hogy az INS35 jelenléte imatinib rezisztenciát okozhat [31]. A 7. exon olvasási keret eltolódást okozó deléciója korai stop kodonhoz vezet a 8. exonban, a katalitikus domén megtartott, de hiányzik az aktivációs hely. Bár számos kutatócsoport leírta a  $\Delta$ exon7 jelenlétét CML-es betegekben a BCR-ABL-en (BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>) és egészséges kontroll egyénekben a normál ABL-en (ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>), részletes szerkezeti elemzés ezidáig nem történt, és a  $\Delta$ exon7

jelenlétének szisztematikus vizsgálatát a betegség különböző szakaszaiban is csak egy tanulmány végezte el [38].

### 1.1.2 BCR-ABL negatív MPN

A BCR-ABL negatív MPN csoportba a polycythemia vera (PV), az essentialis thrombocythemia (ET) és a primer myelofibrosis (PMF) tartozik. Mindhárom betegség a pluripotens hematopoietikus őssejtek klonális megbetegedése. Előfordulási gyakoriságuk 1-2/100 000 lakos/év. Leggyakrabban 60-70 éves kor körül fordulnak elő, a PV férfiakban, az ET pedig nőkben gyakoribb.

A PV domináló klinikai tünete az erythrocytosis (vörösvérsejt szaporulat). Két szakaszát különíthetjük el: a kezdeti, proliferatív vagy polycythemia stádiumra a megnövekedett vörösvérsejttömeg, míg a késői, post-polycythemiás fázisban anémia, cytopenia, illetve splenomegalia jellemző. A PV kezelése során a vérlebocsajtás azonnali eredményt nyújt, a sejtszám tartós csökkentése érdekében főként hydroxyureát alkalmaznak. A több mint 6 éve hydroxyureával kezelt betegek esetén a betegség akut leukémiába való transzformációjának gyakorisága 6-10%.

Az ET jellemző klinikai tünetei a thrombosis, a vérzés, a szédülés, a fejfájás, de a betegek közel fele tünetmentes diagnóziskor. Ha a thrombocytaszám kisebb mértékben emelkedett, gyógyszeres kezelést nem alkalmaznak. Ha vannak értünetek, vagy a beteg idősebb, akkor a thrombocytaszámot citosztatikus szerekkel, elsősorban hydroxyureával igyekeznek csökkenteni. Az ET ritkán transzformálódik akut myeloid leukémiába. A hosszú éveken át fennálló betegségnél csontvelői myelofibrosis alakulhat ki.

A PMF lassan progrediáló betegség, amely a kezdeti prefibrotikus állapotból fibrotikus, illetve ritkán blasztos fázisba transzformálódik. Az esetek 30%-ában a betegség tünetmentes. Az első jel gyakran splenomegalia vagy anémia, a klinikai tünetek közül gyakori a gyengeség, fogyás, éjszakai izzadás.

Az egyes kórképek egymásba átalakulhatnak. A PV és az ET transzformálódhat myelofibrosisba, míg az ET PV-be. Az egyes betegségcsoportok közös eredetét nemcsak a hasonló tünetek, de a közös genetikai háttér is bizonyítja. [39] Ugyan a BCR-ABL negatív MPN-re specifikus kromoszóma eltérés nem ismert, [leggyakrabban +8, +9, del(20q),

del(13q22) mutatható ki], a JAK2 gén V617F, vagy a 12. exon mutációi a PV-ben szenvedő betegek közel 100%-ában, míg ET-ben és PMF-ben a betegek felében kimutathatók.

A BCR-ABL-negatív MPN-ben a nem specifikus terápiákhoz képest előrelépést jelentő szelektív JAK2 inhibitorok még fejlesztés alatt állnak. Az INCB18424 (ruxolitinib) fázis I/II, illetve a TG101348 fázis I vizsgálata jelenleg is folyamatban van [40].

#### *1.1.2.1 A JAK2 V617F mutáció szerepe MPN-ben*

A fenti betegségek hátterében egyetlen gyakori genetikai elváltozást, a 2. típusú Janus kináz (*JAK2*) gén aktiváló mutációját azonosították (c.1849G>T, amely a 617. kodon valin fenilalanin cseréjét eredményezi, V617F) [5, 6, 8] (>95% gyakoriságú PV-ben, 40-60% gyakoriságú ET-ben és PMF-ben) [6-8]. Nem ismert, hogy ugyanaz a genetikai elérés hogyan hozhat létre három különböző klinikai képpel járó kórformát: más progenitor érintett, vagy esetleg egyéb szerzett illetve örökletes genetikai faktorok alakítják ki a fenotípust. A mutáció ritkán más myeloid kórképek esetében, mint pl. myelodysplasiás szindrómában (MDS) vagy akut myeloid leukémiában (AML) is előfordulhat [41, 42].

A JAK2 tirozin kináz különböző receptorok (pl. interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF], erythropoietin és thrombopoietin) ligandummal történő kapcsolódásakor a receptor citoplazmatikus doménjához kapcsolódik és foszforiláció révén aktiválódik. Az aktivált JAK2 a STAT (signal transducer and activator of transcription) fehérjéket foszforilálja és aktiválja. A STAT transzkripciós faktor fehérjék foszforilált állapotban dimerizálódnak és a citoplazmából a sejtmagba vándorolva különböző gének expresszióját befolyásolják [43]. A JAK2 V617F pontmutáció jelenléte in vitro rendszerekben a sejtek túlélési előnyét eredményezi interleukin-3 elvonás esetén [7]. A mutáns JAK2 eritropoietin hiányában is autofoszforilálódik, azaz aktív állapotban van és STAT5 foszforilációt katalizál, míg a vad típusú JAK2 csak eritropoietin jelenlétében foszforilálja a STAT5 fehérjét [6].

A V617F mutáció szerzett, azaz nem mutatható ki a beteg minden sejtjében, csak az érintett myeloid sejtklónban. Az érintett myeloid sejtklón PV-ben gyakran, post PV-MF közel 100%-ban, míg ET-ben ritkán homozigóta formában hordozza a mutációt [44, 45]. Mivel fluoreszcencia in situ hibridizációs (FISH) és kvantitatív PCR vizsgálatokkal a vad

típusú JAK2 allél deléciója kizárható, a homozigóta JAK2 V617F mutáció kialakulása háttérben feltehetően mitotikus rekombináció áll [6, 7].

#### *1.1.2.2 A JAK2 46/1 haplotípus szerepe MPN-ben*

Már régóta feltételezik, hogy örökletes genetikai tényezők is befolyásolják az MPN-re való hajlamot és a fenotípust. Az MPN-ben szenvedő betegek rokonainál nagyobb eséllyel alakul ki PV és ET: a vérrokonokra jellemző relatív kockázat (RR, relative risk): 3,5-14,8 között változik [46]. 2009 tavaszán több kutatócsoport egymástól függetlenül azonosított egy örökletes JAK2 haplotípust, amelynek hordozóinál a JAK2 V617F mutáció kialakulási valószínűsége nőtt [47-49]. A 280-kilobázis kiterjedésű haplotípus magában foglalja a JAK2, az INSL4 és az INSL6 (4., ill. 6. típusú, inzulin-szerű) géneket, amelyek közül csak a JAK2 gén fejeződik ki a hematopoietikus sejtekben. 1500 egészséges kaukázusi egyén genotipizálása során a régióban található polimorfizmusok alapján 92 különböző haplotípust azonosítottak, azonban 9 haplotípussal jellemezhető volt az esetek 94%-a. A 46. és az 1. jelzésű haplotípusok (46/1 haplotípus) kombinált gyakorisága a kontroll csoportban 24%-nak, míg a JAK2 V617F pozitív MPN betegcsoportban 48-56%-nak bizonyult [47] A 46/1 heterozigóta, MPN-ben szenvedő betegek 85%-ában a JAK2 V617F mutáció a 46/1 haplotípust hordozó allélon alakult ki [49]. Az első tanulmányok nem igazolták egyértelműen a 46/1 haplotípus szerepét a V617F negatív MPN kialakulásában. Mindössze két tanulmány vizsgálta a haplotípus szerepét, mint MPN fenotípust módosító tényező [50, 51], különös tekintettel az életkilátásokat is befolyásoló szövödmények (pl. trombózis, és szekunder myelofibrosis, illetve leukémiás transzformáció) gyakoriságára.

## 1.2 Akut myeloid leukémia – irodalmi háttér

Az akut myeloid leukémia (AML) a myeloid rendszer klonális hematopoietikus őssejt eredetű megbetegedése, amely az éretlen myeloid elemek (blasztok) felszaporodásával, és az érett sejtek számának csökkenésével jár. Incidenciája 2-3/100 000 fő/év. Minden életkorban előfordulhat, az életkor növekedésével párhuzamosan a gyakorisága is nő. A betegek átlagos életkora 60 év, a betegség férfiakban és nőkben azonos arányban fordul elő.

Az AML korábbi osztályozása a FAB (French-American-British) rendszer szerint történt, itt a tumorsejtek morfológiája alapján M0-M7 csoportokat különböztettek meg. 2001 óta a WHO (World Health Organization) klasszifikációja az irányadó, amely a morfológiai csoportosításon túl az egyes betegségrcsoportokat a genetikai háttér alapján is megkülönbözteti, valamint elkülöníti az elsődleges, de novo kialakuló AML-t a másodlagos AML-tól, ami myelodysplasia, illetve más hematológiai kórképek, pl. myeloproliferatív szindróma talaján alakul ki.

Az AML diagnózisának kritériuma a 20% feletti blaszt arány a csontvelőben. Ha a blasztok akut myeloid leukémiára specifikus genetikai eltérést [t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) vagy t(16;16)(p13;q22), illetve t(15;17)(q22;q12)] hordoznak, akkor a diagnózis 20% alatti blaszt arány esetében is kimondható [52].

Az AML kialakulásához legalább két genetikai eltérés együttes jelenléte szükséges, amelyek közül az egyik a kóros sejtek proliferációját és túlélését segíti, a másik pedig a differenciálódásukat gátolja. A leukémiás sejtek proliferációs előnyük miatt a normál vérképzéssel szemben dominánssá válnak. Emiatt az érett vérsejtek száma csökken, ezzel magyarázhatók az első tünetek: anémia, láz, valamilyen infekció, vagy vérzés.

Az AML specifikus kezelése elsősorban intenzív kemoterápiával valósul meg. Ezt általában 4, mintegy 1 hetes ciklusokban végzik, és a leggyakrabban használt szerek közé tartozik a citozin arabinozid (hagyományos vagy nagy dózisban), a daunorubicin, az idarubicin, a mitoxantron, és az etopozid. Valamennyi AML-alcsoport esetében hasonló kezelést alkalmaznak, kivéve a t(15;17) transzlokációval járó, promyelocytás alcsoportot (M3), amelyben az induló kemoterápia csupa transz retinsavval (ATRA) egészül ki [9]. Az AML kezelése két fázisra osztható. Az első szakasz az indukció, melynek célja a komplett remisszió elérése. A második szakasz a postremissziós kezelés (konszolidáció), mely szintén citosztatikumokkal történik.

65 évnél fiatalabb, közepes, illetve magas kockázatú, első remisszióban levő AML-betegeknél, vagy visszaesett (relabált) betegeknél allogén őssejt-transzplantációt (SCT) is alkalmazhatnak. Jó prognózisú citogenetikai vagy molekuláris genetikai eltérések jelenlétében az első kezelési ciklus után remisszióban levő betegeknél nem végeznek SCT-t, csak a későbbi, esetleges visszaesés esetén [9].



### 1.2.1 Szerzett és örökletes genetikai eltérések szerepe AML-ben

Számos szerzett genetikai eltérés befolyásolhatja a betegség kimenetelét, ezért a diagnózis idején a leukémiás sejtekben lévő genetikai eltérések prognosztikai szerepének vizsgálata az elmúlt években egyre inkább kiemelt figyelmet kap [53]. AML-ben a legfontosabb prognosztikai szerepe a klasszikus citogenetikának van. A t(15;17), t(8;21), transzlokációkat és az inv(16) inverziót hordozó esetek nagy része a kedvező prognózisú csoportba sorolható és kemoterápiával jó eséllyel gyógyítható. A 3., 5., 7., 11., 17. kromoszómák számos szerkezeti és számbeli eltérése [pl. abn(3q), del(5q), -5, del(7q), -7, abn(11q23), i(17q)], valamint a háromnál több citogenetikai eltérést hordozó, komplex kariotípusú esetek rossz prognózisúnak tekinthetők. Intermedier prognózisú pl. a +8, +22, hordozó, valamint a normál karyotípusú AML is. A molekuláris genetikai vizsgálatok további prognosztikai faktorok vizsgálatát teszik lehetővé. A receptor tirozin kinázok csoportjába tartozó, 3. típusú, *fms*-szerű tirozin kináz (FLT3: *fms*-like tyrosine kinase-3) fontos szerepet játszik az őssejtek osztódási és differenciálódási folyamatainak szabályozásában. Az FLT3 juxtamembrán domén különböző méretű és elhelyezkedésű, de az olvasási keretet mindig megtartó ún. internal tandem duplikációi (ITD) az AML-ben szenvedő betegek mintegy 13-32%-ánál mutathatók ki. A tirozin kináz domén (TKD) 835. ill. 836. aszparaginsav, illetve izoleucin aminosavait érintő pontmutációk az AML-betegek mintegy 7%-ában található meg. Kísérletes rendszerekben mind az ITD, mind a TKD mutációk az FLT3 konstitutív aktiválásához vezetnek és proliferációs és túlélési előnyt biztosítanak a sejteknek. A két FLT3 mutáció felnőttkori AML-ben emelkedett relapszus aránnyal és csökkent összesített és betegségmentes túléléssel társul [54]. A nucleophosmin 1 (NPM1) fehérje a nucleolusok preriboszómális részecskéiben dajkaféhrjeként (chaperonként) működik, szerepet játszik osztódáskor a centroszóma megkettőződésben, a sejtciklus szabályozásában, valamint a stresszre adott válaszreakció kialakításában. Az összes AML-ben szenvedő beteg közel egyharmadában, valamint a normál karyotípusú AML mintegy 45-60%-ában a NPM1 nem a sejtmagban található, hanem kóros citoplazmatikus lokalizációt mutat. A kóros lokalizáció hátterében a NPM1 gén utolsó exonjának olvasási keret eltolódásával járó mutációi, leggyakrabban 4 bázispáros inszerciói állnak. A mutációk következtében a fehérje C-terminális aminosav sorrendje úgy módosul,

hogy nukleáris export szignál jön létre [55]. A NPM1 mutáció gyakran társul FLT3 mutációval. A NPM1 mutáció önmagában, ha nem társul FLT3 mutációval, jó prognózist képvisel: alacsonyabb relapszus aránnyal, valamint hosszabb összesített és betegség-mentes túléléssel [56]. Az FLT3 és az NPM1 mutációk képezik jelenleg a citogenetikai karyotipizálás mellett a legfontosabb genetikai markerek csoportját, amelyek lehetővé teszik a betegek különböző prognosztikai csoportba történő besorolását.

Másrészről viszont, különösen a normál karyotipusú AML esetén a jelenlegi prognosztikai faktorok mellett az örökletes genetikai eltérések vizsgálatával még közelebb juthatunk a pontosabb prognózis megállapításához. Néhány vizsgálat azt mutatta, hogy a JAK2 V617F mutáció ritkán myelodysplasia szindrómában és de novo AML-ben is kimutatható [41, 57-60], viszont konstitutív JAK2 aktivitásra utaló STAT3 aktiváció igazolt JAK2 mutáció hiányában is gyakran megfigyelhető. [42] A MPN-re hajlamosító JAK2 46/1 haplotípus szerepét AML-ben korábban nem vizsgálták.

## 2. Célkitűzések

Munkánk során egyes myeloid hematopoietikus őssejteket érintő betegségek szerzett és örökletes genetikai hátterének vizsgálatát tűztük ki célul.

- a) CML-ben szenvedő tirozin kináz inhibitor rezisztens betegekben a két legfontosabb rezisztencia mechanizmus – a BCR-ABL TKD mutációk és a társuló kromozómaeltérések (ACA) – gyakoriságának meghatározása, valamint a mutációk és az ACA-k hosszútávú következményeinek és prognosztikai szerepének vizsgálata összesített- és az eseménymentes túlélés számításával, első- és második-vonalbeli szekvenciális tirozin kináz inhibitor kezelés során.
- b) Egy új, feltételezett TKI rezisztencia mechanizmus, a BCR-ABL 7. exon deléció részletes és szisztematikus vizsgálata CML-ben szenvedő betegek különböző időpontokból származó mintáin és egészséges kontroll egyének mintáin, különböző, minőségi és mennyiségi analízisre alkalmas PCR alapú technikákkal, valamint bioinformatikai módszerekkel. A vizsgálattal arra kerestük a választ, hogy a 7. exon deléció jelenléte összefügg-e a TKI rezisztenciával.
- c) A szerzett JAK2 V617F mutáció gyakoriságának, vizsgálata, valamint a szerzett mutáció jelenlétének és az MPN klinikai jellemzőinek (életkor, diagnózis, trombózis, myelofibrotikus ill. leukémiás transzformáció) összehasonlítása BCR-ABL negatív MPN-ben.
- d) Az örökletes JAK2 46/1 haplotípus gyakoriságának vizsgálata magyar JAK2 V617F pozitív és negatív MPN betegek csoportjában, a JAK2 46/1 haplotípus és az MPN klinikai jellemzőinek (életkor, diagnózis, trombózis, myelofibrotikus ill. leukémiás transzformáció) összehasonlítása.

- e) Az örökletes JAK2 46/1 haplotípus gyakoriságának vizsgálata akut myeloid leukémiában (AML) szenvedő betegeknél. A betegség jellemzőinek összehasonlítása (életkor, morfológia, és szerzett citogenetikai vagy molekuláris genetikai eltérések az AML diagnózisakor) a JAK2 46/1 haplotípus hordozó és nem hordozó betegek között, valamint a 46/1 haplotípus prognosztikai szerepének vizsgálata (remissziós és relapszus arány, összesített- és betegségmentes túlélés számításával, valamint a halál okának vizsgálata).

### 3. Módszerek

#### 3.1. Vizsgált egyének

##### 3.1.1 CML és ALL

BCR-ABL pozitív MPN esetén 2002 október és 2010 április között 71 imatinib rezisztens CML-es és 6 imatinib rezisztens Ph+ ALL-es betegről gyűjtöttünk perifériás vér, illetve csontvelő mintákat. A betegeket a Fővárosi Egyesített Szent István Szent László kórházban kezelték. Az imatinib rezisztenciát az European LeukemiaNet [61] terápiás kudarc definíciói alapján állapítottuk meg: a teljes hematológiai válasz (CHR) hiánya 3 hónap, a citogenetikai válasz (CyR) hiánya 6 hónap (Ph+>95%), a részleges citogenetikai válasz hiánya (PCyR) 12 hónap (Ph+ >35%), a teljes citogenetikai válasz hiánya (CCyR) pedig 18 hónap elteltével (Ph+ >0%), illetve a válasz elvesztése a terápia bármely időpontjában. Második generációs TKI kezelés esetén terápiás kudarcnak számít, ha nincs CyR 3 hónap, nincs minimális citogenetikai válasz (minCyR) 6 hónap (Ph+: 66-95%), vagy nincs PCyR 12 hónap elteltével. Primer rezisztenciáról akkor beszélünk, ha a beteg a terápia kezdetétől nem reagál a kezelésre, míg szekunder rezisztencia esetén kezdetben van terápiás válasz, amit később a beteg elveszít.

Az imatinib kezelés kezdetekor 23 beteg volt korai krónikus fázisban (CP), 25 késői krónikus fázisban, 15 akcelerált fázisban (AP) és 8 blasztos fázisban (BP). Ha a diagnózis után egy éven belül elkezdődött az imatinib kezelés, akkor korai krónikus fázisról, ha pedig később, akkor késői krónikus fázisról beszélünk. Az eseménymentes túlélést (event free survival, EFS) a TKI kezelés kezdetétől a terápiás válasz elvesztéséig, a betegség progressziójáig AP-ba vagy BP-ba, a transzplantációig, illetve a TKI terápia váltásáig számítottuk. Az összesített túlélést (overall survival, OS) a TKI kezelés kezdetétől a halál időpontjáig számítottuk kivéve imatinib terápia esetén, ahol a második generációs TKI-ra való váltás is a túlélés végpontjának számított. Az ALL-ben szenvedő betegeket, a TKI intoleráns betegeket, valamint azokat, akik 3 hónapnál kevesebb ideig szedtek TKI-t, kizártuk a túlélés szerinti elemzésből.

A 7. exon deléció vizsgálatához a 71 CML-es beteg közül 10 szekunder rezisztens beteget választottunk ki, akiket diagnóziskor, a terápiás válasz időpontjában, valamint a rezisztencia kialakulásakor egyaránt vizsgáltunk. A teljes citogenetikai válasz (CCyR) elvesztésével járó szekunder rezisztencia kialakulásának középértéke 15,5 hónap (tartomány: 10-33 hónap) volt az imatinib terápia kezdete után. A kontroll csoportot 5 optimális választ mutató CML-beteg képezte (mintavétel diagnóziskor és a kezelés kezdete után 1 évvel). Az optimális választ mutató betegek a terápia 12. hónapjáig elérték a teljes citogenetikai választ, és azt nem veszítették el (a követési idő középértéke: 41 hónap [34-89 hónap]).

### 3.1.2. BCR-ABL negatív MPN

A BCR-ABL negatív MPN-t illetően 328 beteget (152 férfi és 176 nő) vontunk be a vizsgálatba. Az átlagéletkor diagnóziskor  $58 \pm 14$  év volt (tartomány: 16-87 év). A WHO kritériumok alapján 175 betegnél polycythemia vera-t (PV), 126 betegnél esszenciális thrombocythemia-t (ET) 27 betegnél pedig primer myelofibrosis-t (PMF) diagnosztizáltak. A Philadelphia kromoszóma jelenlétét standard karyotipizálással (G-sávozás), fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH), vagy reverz transzkripciót követő PCR technikákkal zártuk ki. A laboratóriumi eredményeket (hemoglobin, fehérvérsejt- és trombocita szám) és a klinikai adatokat (splenomegalia) retrospektíven gyűjtöttük. Az átlagos követési idő  $69 \pm 63$  hónap volt (0-313). A trombotikus események előfordulása, a myelofibrózisos vagy leukémiás transzformációk esetén rögzítettük, hogy a diagnózis előtt vagy a követés során történtek-e.

### 3.1.3 AML

AML esetén 339 betegnél [158 férfi és 181 nő; átlagéletkor: 51 év (tartomány: 16-93 év)] vizsgáltuk a JAK2 46/1 haplotípus jelenlétét. A betegeket 2001. január és 2007. november között az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben, az Országos Gyógyintézeti Központban, és 2005. január és 2009. december között a Fővárosi Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház I. sz. Belgyógyászati Osztályán diagnosztizálták és kezelték. Az AML pontos besorolása céljából a diagnóziskor észlelt morfológiai kép, a

karyotípus, a 3. típusú, fms-szerű tirozin kináz (FLT3) internal tandem duplikáció (ITD), az FLT3 tirozin kináz domén (TKD) és a nucleophosmin 1 (NPM1) mutáció került rögzítésre. 176 AML beteg esetén [77 férfi, 99 nő; átlagéletkor diagnóziskor: 48 év (18-60)], akiket 2001 január és 2007 december között diagnosztizáltak és kezeltek az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben, vagy az Országos Gyógyintézeti Központ Hematológiai és Óssejt Transzplantációs Osztályán, a JAK2 46/1 haplotípus prognosztikai szerepét is megvizsgáltuk. Ebben a betegcsoportban a minimális követési idő 24 hónap volt (maximum 107 hónap). A klinikai adatokat retrospektívan gyűjtöttük. A teljes remissziót (complete remission, CR), a korai halált (kevesebb, mint 28 nappal a kezelés kezdete után), a rezisztenciát, a betegségmentes túlélést (DFS) és az összesített túlélést (OS) a nemzetközi ajánlások alapján definiáltuk [52]. A fertőzést, mint a halál okát klinikai vizsgálatokkal vagy boncolással igazolták azoknál a betegeknél, akiknél haláluk előtt nem voltak leukémiára utaló jelek (remisszió, ill. aplázia esetén).

#### 3.1.4 Kontroll egyének

Az ABL  $\Delta$ exon 7 vizsgálatához a kontroll csoport 30 egészséges, önkéntes intézeti dolgozó volt, akiknek nincs ismert hematológiai betegsége.

A JAK2 46/1 haplotípus jelenlétét 331 önkéntes véradónál vizsgáltuk [196 férfi és 135 nő; átlagéletkor: 41 év (tartomány: 19-76 év)]. A véradókat minden esetben a vérellátó szolgálat orvosai kérdezték ki és kizárták azokat, akiknél a kórtörténetében olyan bizonyos betegségek, mint pl. daganatos betegségek vagy fertőzések szerepeltek.

### 3.2 Nukleinsav izolálás

A CML és a Ph+ ALL betegeknél a BCR-ABL TKD mutáció analízis és a 7. exon deléció vizsgálata komplementer DNS-ből (cDNS)-ből történt. Ehhez EDTA-val vagy Na-citráttal alvadásgátolt perifériás vérből vagy csontvelőből végeztünk teljes celluláris RNS extrakciót Trizol reagenssel (Invitrogen, katalógus szám: 15596018), amelyet reverz transzkripció követett High Capacity cDNA RT kit with Rnase Inhibitor (Life Technologies, katalógus szám: 4374966) reagens készlettel.

A JAK2 V617F mutáció és a 46/1 haplotípus vizsgálatához a DNS kivonása Puregene Gentra DNS Isolation Kittel (Puregene, Gentra) történt.

### 3.3 Citogenetikai vizsgálat

A t(9;22) transzlokáció és a társuló citogenetikai eltérések kimutatásához (illetve jelenlétének kizárásához) a karyotipizálás standard G-sávozással történt, az eredményeket az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2005) előírásainak megfelelően adtuk meg. Interfázisú FISH vizsgálat a Vysis LSI dual color, dual fusion BCR-ABL, Vysis CEP8 és Vysis LSI p53/CEP17 próbákkal történt (Vysis Inc.).

### 3.4 A BCR-ABL tirozin kináz domén mutáció kimutatása

A BCR-ABL szelektív amplifikációja cDNS-ből két lépéses PCR-rel történt. Az alap PCR során a forward primer komplementer szekvenciája a BCR 13. exonjában (BCR-b2C: 5'-CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT-3') [62], míg a reverz primer komplementer szekvenciája az ABL 10. exonjában helyezkedett el (ABL-a10R: 5'-TTT CCC CAG CTC CTT TTC CAC TTC-3'), így elkerülhető volt a normál ABL amplifikációja. A két lépéses (nested) PCR második lépésében a teljes tirozin kináz domént három átfedő fragmensben sokszoroztuk fel: 208-333. kodonok (ABL 4-6. exon; forward primer szekvencia ABL-a4F: 5'-GGG CTC ATC ACC ACG CTC CA-3', reverz primer szekvencia ABL-a6R: 5'-CTG CCG GTT GCA CTC CCT CA-3'), 279-440. kodonok (5-8 exon; forward primer szekvencia ABL-a5F: 5'-TGG AGG TGG AAG AGT TCT TGA AAG-3', reverz primer szekvencia ABL-a8R: 5'- GTA AGG GGA CAT GCC ATA GGT AGC-3'), 369-512. kodonok (7-10. exon; forward primer szekvencia ABL-a7F: 5'-TGC CTG GTA GGG GAG AAC CA-3', reverz primer szekvencia ABL-a10R: 5'-TTT CCC CAG CTC CTT TTC CAC TTC-3'). A PCR termékeket ezután didezoxi láncterminációs módszerrel (Sanger-féle szekvenálás) szekvenáltunk forward és reverz irányokból CEQ 8000 Genetikai Analizátoron (Beckman Coulter). Mutáció analízist a tirozin kináz inhibitor rezisztencia időpontjában végeztünk.



### 3.5 A BCR-ABL 7. exon deléció kimutatása

#### 3.5.1 Direkt szekvenálás

A 7. exon deléciót a BCR-ABL TKD mutáció analízis során vizsgáltuk szekvenálással 71 imatinib rezisztens CML betegnél, ABL-a5F és ABL-a8R nested primerekkel.

#### 3.5.2 Fragmens analízis

A 7. exon deléció jelenlétét fragmens analízissel is vizsgáltuk CEQ 8000 Genetikai Analizátoron a fent leírt két lépéses nested PCR-t követően. Az alap PCR során külön amplifikáltuk a normál ABL-t és a BCR-ABL-t kétféle forward primer segítségével. Az egyik forward primer komplementer szekvenciája az ABL 1. exonjában (ABL-1AF: 5'-CTGGTGGGCTGCAAATCCAAGAA-3') [63], míg a másik primer komplementer szekvenciája a BCR 13. exonjában helyezkedett el (BCR-b2C), a közös reverz primeré pedig az ABL 10. exonjában. A nested PCR során ABL-a5F és fluoreszcensen jelölt ABL-a8R primereket használtunk. Az  $ABL^{\Delta\text{exon7}}/ABL$  arányt úgy számítottuk, hogy 7. exon deléciós fragmens (301 bp) csúcsmagasságát elosztottuk a deletált és a nem deletált fragmensek (301 és 488 bp) csúcsmagasságainak összegével. A 7. exon deléció jelenlétét 10 imatinib rezisztens beteg és 5 imatinibre optimális választ mutató beteg esetén a terápia különböző időpontjaiban vizsgáltuk a BCR-ABL-en és az ABL-en, illetve 30 egészséges kontroll esetén az ABL-en nested PCR-rel. 15/30 egészséges kontrollnál az első (alap) PCR kihagyásával is elvégeztük a vizsgálatot, hiszen ezeknél a személyeknél kizárható a BCR-ABL transzlokáció jelenléte.

#### 3.5.3 Allél specifikus PCR

A fent leírt nested PCR-hez ebben az esetben egy, a 7. exon delécióra specifikus primert terveztünk a 6. és a 8. exon határára (ABL-6-8R: 5'-CTTCATCCACAGCATTTGGAGTATTG-3') és ezt használtuk a második PCR-ben. A forward primer komplementer szekvenciája a 4. exonban volt (ABL-4F: 5'-GGGCTCATCACCACGCTCCA-3'). A 7. exon delécióra specifikus PCR termék jelenlétét agaróz gélelektroforézissel állapítottuk

meg. Ezzel a módszerrel is 10 imatinib rezisztens és 5 optimális válaszu CML beteg különböző időpontokból származó, valamint 30 egészséges kontroll mintáit vizsgáltuk.

#### 3.5.4 Kvantitatív PCR

Az alap és a nested PCR után mérhető  $ABL^{\Delta\text{exon}7}/ABL$  arány összehasonlításához valós idejű kvantitatív PCR-t alkalmaztunk (Q-PCR) SYBRGreen festékkel, Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) valós idejű PCR készüléken. Az alap PCR az ABL-1F és az ABL-10R jelzésű primerekkel történt. A nested PCR második körében, illetve az alap PCR tesztelésére szolgáló PCR reakcióban a 7. exon deléciós ABL-t és az összes ABL-t (deléciós+nem deléciós együtt) külön-külön amplifikáltuk a következő primerekkel: ABL-4F és ABL-6-8R a deléciós esetben, illetve ABL-4F és ABL-6R (ABL-6R: 5'-CTGCCGGTTGCACTCCCTCA-3') az összes ABL esetében. Az  $ABL^{\Delta\text{exon}7}/ABL$  arányt deltaCT módszerrel számítottuk, miután cDNS hígítási sorral ellenőriztük, hogy a kétféle amplifikációnak hasonló-e a hatékonysága. Az egy- és a két lépéses (nested) PCR összehasonlítását Q-PCR-rel 15 egészséges kontroll mintán végeztük el, majd az eredményeket összehasonlítottuk a fragmens analízissel történt hasonló vizsgálat eredményeivel.

#### 3.5.5 A variáns fehérje életképességének és működőképességének előrejelzése bioinformatikai módszerekkel

A humán ABL gén szekvenciájához és exon struktúrájához az NCBI adatbázisából jutottunk hozzá (gén ID: 25). Az ABL TKD másodlagos és harmadlagos szerkezetét a Protein Data Bankban található kristályszerkezet adatok alapján készítettük el (PDB, PDB ID: 2HYY) DSSP [64] és UCSF Chimera szoftverek segítségével [65]. A vad típusú és a csonka ABL TKD másodlagos szerkezetét két különböző algoritmus, a JNet [66] és a Prof [67] szerint becsültük meg. Ahhoz, hogy kiszámítsuk a 7. exon deléciós TKD feltételezhetően elérhető hidrofób felszínét, „in silico” ismétlődően csonkoltuk a PDB szerkezetet az egyik vége felől CHASA szoftverrel [68]. Ezt a módszert előzőleg a lehetséges alstruktúrák (pl. al-domének) és a hidrofób magok feltérképezésére használták [69].

### 3.6 A JAK2 V617F mutáció kimutatása

A JAK2 V617F mutációt allél specifikus multiplex polimeráz láncreakcióval (PCR) mutattuk ki az irodalomban ismertett szintetikus oligonukleotidokkal [5]. A PCR master mix (Promega, katalógus szám: M7505), és a genomiális DNS-templát mellett a reakcióelegy három oligonukleotidot tartalmazott: egy mutáció-specifikus forward (Fspec), egy kontroll forward (Fcont) és egy közös reverz (R) primert. A mutáció-specifikus primer a vizsgált mutációt eredményező nukleotidcserén túl, még egy nukleotidcserét tartalmaz a 3' végén, az álpozitív amplifikáció elkerülése végett. A PCR reakció során keletkezett DNS fragmentumokat agaróz gélen választottuk el, és etidium-bromid festést követően ultraibolya fényel megvilágítva tettük láthatóvá. Az érzékenység növelése céljából az irodalomban ismertett PCR körülményeket kisebb mértékben módosítottuk a következők szerint: amplifikációs primer koncentrációk: 0,5 mM reverz és mutáció-specifikus primerek, 0,15 mM a kontroll forward primer koncentrációja. A PCR 36 ciklusból állt (94°C 1 perc, 58°C 1 perc, 72°C 1 perc). Kettő V617F pozitív betegnél elvégeztük a kérdéses génszakasz ellenőrző szekvenálását. A szekvenáló reakciót BigDye 3.1 szekvenáló kittel (Applied Biosystems) végeztük, a kapilláris elektroforézis ABI310 Genetic Analyzer készüléken történt.

### 3.7. Az AML egyéb molekuláris jellemzőinek vizsgálata

A 3. típusú, fms-szerű tirozin kináz (FLT3) internal tandem duplikáció (ITD) és a nucleophosmin 1 (NPM1) inszerciós mutációk jelenlétét a PCR-t követő Genescan fragmens analízissel vizsgáltuk [56, 70].

### 3.8 A JAK2 46/1 haplotípus vizsgálata

A 46/1 haplotípussal kapcsolatban öröklődő JAK2 gén 14. intron rs12343867 polimorfizmust (NT\_008413.17: g.5064189T>C) LightCycler technológiával mutattuk ki. Az amplifikációs primereket és a hibridizációs próbákat LightCycler Probe Design

software-rel terveztük (Roche Diagnostics). A V617F-pozitív MPN esetekben a 617F mutáns és a 617V vad típusú alléleket eltérő allél-specifikus primereket alkalmazva külön reakcióban sokszoroztuk fel, majd az amplifikáció után olvadási görbe analízist végeztünk.

Az alkalmazott primerek:

JAK2-LIP-WT: 5'-GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTG-3'; [71]

JAK2-LIP-V617F: 5'-GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTT-3'; [71]

JAK2-LCF: GCGGGTAGGACTATTCAGTTATATCTTG;

JAK2-LCR: CTGTATAGTATTAAGCATGGGGTACGA;

JAK2-SENS: AGAAATGATTACGTTGATATGATACTAGA-Fluorescein;

JAK2-ANC: LC Red 640-TATTTTTTGGCTAAATTTAGGTGTTACAGAACTACTAA-P

Az aláhúzott és vastagon szedett nukleotid a JAK2-SENS szondán az SNP, a szondát a „C”-nukleotidra (46/1 haplotípussal kapcsolatos öröklődő allél) terveztük.

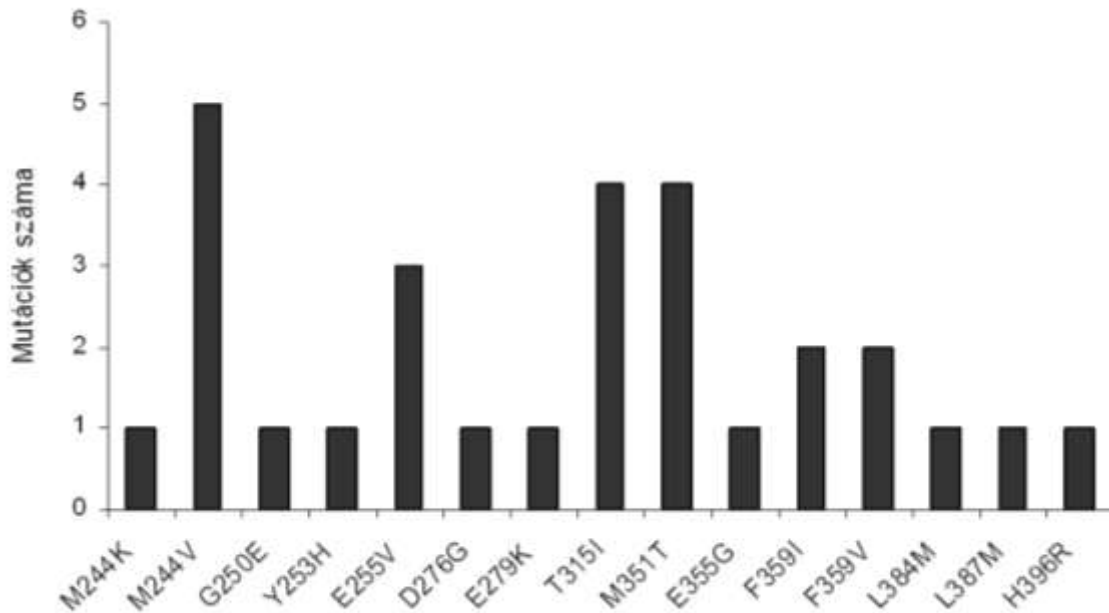
### 3.9 Statisztikai feldolgozás

A nem folyamatos változók összehasonlítására khi-négyzet tesztet vagy Fisher tesztet, míg folyamatos változók esetén Mann-Whitney (két független változó) vagy Wilcoxon (két nem független változó) tesztet alkalmaztunk. A folyamatos változóknál az átlagot  $\pm$  SD (standard deviáció), vagy a mediánt (középérték)  $\pm$  SD tüntettük fel. Az SNP (single nucleotide polymorphism) allél frekvenciákat valamint az Odd' s ratio-t (esélyhányados)  $\% \pm 95\%$  konfidencia intervallummal adtuk meg (95% CI). Az összesített túlélést (overall survival, OS) és eseménymentes (event free survival, EFS), valamint betegségmentes túlélést (disease free survival, DFS) egy független paraméter esetén (univariancia analízis) Kaplan-Meier módszerrel számítottuk és az eredményeket log-rank teszttel hasonlítottuk össze, míg több paraméter összefüggéseinek vizsgálatát (multivariancia analízis) Cox-regresszióval számítottuk. A statisztikai analíziseket az SPSS (version 13.0) software segítségével végeztük. Az eltéréseket  $p \leq 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. A Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) vizsgálatát Arlequin ver 2.000 (<http://anthro.unige.ch/arlequin>) software, valamint az SNPstats internetes alkalmazás (<http://bioinfo.iconcologia.net/Snpstats>) segítségével történt [72].

## 4. Eredmények

### 4.1 A BCR-ABL TKD mutációk és további kromoszóma eltérések szerepe CML-ben

A mutáció vizsgálatot az imatinib rezisztencia időpontjában 69 CML és 5 Ph+ ALL betegnél tudtuk elvégezni (2 CML és 1 ALL esetben nem volt elérhető minta a kérdéses időpontban). Összesen 15 különböző mutációt (M244K/V, G250E, Y253H, E255V, D276G, E279K, T315I, M351T, E355G, F359I/V, L384M, L387M, H396R) azonosítottunk 27/74 (36%) imatinib rezisztens betegen. Az M244V (n=5; 19%), a T315I és M351T (n=4; 15%), valamint az E255V (n=3; 11%) és F359I/V (n=2; 7%) mutációk gyakrabban, míg egyéb mutációk csak egy-egy esetben fordultak elő (3. ábra). Három beteg esetében kettős mutációt azonosítottunk.



**3. ábra** BCR-ABL TKD mutációk imatinib rezisztenciában CML (n=69) és BCR-ABL pozitív ALL (n=5) betegekben. Összesen 15 különböző mutációt azonosítottunk 27/74 (36%) imatinib rezisztens betegen. Az M244V, a T315I és M351T valamint az E255V és F359I/V mutációk gyakrabban, míg egyéb mutációk csak egy-egy esetben fordultak elő.

Korai CP-ban a betegek 17%-a (4/23), késői CP-ban 33% (8/24), AP-ban 33% (5/15), míg BP-ban 71% (5/7) hordozott TKD mutációt. Minden ALL-es beteg, akinél TKD mutációt vizsgáltunk, mutáció pozitívnak bizonyult (5/5). A TKD mutáció gyakoriság nőtt a betegség progressziójával párhuzamosan (korai CP vs. késői CP és AP együtt vs. BP, 2\*3 khi-négyzet teszttel  $p=0,026$ ). Citogenetikai eredmények 65 esetben voltak elérhetőek az imatinib rezisztencia időpontjában. ACA-t 30 betegnél (46%) azonosítottak imatinib rezisztenciakor, ebből a 8. kromoszóma triszómia (+8; 26%), a Ph kromoszóma duplikáció (+Ph; 21%) és a 17q izokromoszóma [i(17q); 8%] voltak a leggyakoribb kromoszóma-eltérések. A mutáció és az ACA státusz szerint csoportosított betegek jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A mutáció és az ACA státusz között nem találtunk szignifikáns összefüggést, a mutáció pozitívitas 43% (15/35) volt az ACA negatív és 28% (8/29) az ACA pozitív betegek között ( $p=0,296$ ). Szintén nem találtunk több, mutációt hordozó pozitív beteget a +Ph, a +8 és az i(17q) pozitív betegek között az ACA negatív csoporthoz viszonyítva ( $p=1,00$ ; 0,12 és 1,00, sorrendben).

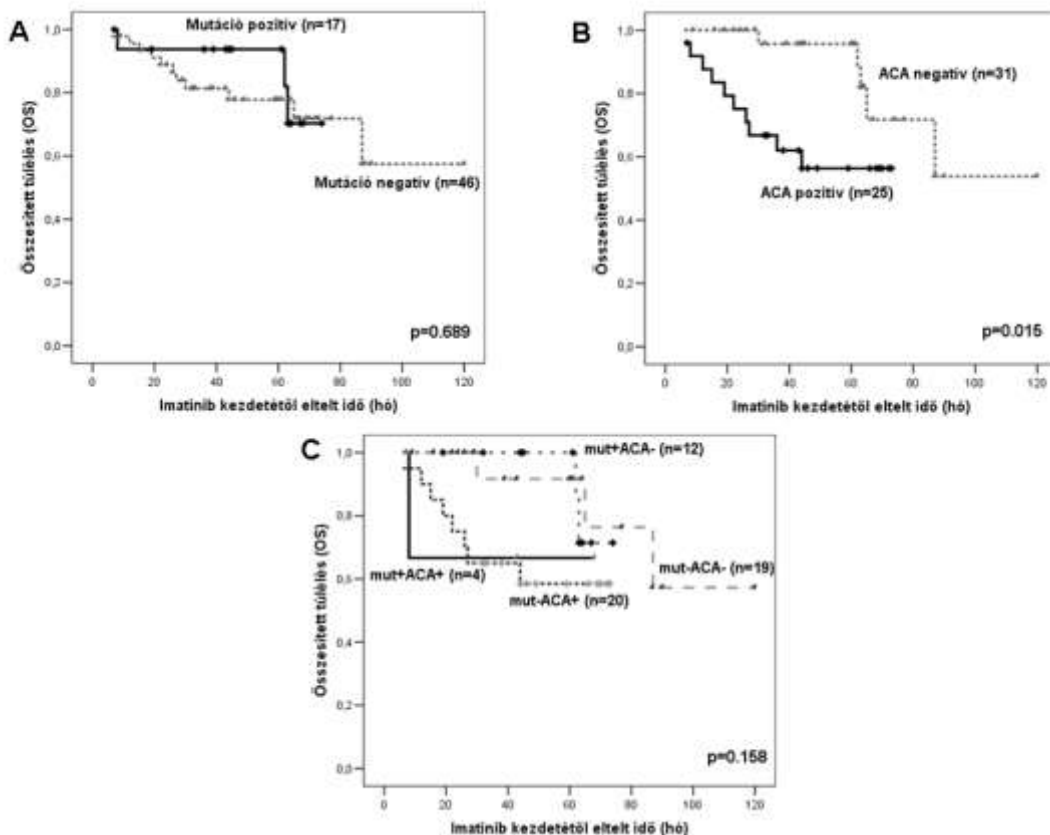
**1. táblázat:** BCR-ABL TKD mutáció és ACA státusz szerint csoportosított imatinib rezisztens betegek jellemzői

Paraméter		Összesen n=77 (%)	Mutáció, no., (%) n=74			ACA, no., (%) n=65		
			Mutáció pozitív (n=27)	Mutáció negatív (n=47)	p	ACA pozitív (n=30)	ACA negatív (n=35)	p
Átlagéletkor diagnóziskor, év (tartomány)		43 (10-73)	46 (25-73)	41 (10-70)	0,387	43 (25-73)	46 (10-66)	0,752
Korábbi interferon- $\alpha$ kezelés		36 (47)	15 (55)	19 (40)	0,234	16 (53)	15 (43)	0,805
Fázis az imatinib kezdetekor	Korai CP	23 (30)	4 (16)	19 (40)	* 0,026	7 (23)	12 (34)	0,502
	Késői CP	25 (32)	8 (30)	16 (34)		11 (37)	11 (32)	
	AP	15 (20)	5 (18)	10 (22)		5 (17)	9 (26)	
	BP	8 (10)	5 (18)	2 (4)		4 (13)	2 (5)	
	ALL	6 (8)	5 (18)	0 (0)		3 (10)	1 (3)	
Imatinib kezelés átlagos időtartama, hó (tartomány)	Imatinib	39 (3-123)	39 (3-68)	39 (6-123)	0,128	32 (3-108)	44 (3-123)	0,140
Imatinib terápiát követő kezelés	Nilotinib	28 (36)	14 (52)	13 (28)	0,064	9 (30)	14 (40)	0,669
	Dasatinib	28 (36)	6 (22)	22 (47)		12 (40)	11 (31)	
	Nincs TKI	21 (28)	7 (26)	12 (25)		9 (30)	10 (29)	
Fázis TKI váltáskor	CP	26 (34)	15 (55)	19 (41)	0,597	5 (17)	21 (60)	0,003
	AP	19 (25)	8 (30)	16 (34)		17 (57)	6 (17)	
	BP	9 (12)	3 (11)	7 (15)		6 (20)	3 (9)	
	ALL	2 (3)	1 (4)	0 (0)		0 (0)	1 (3)	
2. generációs TKI kezelés átlagos időtartama, hó (tartomány)	Nilotinib	20 (1-44)	15 (3-44)	16 (1-43)	0,636	20 (1-43)	15 (3-44)	1,000
	Dasatinib	13 (1-56)	10 (1-20)	20 (2-56)	0,031	10 (2-36)	13 (1-56)	0,450

\*korai CP vs. késői CP és AP együtt vs. BP.

Rövidítések: TKD: tirozin kináz domén, ACA: addicionális kromoszóma-eltérés (additional chromosome abnormality), CP: krónikus fázis, AP: akcelerált fázis, BP: blasztos fázis, ALL: akut lymphoid leukémia, TKI: tirozin kináz inhibitor.

Megvizsgáltuk a 71 imatinib rezisztens betegek eseménymentes és összesített túlélését BCR-ABL TKD mutáció és/vagy ACA jelenlétében, illetve hiányában. Az EFS és az OS nem különbözött a mutáció pozitív és negatív csoportok között ( $p=0,884$  és  $0,689$ , sorrendben) (4A ábra). Nem hasonlítottuk össze a túlélést mutáció típus szerint (P-loop, nem P-loop, T315I), mert az egyes alcsoportokban túlságosan kevés betegünk volt. A 2 éves összesített túlélés 100% volt az ACA-negatív és 76% az ACA-pozitív betegeknél ( $p=0,015$ ) (4B ábra). Az eseménymentes túlélés szintén szignifikánsan hosszabb volt az ACA-negatív csoportban, mint az ACA-pozitív betegeknél ( $p=0,032$ ). A Ph+ és az i(17q) jelenléte rosszabb OS-t eredményezett, ( $p=0,007$  és  $p<0,001$ , sorrendben), amíg a +8 kromoszóma-eltérés nem befolyásolta a túlélést. Nem találtunk szignifikáns különbséget a mutációt és ACA-t különféle kombinációkban hordozó betegek túlélése között (4C ábra).

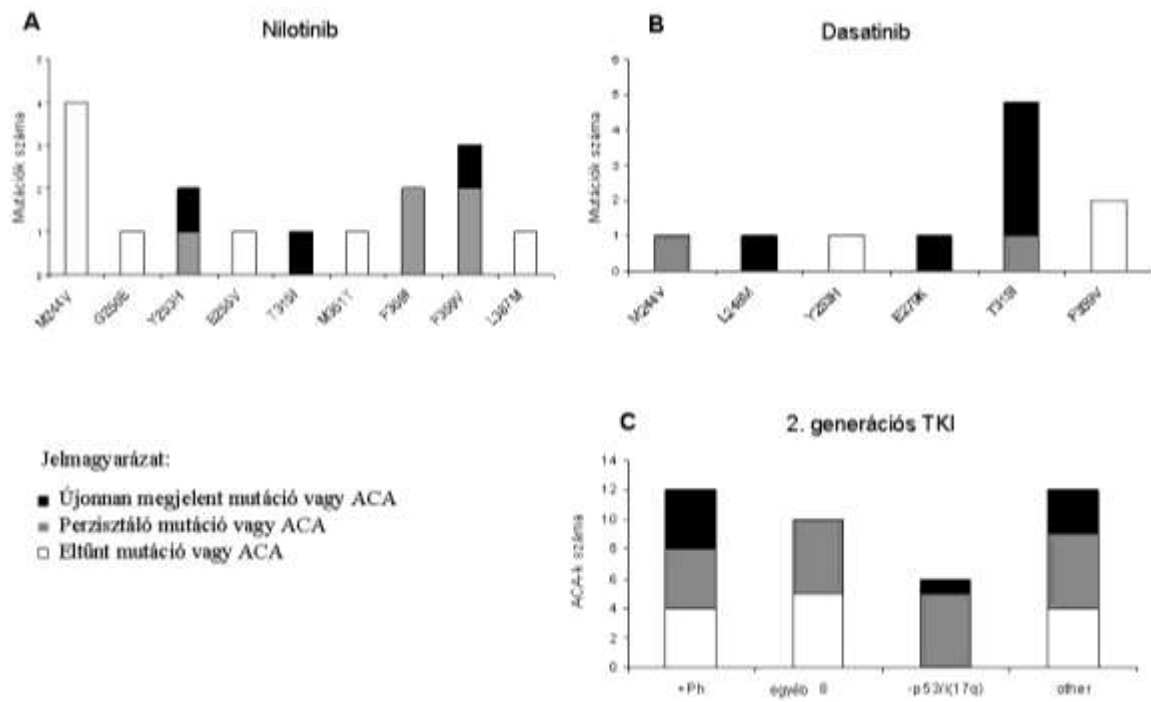


**4. ábra** Kaplan–Meier összesített túlélés (OS) imatinib rezisztens CML betegeknél az imatinib terápia kezdetétől (A) TKD mutáció jelenléte szerint (B) ACA jelenléte szerint (C) mutáció és ACA kombinált jelenléte szerint.



Az imatinib rezisztens betegek közül 57 beteg kapott második generációs TKI-t (nilotinib, n=29; dasatinib, n=28) az imatinib kezelést követően. Ezt követően 13/57 beteg esetében váltottak harmadik TKI-ra (nilotinib, n=5; dasatinib, n=8) relapsus miatt. Dasatinib kezelés esetén 3 betegnél optimális, 3 betegnél szuboptimális válasz, 17 betegnél terápiás kudarc alakult ki, további 3 beteg mellékhatások miatt nem tolerálta a kezelést (2 esetben nem volt adatunk). Nilotinib esetén 10 betegnél optimális, 5 betegnél szuboptimális válasz, 13 betegnél terápiás kudarc, 1 betegnél pedig intolerancia volt megfigyelhető. A 20 imatinib rezisztens beteg közül, akik nem kaptak nilotinibet vagy dasatinibet, 3 beteget transzplantáltak, 8 beteg meghalt mielőtt a második generációs TKI kezelés elérhető lett volna, 3 beteg bosutinib klinikai vizsgálatba került, 4 beteg reagált az imatinib dózisémelésre, 2 esetben pedig elvesztettük a követést.

Hasonló vizsgálatot végeztünk második generációs TKI kezelés esetén is. A mutációk megjelenését és eltűnését a nilotinib és dasatinib kezelések hatására attól függetlenül vizsgáltuk, hogy előzőleg milyen és hányféle TKI kezelést kapott a beteg. A következő mutációk tűntek el nilotinib kezelés hatására: M244V (n=4), G250E (n=1), E255V (n=1), M351T (n=1), és L387M (n=1) (5A ábra). Másrészt viszont, az Y253H (n=1), F359I (n=2) és F359V (n=2) mutációk perzisztáltak és három új mutáció is megjelent (Y253H, T315I és F359V). A dasatinib kezelés hatására az Y253H (n=1) és az F359V (n=2) mutációk tűntek el. Dasatinib kezelés alatt kevesebb perzisztáló, [M244V (n=1) és T315I (n=1)], viszont több újonnan megjelenő mutációt [L248M (n=1), E279K (n=1) és T315I-t (n=5)] detektáltunk (5B ábra). A nilotinib és a dasatinib mutációs spektruma nem volt átfedő a T315I mutációt kivéve, amely viszont a leggyakrabban előforduló mutáció volt második generációs TKI kezelésnél. A leggyakrabban előforduló ACA-k közül az i(17q) perzisztált mindkét második generációs TKI alatt, míg a legtöbb +Ph és +8 eltűnt nilotinib vagy dasatinib hatására (5C ábra).



**5. ábra** (A) Újjonnan megjelenő, perzisztáló és eltűnt mutációk megoszlása nilotinib terápia alatt 34 betegben. Nilotinib rezisztenciával járó mutációk: Y253H, T315I, F359I és F359V. (B) Újjonnan megjelenő, perzisztáló és eltűnt mutációk megoszlása dasatinib terápia alatt 36 betegben. Dasatinib rezisztenciával járó mutációk: L248M, E279K és T315I. (C) Újjonnan megjelenő, perzisztáló és eltűnt ACA-k megoszlása 2. generációs TKI terápia alatt 24 betegben.

Egyéb ACA: -7; +4; +9; +10; -Y; +19; +21; +22; +6; +X; komplex (3-nál több ACA)

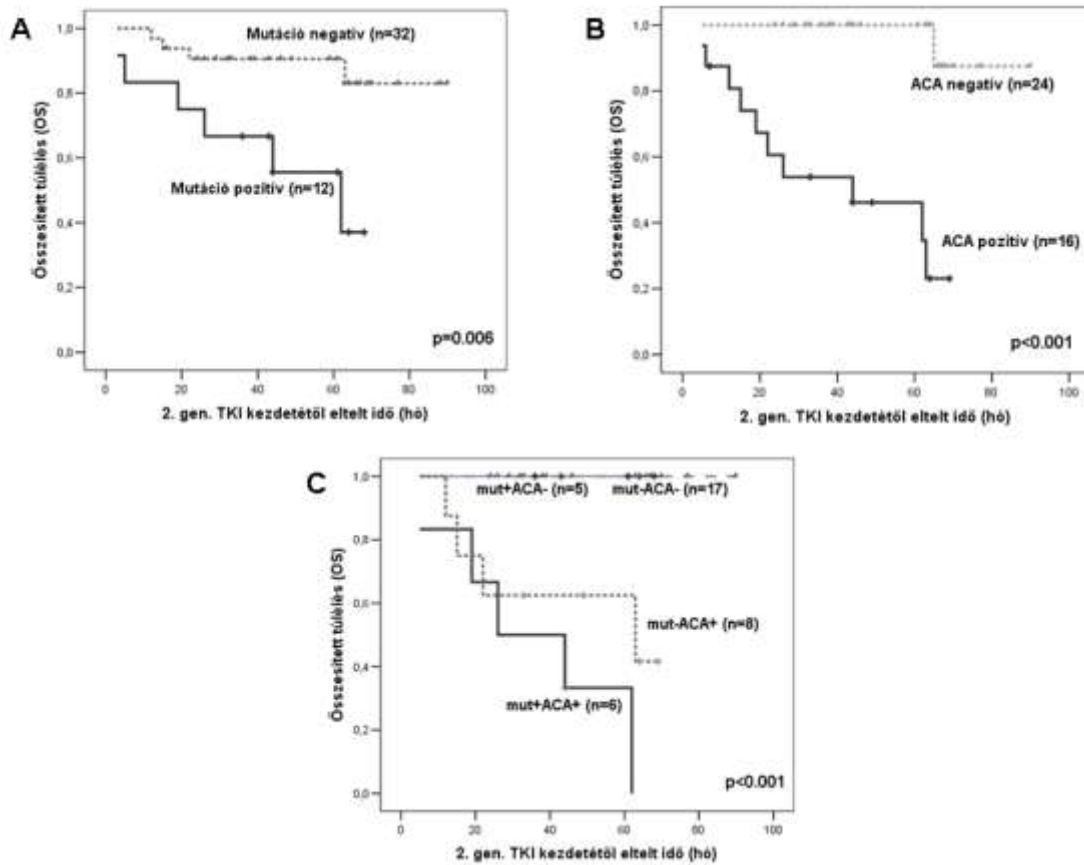
Összehasonlítottuk az összes TKD mutációt, az ACA-k és a T315I mutációk számát CML betegekben imatinib, nilotinib és dasatinib kezelés alatt (2. táblázat). Nilotinib kezelés alatt szignifikánsan több mutációt találtunk (70%), mint imatinib (32%) és dasatinib (29%) alatt. (Khi-négyzet teszt:  $p=0,0483$ , Fisher teszt: imatinib vs. nilotinib  $p=0,0324$ ; dasatinib vs. nilotinib  $p=0,051$ ; imatinib vs. dasatinib  $p=1$ ). Másrészt viszont a T315I mutáció gyakrabban fordult elő dasatinib kezeléskor, mint nilotinib vagy imatinib alatt (24% vs. 10% vagy 1%,  $p=0,0016$ ; Fisher teszt: imatinib vs. nilotinib  $p=0,233$ ; dasatinib vs. nilotinib  $p=0,634$ ; imatinib vs. dasatinib  $p=0,0021$ ).

**2. táblázat** Az összes mutáció, az ACA-k és a T315I mutáció gyakoriságának összehasonlítása imatinib, nilotinib és dasatinib kezelések alatt CML betegeknél.

\*vizsgált betegek száma.

Paraméter	TKI rezisztens betegek (n)	No. (%)	p
TKD mutációk száma	imatinib (71)	22/69* (32)	0,0483
	dasatinib (21)	6/21* (29)	
	nilotinib (13)	7/10* (70)	
ACA-k száma	imatinib (71)	27/61* (44)	0,4726
	dasatinib (21)	10/19* (53)	
	nilotinib (13)	4/13* (31)	
T315I mutációk száma	imatinib (71)	1/71* (1)	0,0016
	dasatinib (21)	5/21* (24)	
	nilotinib (13)	1/10* (10)	

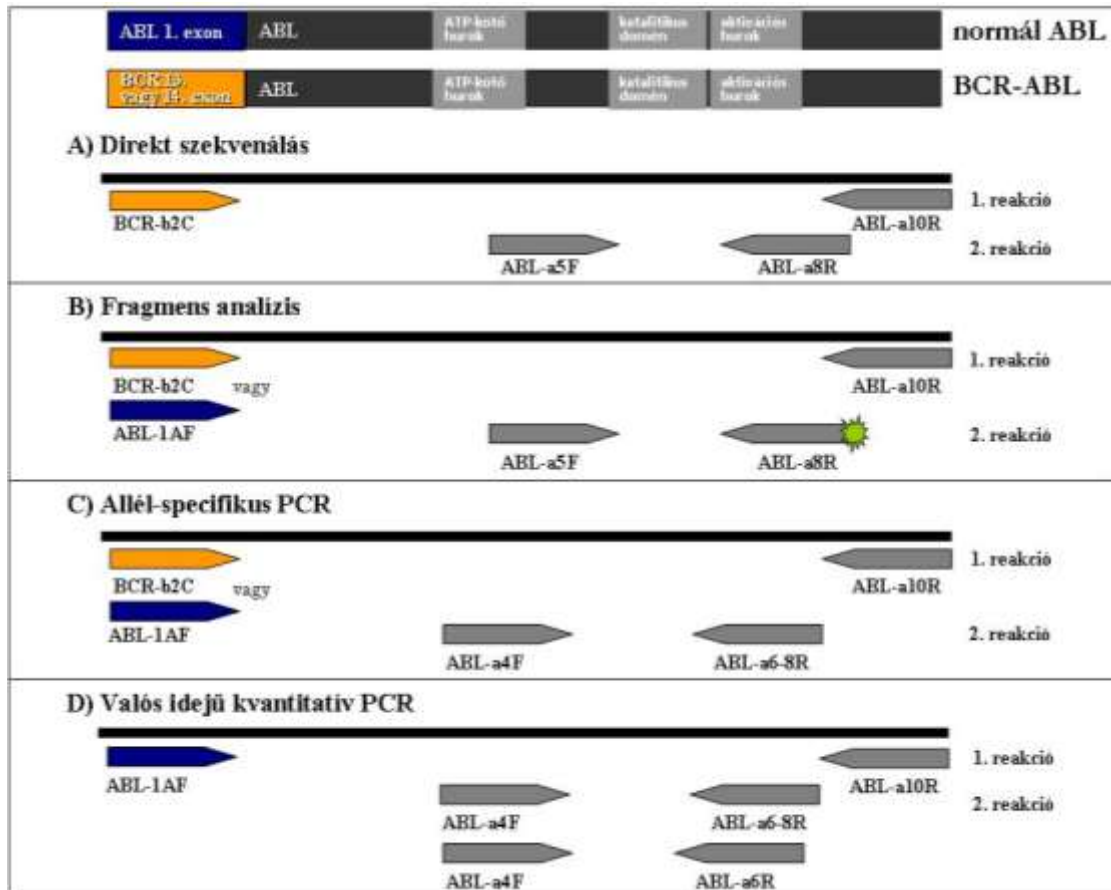
A második generációs TKI-k esetén is megvizsgáltuk a túlélési valószínűséget TKD mutáció jelenléte szerint (6A ábra), ACA jelenléte szerint (6B ábra), valamint a TKD mutáció és ACA kombinált jelenléte szerint (6C ábra). Az imatinibnél kapott eredményekkel ellentétben ebben az összehasonlításban már a mutáció pozitívitás is szignifikánsan befolyásolta a túlélést (EFS:  $p=0,006$  és OS:  $p=0,01$ ). Az ACA a második generációs TKI kezelés esetén is erős prognosztikai faktornak bizonyult ( $p<0,001$ , ACA pozitívitás esetén rosszabb EFS és OS). Mivel a betegség előrehaladottabb fázisaiban (AP, BP) rosszabb a túlélés és több az ACA, az analízist elvégeztük a krónikus fázisú CML betegek alcsoportján is ( $n=31$ ), ahol az ACA szintén negatívan befolyásolta a túlélést ( $p=0,015$ ). Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a mutációt és ACA-t különböző kombinációban hordozó betegek alcsoportjainak túlélése között (EFS és OS  $p<0,001$ ). A prognózis a TKD mutáció és az ACA-pozitív betegeknél volt a legrosszabb, ekkor a 4 éves túlélés csupán 33% volt.



**6. ábra** Kaplan–Meier összesített túlélés (OS) második generációs TKI rezisztens CML betegeknél a második generációs TKI terápia kezdetétől (A) a TKD mutáció jelenléte szerint (B) az ACA jelenléte szerint (C) a TKD mutáció és az ACA kombinált jelenléte szerint.

#### 4.2 A BCR-ABL 7. exon deléció szerepe CML-ben

A  $\Delta$ exon7 vizsgálatát többféle, különböző érzékenységgű módszerrel is elvégeztük. Minden esetben az első reakcióban külön amplifikáltuk a normál ABL-t és a BCR-ABL-t, majd a második reakcióban sokszoroztuk fel a vizsgálni kívánt rövidebb szakaszt. A különböző módszereknél alkalmazott primereket a 7. ábrán mutatom be.



**7. ábra** Az  $ABL^{\Delta exon7}$  és  $BCR-ABL^{\Delta exon7}$  kimutatása különböző PCR alapú technikákkal. Az 1. reakcióban (alap PCR) külön amplifikáltuk a normál ABL-t és a BCR-ABL-t kétféle forward primer segítségével. Az egyik forward primer komplementer szekvenciája az ABL 1. exonjában (ABL-1AF, míg a másik primer komplementer szekvenciája a BCR 13. exonjában helyezkedett el (BCR-b2C), a közös reverz primeré pedig az ABL 10. exonjában. A 2. reakcióban (nested PCR) a forward primer komplementer szekvenciája az 5. (ABL-a5F) vagy 4. (ABL-a4F) exonban, a reverz primeré pedig a 8. (ABL-a8R) exonban volt. Az allél-specifikus PCR-hez egy, a 7. exon delécióra specifikus primert terveztünk a 6. és a 8. exon határára. Fragmens analízisnél fluoreszcensen jelölt ABL-a8R primereket használtunk. Kvantitatív PCR esetén a 7. exon deléciós ABL-t és az összes ABL-t (deléciós+nem deléciós együtt) külön-külön amplifikáltuk ABL-4F és ABL-6-8R (deléciós esetben), valamint ABL-4F és ABL-6R (nem deléciós esetben, a reverz primer komplementer szekvenciája a 6. exonban) primerekkel.

A mutáció analízis során szekvenálással az imatinib rezisztens betegek 17%-ánál (12/71) találtunk BCR-ABL<sup>Δexon7</sup>-t (3. táblázat). Fragmens analízissel, ami egy érzékenyebb módszer, szignifikánsan nagyobb gyakorisággal azonosítottuk a deléciót (70%; 7/10), mint szekvenálással (p=0,001). Az imatinibbel kezelt CML-betegek különböző időpontokból származó mintái közül a diagnózis időpontjából (80%; 12/15) és a rezisztencia időpontjából származó (70%; 7/10) mintákban gyakoribb volt a 7. exon deléció, mint a terápiás válasz idejéből származó mintákban (0%; 0/9; p=0,0002). Öt esetben a BCR-ABL nem amplifikálódott a terápiás válaszkor vett mintákból az alacsony BCR-ABL expressziós szint miatt. A 7. exon deléciót nem hordozó minták alacsonyabb BCR-ABL expressziót mutattak (medián: 2,5%; 25-75% percentilis: 0,5-29,3%) a deléciós mintákhoz képest (medián: 90%; 25-75% percentil: 49-100%; p=0,001). A BCR-ABL-lel ellentétben az ABL<sup>Δexon7</sup> gyakorisága nem különbözött a terápia különböző időpontjaiból származó mintákban (diagnózis: 40%, 6/15; rezisztencia: 70%, 7/10; terápiás válasz: 43%, 6/14; p=0,74). ABL<sup>Δexon7</sup> -t 23/30 (77%) egészséges kontroll mintában is kimutattunk. Allél-specifikus PCR-rel még több minta bizonyult BCR-ABL<sup>Δexon7</sup> pozitívna [87% (13/15) diagnóziskor, 57% (8/14) a terápiás válasz idején és 100% (10/10) rezisztenciakor]. A fragmens analízishez hasonlóan BCR-ABL<sup>Δexon7</sup>-t is ritkábban találtunk alacsonyabb BCR-ABL kópiaszámnál. Az ABL<sup>Δexon7</sup> gyakorisága diagnóziskor 87% (13/15), terápiás válaszkor 93% (13/14), rezisztenciakor pedig 90% (9/10) volt (p=1,0). (3. táblázat)

Kvantitatív PCR-rel (Q-PCR) csak az ABL génen vizsgáltuk a 7. exon deléció jelenlétét egészséges kontroll mintákban (n=15) és összehasonlítottuk az egy- és két lépéses (nested) PCR technikát. Az egy lépéses PCR után a deléciós és nem deléciós ABL aránya átlagosan 0,17 volt, míg a nested PCR-t követően 0,31 (p=0,156). A kapott értékeket a fragmens analízis eredményeivel összehasonlítva (ABL<sup>Δexon7</sup>/összes ABL arány 16,18 és 5,62 az egy lépéses illetve a nested PCR után), azt találtuk, hogy fragmens analízissel szignifikánsan nagyobb ABL<sup>Δexon7</sup> mennyiséget mérünk, mint Q-PCR-rel (p=0,001 az egy lépéses PCR esetén és p=0,005 a nested PCR esetén, Wilcoxon teszttel) (4. táblázat).

**3. táblázat** A kimutatható BCR-ABL<sup>Δexon7</sup> és ABL<sup>Δexon7</sup> gyakorisága különböző módszerekkel a betegség különböző időpontjaiban.

<sup>a</sup>Egy esetben nem volt a terápiás válasz időpontjából származó elérhető minta.

<sup>b</sup>Öt esetben a BCR-ABL nem amplifikálódott a fragmens analízishez használt primerekkel.

Módszer	Vizsgált egyének	BCR-ABL (%)	p*	ABL (%)	p*
<b>Direkt szekvenálás</b>	Imatinib rezisztens betegek a rezisztencia időpontjában (n=71)	12/71 (17)	-	-	-
<b>Fragmens analízis</b>	CML betegek (szekunder rezisztencia, n=10; optimális válasz, n=5)				
	<i>Diagnózis (n=15)</i>	12/15 (80)	0,0002	6/15 (40)	0,74
	<i>Terápiás válasz (n=14<sup>a</sup>)</i>	0/9 <sup>b</sup> (0)		6/14 (43)	
	<i>Rezisztencia (n=10)</i>	7/10 (70)		7/10 (70)	
	Egészséges kontroll (n=30)	-		23/30 (77)	
<b>Allél-specifikus PCR</b>	CML betegek (szekunder rezisztencia, n=10; optimális válasz, n=5)				
	<i>Diagnózis (n=15)</i>	13/15 (87)	0,0161	13/15 (87)	1,000
	<i>Terápiás válasz (n=14<sup>a</sup>)</i>	8/14 (57)		13/14 (93)	
	<i>Rezisztencia (n=10)</i>	10/10 (100)		9/10 (90)	
	Egészséges kontroll (n=30)	-		30/30 (100)	

**4. táblázat** Az  $ABL^{\Delta exon7}/ABL$  arány összehasonlítása egészséges kontrollokban ( $n=15$ ) kvantitatív real-time PCR-rel (Q-PCR) és fragmens analízissel egy- és két lépéses (nested) PCR-t követően.

	Q-PCR ( $\Delta CT$ )		Fragmens analízis (mutáns/összes)	
	Egy lépéses PCR	Két lépéses (nested) PCR	Egy lépéses PCR	Két lépéses (nested) PCR
<b><math>\Delta exon7</math> pozitív minták/ vizsgált minták (%)</b>	15/15 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)	11/15 (73)
<b><math>ABL^{\Delta exon7}/ABL</math> átlag<math>\pm</math>SD (%)</b>	0,17 $\pm$ 0,12*	0,31 $\pm$ 0,33**	16,18 $\pm$ 4,77*	5,62 $\pm$ 5,41**

Az  $ABL^{\Delta exon7}/ABL$  arányt Q-PCR esetén delta CT módszerrel, míg fragmens analízisnél a csúcso magasságának arányából (deléció/összes) számítottuk. Az átlag $\pm$ SD értékeket 15 kontroll egyénre adtuk meg.

\* $p=0,001$  (Wilcoxon teszt)

\*\* $p=0,005$  (Wilcoxon teszt).

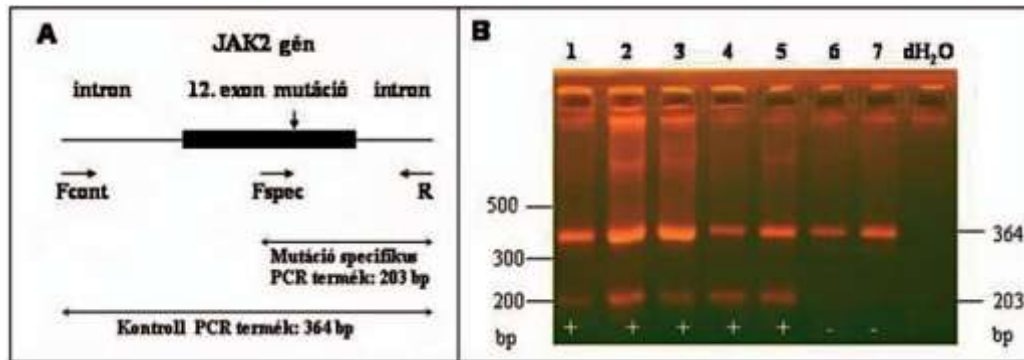
Az ABL fehérje másodlagos szerkezetének bioinformatikai predikciós vizsgálata szerint a 7. exon deléció jelenlétében létrejött új fehérje régió, amely a 8. exontól az eltolódott olvasási keret miatt jött létre, rövid és nem befolyásolja a TKD 6. exon előtti N-terminális részének másodlagos szerkezetét (8A ábra). Mivel a különböző másodlagos szerkezet predikciók (Jnet, Prof) összhangban voltak a megfigyelt másodlagos szerkezettel (DSSP) a normál ABL esetén, ezeket alkalmaztuk  $\Delta exon7$  izoformára is. A tirozin kináz domén korábbi funkcionális térképezése szerint [73], az ABL  $\Delta exon7$  jelenlétében hiányzik az aktivációs hely, ami miatt a csonka fehérje nem funkcionálhat tirozin kinázként. Emellett megváltozik a BCR- $ABL^{\Delta exon7}$  variáns imatinib kötő helye is (A380-F382 három aminosav hiánya), így a fehérje valószínűleg nem képes imatinib kötésére (8B ábra; kristályszerkezet adat forrás: PDB ID: 2HYY). A CHASA szoftverrel végzett szerkezeti vizsgálattal számos olyan régiót találtunk a TKD-ban, amelyek önmagukban is megőrizték szerkezeti integritásukat (8C ábra, ahol a CHASA score lokális minimum értékei jelzik a hidrofób régiók közötti határokat). Az alternatív splicing okozta töréspont egy erősen hidrofób régió közepén helyezkedik el. A másodlagos szerkezeti adatokkal együtt a bioinformatikai analízis alapján valószínűsíthetjük, hogy egy viszonylag nagyobb méretű hidrofób régió





## 4.4 A JAK2 V617F mutáció vizsgálata BCR-ABL negatív MPN-ban

A JAK2 V617F mutáció vizsgálatát allél-specifikus PCR módszerrel végeztük (9. ábra).



**9. ábra** A JAK2 gén V617F pontmutáció kimutatása allél specifikus PCR módszerrel. „A” panel: A JAK2 gén egy részletének sematikus szerkezete, és a PCR reakcióhoz használt oligonukleotid primerek elhelyezkedésének sematikus ábrázolása. Rövidítések: Fcont: kontroll forward primer, Fspec: mutáció specifikus forward primer, R: közös reverz primer, „B” panel: A bemutatott primerek és genomiális DNS minták felhasználásával a „Módszerek” fejezetben leírtak szerint végzett amplifikációs termékek gélelektroforetikus elemzésének képe. 1–5: V617F pozitív betegminták, 6–7: V617F negatív betegminták, dH<sub>2</sub>O: negatív vízkontroll. A méret marker pozíciók bázispárban (bp) az ábra bal oldalán, míg a specifikus termékek méretei az ábra jobb oldalán láthatók.

Az MPN-ban szenvedő teljes betegcsoportban a V617F mutáció összességében 75,9%-ban fordult elő (249/328). A teljes PV-betegcsoport esetében a mutáció előfordulási gyakorisága 87,4% (153/175), ET-ben 61,1% (77/126), MF-ben pedig 70,4% (19/27) volt. A különböző klinikai diagnózisú (PV, ET, MF) betegcsoportokban összehasonlítottuk a JAK2 V617F pozitív és negatív betegek követése során észlelt klinikai adatokat (a nemek aránya, életkor a diagnóziskor, splenomegalia és a különböző szövődmények előfordulási gyakorisága), valamint a diagnózis felállításának időpontjában észlelt laboratóriumi adatokat (Hb, WBC és PLT) (5. táblázat).

A V617F pozitív MPN betegek között szignifikánsan több nő volt a V617F negatív MPN betegekhez viszonyítva (57,4% [143/249] vs. 41,8% [33/79],  $p=0,019$ ). Ez a dominancia a PV és MF alcsoportokban is megfigyelhető volt, de ET-ben nem (5. táblázat). A V617F pozitív betegeknél az életkor diagnóziskor szignifikánsan magasabb volt a teljes betegcsoportban ( $60\pm 12$  vs.  $52\pm 16$  év,  $p<0,0001$ ), és a PV alcsoportban. A V617F pozitív betegek körében magasabb Hb értékeket figyeltünk meg diagnóziskor, mint a V617F negatív betegeknél (Hb:  $165\pm 32$  vs.  $139\pm 30$  g/L,  $p<0,001$ ). A különbség szignifikáns ET-ben is, azonban PV-ben és MF-ban nem. A WBC és PLT nem különbözött diagnóziskor a különböző alcsoportokban (PV, ET, MF) a mutáció pozitív és negatív betegek között. Trombotikus, illetve vérzéses szövődmények gyakrabban fordultak elő a V617F pozitív betegek között [ $p=0,039$ , 26,6% (64/241) vs. 15,2% (12/79)]. Az általunk vizsgált MPN betegeknél myelofibrosisba, illetve akut leukémiába történő transzformáció viszonylag ritkán (15%, illetve 3%) fordult elő, és az alacsony gyakoriság nem különbözött a mutáció-pozitív, illetve negatív csoportok között (5. táblázat).

**5. táblázat** MPN betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői a JAK2 V617F mutáció státusz szerint.

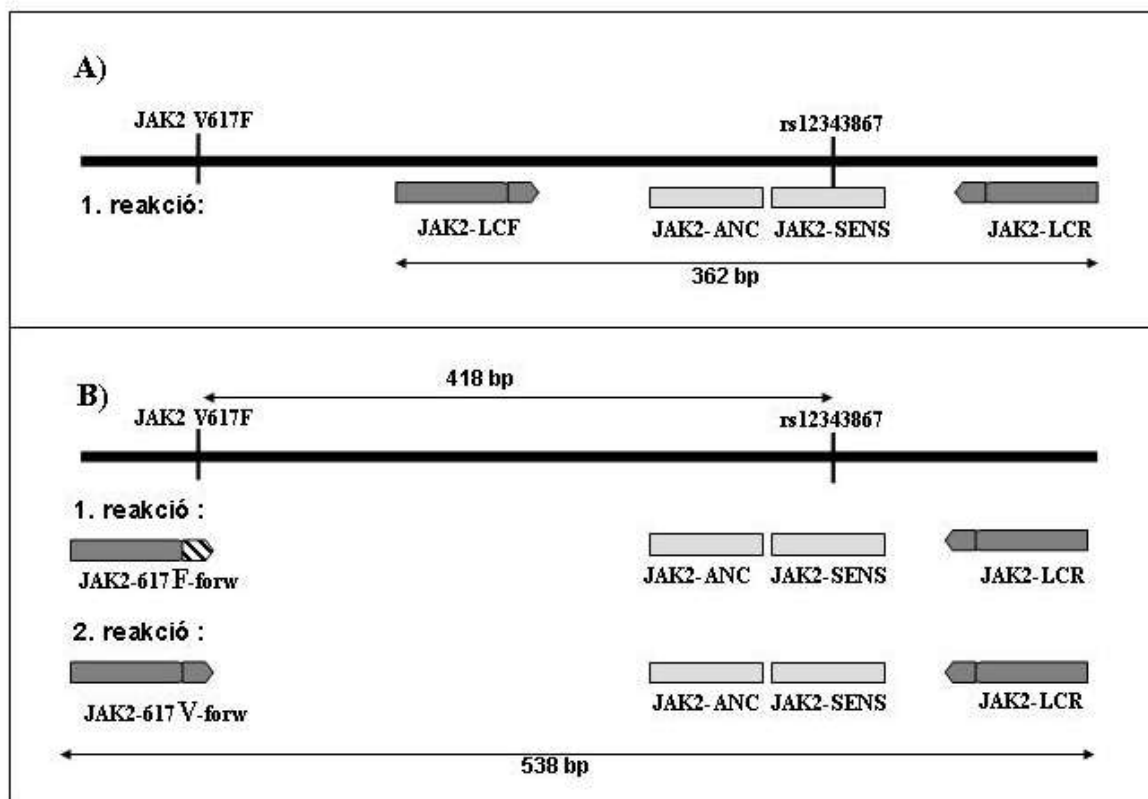
JAK2 V617F státusz	Polycythemia vera		Essentialis thrombocythemia		Primer myelofibrosis	
	poz. (n=153)	neg. (n=22)	poz. (n=77)	neg. (n=49)	poz. (n=19)	neg. (n=8)
Életkor, év±SD <sup>#</sup>	<b>60±12*</b>	<b>47±16*</b>	59±14	54±16	65±12	58±12
Férfi/nő	<b>77/76*</b>	<b>20/2*</b>	21/56	19/30	<b>8/11*</b>	<b>7/1*</b>
Hb (g/L±SD) <sup>#</sup>	182±20	174±16	<b>144±21*</b>	<b>130±14*</b>	107±33	94±35
WBC (10 <sup>9</sup> /L±SD) <sup>#</sup>	12±8	20±5	11±5	9±3	13±10	12±5
PLT (10 <sup>9</sup> /L±SD) <sup>#</sup>	<b>504±241*</b>	<b>270±145*</b>	917±397	1016±317	333±298	408±278
Splenomegália <sup>#</sup>	68/147 (46%)	7/20 (35%)	17/73 (23%)	10/48 (21%)	17/19 (89%)	6/8 (75%)
Vénás trombózis	25/149 (17%)	0/22 (0%)	10/75 (13%)	6/49 (12%)	1/17 (6%)	0/8 (0%)
Artériás trombózis	14/149 (9%)	1/22 (4%)	5/75 (7%)	4/49 (8%)	0/17 (0%)	0/8 (0%)
Vérzés	14/144 (10%)	0/22 (0%)	6/75 (8%)	2/48 (4%)	1/19 (5%)	0/8 (0%)
Transzformáció myelofibrózisba	13/149 (9%)	1/22 (4%)	6/75 (8%)	0/49 (0%)	19/19 (100%)	8/8 (100%)
Transzformáció akut leukémiába	6/145 (4%)	0/22 (0%)	1/75 (1%)	0/49 (0%)	2/18 (11%)	2/7 (28%)

Jelmagyarázat: \* p<0,05 a JAK2 V617F pozitív és negatív csoportok között; <sup>#</sup> a diagnózis időpontjában észlelt klinikai és laboratóriumi adatok.

Rövidítések: PV: polycythaemia vera; ET: essentialis thrombocythaemia; MF: krónikus idiopathiás myelofibrosis; Hb: hemoglobin koncentráció; WBC: fehérvérsejt szám; PLT: thrombocytá szám; SD: standard deviáció. A thrombotikus szövödmények közé soroltuk: alsóvégtagi mélyvénás trombózis, lépvéna trombózis, tranziens ischaemiás attack, stroke, akut myocardialis infarktus. A vérzéses szövödmények közé soroltuk: gastrointestinális vérzés, agyvérzés, vesevérzés, súlyos vérzés műtéti illetve fogászati beavatkozások során.

#### 4.4 A JAK2 46/1 haplotípus vizsgálata BCR-ABL negatív MPN-ban és AML-ban

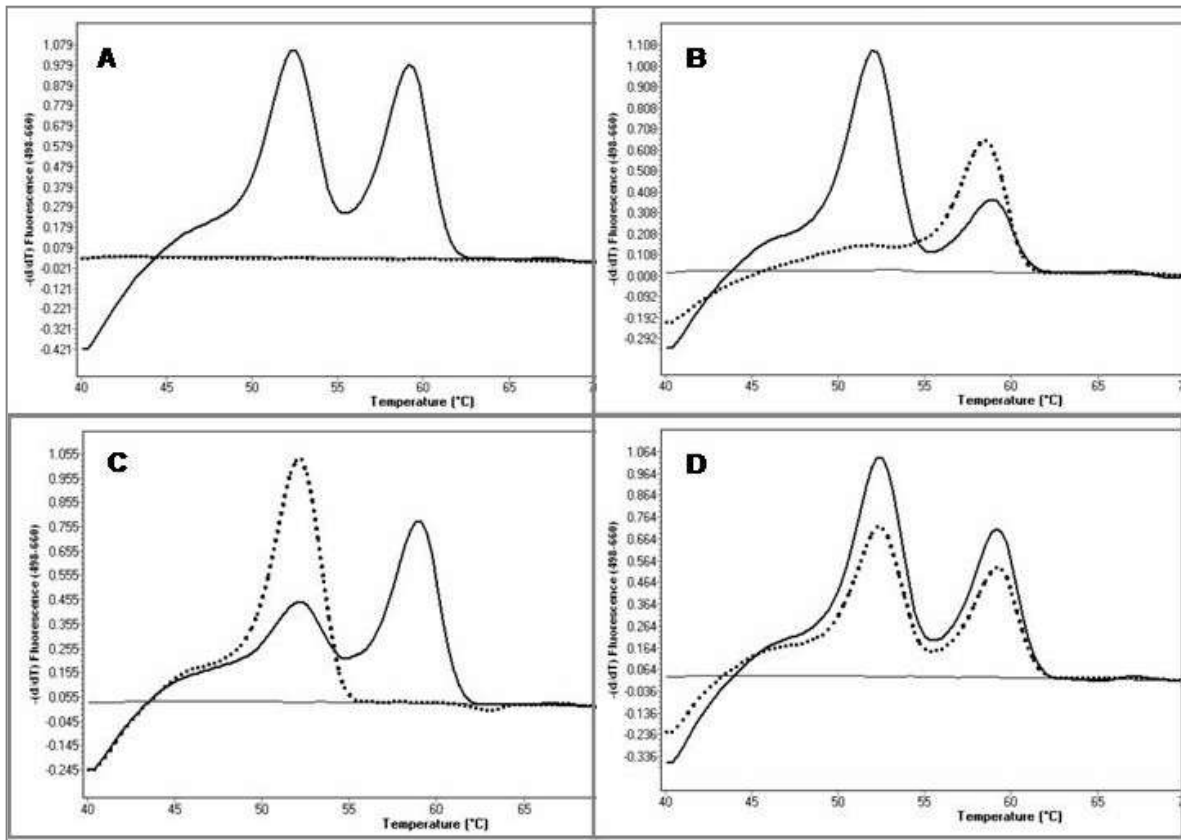
A JAK2 V617F mutáció közelében elhelyezkedő rs12343867 polimorfizmust választottuk a JAK2 46/1 haplotípus vizsgálatára. A JAK2 lókuszt polimorfizmusainak genotipizálása a klonális betegség által érintett szövetben tévesen ál-homozigóta eredményt adhat a tumorszövetben lejátszódó szomatikus rekombináció következtében kialakuló uniparentalis diszómia (UPD) miatt. Mivel a betegek esetében nem állt rendelkezésünkre a klonális betegség által nem érintett szövetminta (csak perifériás vér vagy csontvelői minta), a veleszületett JAK2 46/1 haplotípus helyes meghatározásának érdekében a V617F pozitív betegeknél a JAK2 V617F mutáció pozitív (617F) és a negatív (617V) alléleket külön-amplifikáltuk allél-specifikus polimeráz lánreakcióval (10. ábra). Ezért a JAK2 V617F mutáció vizsgálatát minden esetben JAK2 rs12343867 genotipizálás előtt elvégeztük. A V617F-pozitív MPN esetekben a 617F mutáns és a 617V vad típusú, azaz normál alléleket eltérő allél-specifikus primereket alkalmazva külön reakcióban sokszoroztuk fel (10. ábra), majd az amplifikáció után olvadási görbe analízist végeztünk. UPD esetén a 617V-specifikus amplifikációval az esetleg kisebb mennyiségben jelen levő 617F-negatív allél kimutatása is lehetséges volt. A JAK2 rs12343867 heterozigóta esetekben a 617F-specifikus amplifikációval megállapítható volt, hogy a V617F mutáció melyik haplotípust hordozó allélon keletkezett. A 46/1 haplotípus vizsgálatát 312 MPN és 339 AML betegen, valamint 331 egészséges kontrollon végeztük el.



**10. ábra** A 46/1 haplotípussal kapcsoltan öröklődő JAK2 gén 14. intron rs12343867 polimorfizmusának kimutatása. A JAK2 V617F negatív ('A' panel) és a V617F pozitív esetekben ('B' panel) alkalmazott primerek (sötét szürke téglalapok nyílszerű végződésel) és hibridizációs próbák (világos szürke téglalapok) elhelyezkedése a JAK2 génen a V617F mutáció és az rs1234867 polimorfizmus pozíciójához viszonyítva. A PCR termékek mérete és a V617F mutáció és az rs1234867 polimorfizmus távolsága bázispárban (bp) van feltüntetve. Az 'A' panel primereit és próbáit egy reakcióban használtuk a JAK2 V617F negatív MPN és AML, valamint a kontroll minták esetében. A 'B' panelen a JAK2 V617F-pozitív MPN minták esetében alkalmazott két külön reakcióban lezajló PCR összetétele látszik. Az 1. reakcióban a mutáns allél-specifikus forward primer (JAK2-617F-forw, csíkozott nyílhegygel) csak a V617F mutáció pozitív allélt, a 2. reakcióban a vad típusú allél-specifikus forward primer (JAK2-617V-forw) csak a V617F mutáció által nem érintett allélt sokszorozza fel. Mindkét reakcióban a PCR termék 538 bp hosszúságú és a hibridizációs oligonukleotidok segítségével az adott allél rs1234687 genotípusa meghatározható.

251 V617F pozitív MPN eset közül 57, illetve 50 eset azonos TT vagy CC genotípust mutatott mind a 617F, mind a 617V specifikus amplifikációban, így ezeknél a mintáknál TT és CC veleszületett genotípust állapítottunk meg. 144 CT genotípusú esetről a 617F és 617V specifikus primerrel készült PCR termékek görbéi eltértek egymástól (11. ábra). A 617F specifikus amplifikáció homozigóta CC genotípust mutatott a heterozigóta esetek 85%-ában (122/144), míg TT genotípust az esetek 13%-ában (19/144) és CT genotípust az esetek 2%-ában (3/144) (11. ábra).

A 46/1 haplotípus hordozó gyakorisága (domináns modell: rs1234867 C allél hordozók [CC és CT genotípusok együtt] vs. nem-hordozók [TT genotípus]) emelkedett volt a teljes MPN-csoportban ( $74,4 \pm 4,9\%$ ,  $p < 0,0001$ , OR [95%CI]: 3,1 [2,3-4,4]), valamint minden diagnózis szerint felállított MPN-alcsoportban (PV, ET, PMF) a kontroll csoporthoz viszonyítva ( $48,0 \pm 5,5\%$ ) (6. táblázat). A 46/1 haplotípust hordozók aránya szignifikánsan magasabb volt V617F-pozitív MPN-ben ( $77,3 \pm 5,3\%$ ), mint V617F-negatív MPN-ben ( $62,3 \pm 12,4\%$ ,  $p = 0,022$ ; OR: 2,06 [1,14-3,74]). A V617F-negatív MPN (ET és PMF) csoport hordozó gyakorisága szintén magasabb volt, mint a kontroll csoporté ( $p = 0,0507$ , OR [95%CI]: 1,79 [1,02-3,13]).



**11. ábra** A 46/1 haplotípus (*rs12343867* genotípus) vizsgálata két különböző 617F és 617V allél specifikus PCR-rel és olvadási görbe analízissel. A 617F specifikus amplifikáció után kapott olvadási görbe szaggatott, a 617V specifikus amplifikáció után kapott olvadási görbe folyamatos vonallal jelölt. Az *rs12343867* T allél 50,5°C-nál, a C allél 57,5°C-nál látható az olvadási görbén. Mind a négy bemutatott minta CT genotípusú. **'A' panel:** JAK2 V617F negatív minta, 617F specifikus amplifikáció nem észlelhető. **'B-D' panelek:** Három reprezentatív JAK2 V617F-pozitív minta. A V617F-pozitív esetek többségében (85%-ban) a minta a B panelen bemutatott képet adta: heterozigóta genotípus a 617V-allél specifikus reakcióban és izolált 'C' allél jelenlét a 617F-specifikus reakcióban. A minták kisebb hányadában (13%-ban) ellentétes mintázat figyelhető meg: 617F specifikus reakcióban izolált 'T' allél jelenlét (C panel). A 'D' panelen feltüntetett esetben a V617F mutáció mind a C, mind a T alléleket egyaránt érinti.



**6. táblázat** A 46/1 haplotípussal kapcsolatos öröklődő rs12343867 polimorfizmus genotipizálása a kontroll és a beteg csoportokban. a 46/1 haplotípus C, a vad haplotípus T nukleotidot tartalmaz a rs12343867 pozícióban.

Kontroll/Beteg csoport	n	TT/CT/CC genotípusok száma	'C' allél frekvencia ± 95%CI (%)	Hordozó gyakoriság (%)	P <sup>#</sup>	OR	(95%CI)
Kontroll	331	172/124/35	29,3±3,5	48,0±5,5	-	-	-
MPN (teljes)	312	80/178/54	45,8±4,0	74,4±4,9	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,14</b>	<b>(2,25-4,38)</b>
◆ V617F pozitív MPN	251	57/144/50	48,6±4,5	77,3±5,3	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,68</b>	<b>(2,55-5,31)</b>
◆ V617F negatív ET&PMF	61	23/34/4	34,4±8,6	62,3±12,4	0,0507	<b>1,79</b>	<b>(1,02-3,13)</b>
●PV (V617F pozitív*)	153	30/98/25	48,4±5,7	80,4±6,4	<b>&lt;0,0001</b>	<b>4,44</b>	<b>(2,82-6,98)</b>
●ET	131	42/69/20	41,6±6,1	67,9±8,2	<b>0,0001</b>	<b>2,29</b>	<b>(1,50-3,51)</b>
◆ V617F pozitív ET	78	22/38/18	47,4±8,0	71,8±10,2	<b>0,0001</b>	<b>2,75</b>	<b>(1,61-4,72)</b>
◆ V617F negatív ET	53	20/31/2	33,0±9,1	62,3±13,3	0,0751	1,79	(0,98-3,24)
●PMF	28	8/11/9	51,8±13,4	71,4±17,1	<b>0,0188</b>	<b>2,70</b>	<b>(1,16-6,32)</b>
◆ V617F pozitív PMF	20	5/8/7	55,0±15,7	75,0±19,4	<b>0,0216</b>	<b>3,25</b>	<b>(1,15-9,14)</b>
◆ V617F negatív PMF	8	3/3/2	43,8±24,8	62,5±34,2	0,4904	1,80	(0,42-7,67)
AML (teljes)*	339	175/132/32	28,9±3,5	48,4±5,4	0,9385	1,01	(0,75-1,37)
●NK-AML	129	56/61/12/	32,9±5,9	56,6±8,7	0,1193	1,41	(0,94-2,12)
◆ NK-AML<55 év	90	36/44/10	35,6±7,1	60,0±10,3	0,0568	<b>1,62</b>	<b>(1,01-2,61)</b>
◆ NK-AML<45 év	44	15/26/3	36,4±10,3	65,9±14,3	<b>0,0361</b>	<b>2,09</b>	<b>(1,08-4,05)</b>
●Nem-NK AML	188	109/64/15	25,0±4,5	42,0±7,2	0,2001	0,78	(0,55-1,13)

# A 46/1 haplotípust nem-hordozó (TT genotípusú) és hordozó (CT és CC genotípusú) egyének gyakorisága az adott betegcsoportban összevetve a kontroll csoport értékeivel (Fisher teszttel).

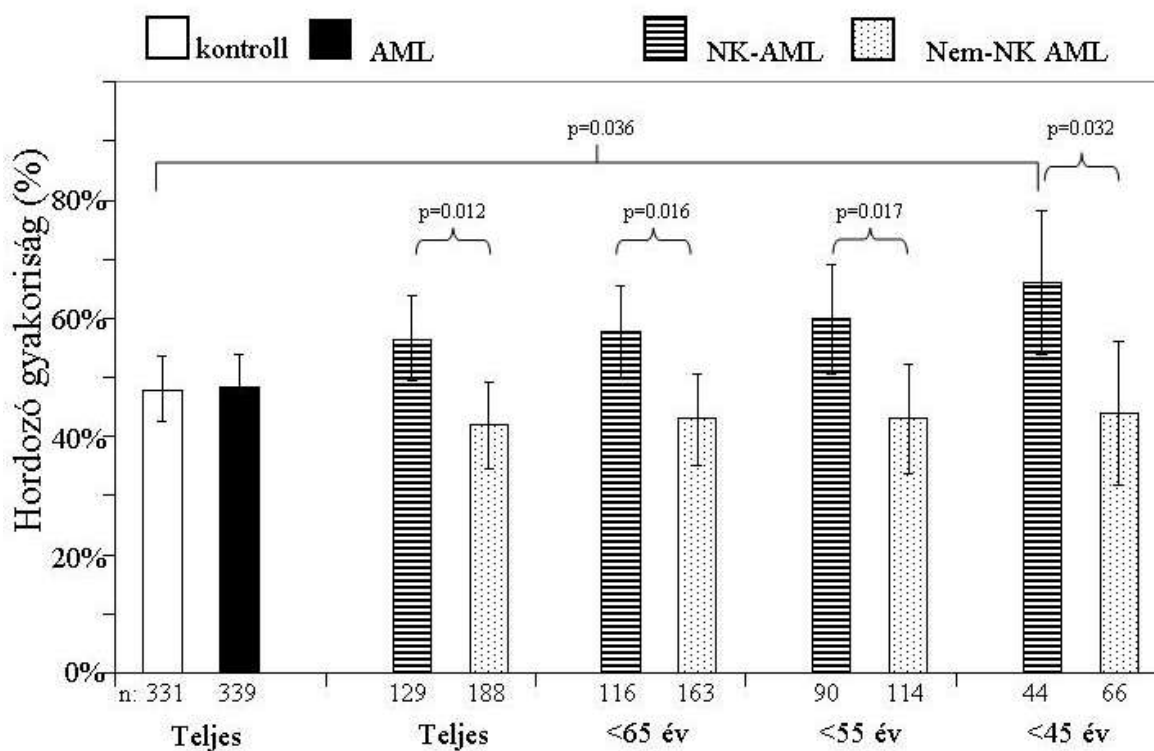
\*A JAK2 V617F mutáció negatív PV eseteket (n=22), és a V617F pozitív AML (n=4) eseteket kizártuk a vizsgálatból. A szignifikáns p értékeket vastagított karakterrel jelöltük.

Rövidítések: AF: a 46/1 haplotípussal kapcsolatos öröklődő rs12343867 polimorfizmus 'C' allél frekvenciája, AML: akut myeloid leukémia, CI: konfidencia intervallum; ET: essentialis thrombocythaemia; MPN: myeloproliferatív neoplasia, n: esetszám, NK-AML: normál karyotípusú AML, OR: odds ratio (esélyhányados); PMF: primer myelofibrosis; PV: polycythaemia vera.

A különböző 46/1 genotípusú (homo-, heterozigóta ill. vad típusú), PV-ben, ET-ben és PMF-ben szenvedő betegek csoportjában nem tért el a nemek eloszlása, az életkor és a különböző laboratóriumi eredmények a diagnóziskor (Hb, WBC, PLT) vagy a vaszkuláris szövődmények és a leukémiás transzformáció gyakorisága. A vaszkuláris szövődmények közül a vénás, az artériás és a vérzésemes szövődmények előfordulási gyakoriságát külön-külön elemezve sem találtunk különbséget. Az egyetlen MPN szövődmény, amelynek a kialakulási gyakoriságában eltérés volt a különböző 46/1 haplotípusú egyének között a myelofibrosis volt. A primer vagy a szekunder myelofibrosis gyakorisága az rs1234867 CC homozigóta egyének csoportjában 32%, míg a nem CC homozigóta egyéneknél 12% volt ( $p=0,001$ ). A csak PV/ET-t követő myelofibrosis szintén gyakrabban fordult elő 46/1 homozigóta egyéneknél, mint a nem homozigótáknál a V617F pozitív PV és ET betegek csoportjában [18% (8/44 CC) vs. 5% (12/234 nem-CC),  $p=0,006$ ].

Az AML csoport 46/1 haplotípus hordozó gyakorisága ( $48,4\pm 5,4\%$ ) nem tért el a kontroll csoporttól. A V617F pozitív AML ( $n=4$ ) eseteket kizártuk a vizsgálatból. Megvizsgáltuk a 46/1 haplotípus gyakoriságát különböző AML alcsoportokban (karyotípus, FLT3 és NPM1 mutáció státusz szerint csoportosítva), hogy teszteljük a 46/1 haplotípus lehetséges társulását különböző mutációs mechanizmusokkal. A betegek 19%-a (59/317) a jó prognózisú karyotípus csoportba [30 beteg a  $t(15;17)$ , 16 beteg a  $t(8;21)$ , 13 beteg pedig az  $inv(16)$  kromoszóma eltérésre volt pozitív], a betegek 54%-a (172/317) a közepes prognózisú (ezen belül 129/172 normál karyotípusú AML), míg a betegek 27%-a (86/317) a rossz prognózisú karyotípus csoportba tartozott. Eltérő 46/1 haplotípus hordozói gyakoriságot találtunk a normál karyotípusú (NK) AML betegcsoportban a kóros karyotípusú csoporthoz viszonyítva ( $56,6\pm 8,7\%$  vs.  $42,0\pm 7,2\%$ ,  $p=0,012$ , OR [95%CI]: 1,80 [1,14-2,83]). A fiatalabb NK-AML betegeknél a 46/1 haplotípus hordozói gyakoriság emelkedő tendenciát mutatott (NK-AML < 55 év:  $60,0\pm 10,3\%$ , NK-AML < 45 év  $65,9\pm 14,3\%$ ), míg a kóros karyotípusú AML csoportban az életkortól függetlenül a kontroll csoporthoz hasonló hordozó gyakoriságot észleltünk (12. ábra). A 46/1 haplotípust hordozók aránya fiatal életkorban magasabb volt, mint a kontroll csoport hordozó gyakorisága (NK-AML < 45 év vs. kontroll  $p=0,0361$ , OR [95%CI]: 2,09 [1,08-4,05]). A

46/1 haplotípus eloszlás nem tért el az FLT3 ITD, TKD és NPM1 pozitív, illetve negatív alcsoportokban sem a teljes AML, sem a NK-AML csoportban.



**12. ábra** 46/1 haplotípus hordozó gyakoriság (és 95%-os konfidencia intervallum) karyotípus és életkor szerint bontott AML alcsoportokban. A számítás során a haplotípust hordozók (rs1234867 CT és CC genotípusok együtt) és a nem-hordozók (TT) arányát vetettük össze Fisher teszttel. Az oszlopok alatt feltüntetett számok az esetszámokat jelzik.

Rövidítések: AML: akut myeloid leukémia, NK: normál karyotípus.

#### 4.5 A JAK2 46/1 haplotípus prognosztikai szerepe AML-ben

A JAK2 46/1 haplotípus prognosztikai szerepe szerint is jellemzett 176 AML betegnél a 46/1 haplotípus gyakoriság  $29,3 \pm 4,8\%$  volt. A genotípus megoszlás nem tért el a Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE:  $p=0,7$ ): TT genotípust 87 esetben (49,4%), CT genotípust 75 esetben (42,6%), míg CC genotípust 14 esetben (8,0%) azonosítottunk. A statisztikai vizsgálatoknál itt a domináns modellt alkalmaztuk, ahogy a teljes AML csoportban, vagyis a C allélt hordozó egyéneket összevontuk (CT és CC genotípus) és így hasonlítottuk össze a nem hordozókkal (TT genotípus).

Ezen 176 beteg klinikai jellemzőit a 7. táblázatban tüntettük fel. Kor, nem és az AML etiológiája szerint a 46/1 hordozók és nem hordozók nem tértek el egymástól. FAB szubtípus szerint csoportosítva kevesebb 46/1 hordozó esetet találtunk az M2 morfológiai csoportban a nem hordozókhoz képest [5,6% (5/89 CT és CC) vs. 17,2% (15/87 TT),  $p=0,018$ ], míg az M4 csoportban (akut myelomonocitás leukémia) gyakoribb volt a 46/1 hordozó genotípus [28,1% (25/89 CT és CC) vs. 14,9% (13/87 TT),  $p=0,044$ ]. Az FLT3 ITD és NPM1 mutációk megoszlása nem tért el a 46/1 hordozó és nem hordozó csoport között. Hasonló megoszlást figyeltünk meg normál karyotipusú AML-ben (NK-AML) is (FAB M2:  $p=0,031$ , FAB M4:  $p=0,035$ , 8. táblázat).

**7. táblázat** Az AML betegcsoport kezelés előtti, klinikai és molekuláris jellemzői JAK2 46/1 haplotípus szerint.

Paraméter	Teljes AML (n=176)			
	Összes genotípus n=176	46/1 nem hordozó (TT) n=87	46/1 hordozó (CT+CC) n=89	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>AML etiológia</b>				
de novo	149 (84,7)	72 (82,8)	77 (86,5)	0,53
MDS-AML	19 (10,8)	10 (11,5)	9 (10,1)	0,81
t-AML	8 (4,5)	5 (5,7)	3 (3,4)	0,49
<b>Életkor</b>				
18 – 45 years	74 (42,0)	34 (39,1)	40 (44,9)	0,45
46 – 60 years	102 (58,0)	53 (60,9)	49 (55,1)	
<b>Nem</b>				
Nő	99 (56,2)	46 (52,9)	53 (59,6)	0,45
Férfi	77 (44,8)	41 (47,1)	36 (40,4)	
<b>FAB</b>				
0	15 (8,5)	8 (9,2)	7 (7,9)	0,79
1	50 (24,8)	27 (31,0)	23 (25,8)	0,51
2	20 (11,4)	<b>15 (17,2)</b>	<b>5 (5,6)</b>	<b>0,018</b>
3	11 (6,3)	6 (6,9)	5 (5,6)	0,76
4	38 (21,6)	<b>13 (14,9)</b>	<b>25 (28,1)</b>	<b>0,044</b>
5	39 (22,2)	15 (17,2)	24 (27,0)	0,15
6	2 (1,1)	2 (2,3)	0 (0)	0,24
7	1 (0,6)	1 (1,1)	0 (0)	0,49
<b>Prognosztikai csoport citogenetika alapján</b>				
Jó	25 (14,3)	14 (16,1)	11 (12,5)	0,52
Közepes	102 (58,3)	45 (51,7)	57 (64,8)	0,09
Súlyos	48 (27,4)	28 (32,2)	20 (22,7)	0,18
Hiányzó adat	1		1	
<b>Mutációk</b>				
FLT3 ITD+	41 (23,8)	18 (21,2)	23 (26,4)	0,48
Hiányzó adat	4	2	2	
NPM1+	41 (24,1)	18 (21,4)	23 (26,7)	0,48
Hiányzó adat	6	3	3	

**8. táblázat** A NK-AML betegcsoport kezelés előtti, klinikai és molekuláris jellemzői JAK2 46/1 haplotípus szerint.

Paraméter	NK-AML (n=81)				p	
	Összes genotípus n=81		46/1 nem hordozó (TT) n=34			46/1 hordozó (CT+CC) n=47
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>AML etiológia</b>						
de novo	69	(85,2)	29	(85,3)	40	(85,1)
MDS-AML	7	(8,6)	2	(5,9)	5	(10,6)
t-AML	5	(6,2)	3	(8,8)	2	(4,3)
<b>Életkor</b>						
18 – 45 év	37	(45,7)	14	(41,2)	23	(48,9)
46 – 60 év	44	(54,3)	20	(58,8)	24	(51,1)
<b>Nem</b>						
Nő	46	(56,8)	18	(52,9)	28	(59,6)
Férfi	35	(43,2)	16	(47,1)	19	(40,4)
<b>FAB</b>						
0	3	(3,7)	1	(2,9)	2	(4,3)
1	25	(30,9)	13	(38,2)	12	(25,5)
2	9	(11,1)	<b>7</b>	<b>(20,6)</b>	<b>2</b>	<b>(4,3)</b>
3	0	(0)	0	(0)	0	(0)
4	20	(24,7)	<b>4</b>	<b>(11,8)</b>	<b>16</b>	<b>(34,0)</b>
5	24	(29,6)	9	(26,5)	15	(31,9)
6	0	(0)	0	(0)	0	(0)
7	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<b>Mutációk</b>						
FLT3 ITD+	27	(34,1)	11	(32,4)	16	(35,6)
Hiányzó adat	2		0		2	
NPM1+	34	(43,6)	14	(41,2)	20	(45,5)
Hiányzó adat	3		0		3	

A betegség kimenetelét 46/1 hordozóknál és nem hordozóknál a 9. és a 10. táblázatban tüntettük fel. A teljes csoportban a 46/1 haplotípus hordozók és nem hordozók esetén hasonló volt a komplett remissziós ráta (CR), míg NK-AML-ben tendencia volt megfigyelhető az alacsonyabb CR felé a 46/1 hordozók között [78,7% (37/47 CT és CC) vs. 94,1% (32/34 TT) OR (95%CI): 4,32 (0,88-21,22), p=0,064]. A relapszus arány hasonló volt a 46/1 hordozók és nem hordozók között a teljes AML csoportban (9. táblázat) és NK-AML-ben (10. táblázat) is. NK-AML-ben a fertőzés okozta halál remisszióban vagy apláziában szignifikánsan gyakoribb volt a 46/1 hordozók között a nem hordozókhöz képest [46,8% (22/47 CT és CC) vs. 23,5% (8/34 TT); OR ( $\pm$ 95%CI): 2,86 (1,08-7,61), p=0,038].

**9. táblázat** *A betegség kimenetele a 46/1 haplotípus szerint a teljes AML betegcsoportban karyotípustól függetlenül. Az összehasonlítást a 46/1 hordozók (az rs12343867 SNP CT és CC genotípusa) és a 46/1 nem hordozók között (az rs12343867 SNP TT genotípusa) végeztük.*

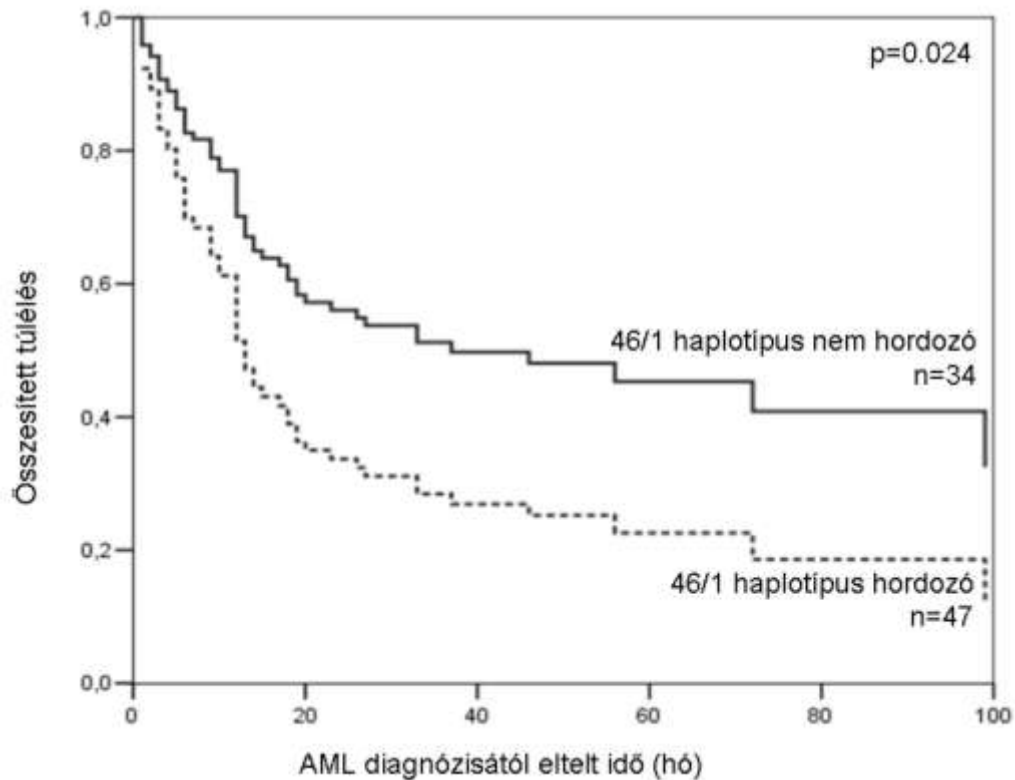
	Teljes AML						
	Összes genotípus n=176		46/1 nem hordozó (TT) n=87		46/1 hordozó (CT+CC) n=89	p	
	n	(%)	n	(%)	n		(%)
<b>Komplett remisszió</b>	126/176	(71,6)	63/87	(72,4)	63/89	(70,8)	0,87
<b>Korai halál</b>	22/176	(12,5)	14/87	(16,1)	8/89	(9,0)	0,18
<b>Rezisztencia</b>	28/176	(15,9)	10/87	(11,5)	18/89	(20,2)	0,15
<b>Relapszus</b>	61/126	(48,4)	30/63	(47,6)	31/63	(49,2)	1,00
<b>Él</b>	51/176	(29,0)	27/87	(31,0)	24/89	(27,0)	0,62
<b>Halál oka: fertőzés*</b>	71/176	(40,3)	32/87	(36,8)	39/89	(43,8)	0,36
<b>Halál oka: egyéb**</b>	54/176	(30,7)	28/87	(32,2)	26/89	(29,2)	0,74

**10. táblázat** *A betegség kimenetele a 46/1 haplotípus szerint a citogenetikailag normál AML (NK-AML) betegcsoportban. Az összehasonlítást a 46/1 hordozók (az rs12343867 SNP CT és CC genotípusa) és 46/1 nem hordozók között (az rs12343867 SNP TT genotípusa) végeztük.*

	NK-AML						
	Összes genotípus n=81		46/1 nem hordozó (TT) n=34		46/1 hordozó (CT+CC) n=47	p	
	n	(%)	n	(%)	n		(%)
<b>Komplett remisszió</b>	69/81	(85,2)	32/34	(94,1)	37/47	(78,7)	0,064
<b>Korai halál</b>	4/81	(4,9)	1/34	(2,9)	3/47	(6,4)	0,64
<b>Rezisztencia</b>	8/81	(9,9)	1/34	(2,9)	7/47	(14,9)	0,13
<b>Relapszus</b>	36/69	(52,2)	15/32	(46,9)	21/37	(56,8)	0,47
<b>Él</b>	26/81	(32,1)	15/34	(44,1)	11/47	(23,4)	0,058
<b>Halál oka: fertőzés*</b>	30/81	(37,0)	<b>8/34</b>	<b>(23,5)</b>	<b>22/47</b>	<b>(46,8)</b>	<b>0,038</b>
<b>Halál oka: egyéb**</b>	25/81	(30,9)	11/34	(32,4)	14/47	(29,8)	0,81

A teljes AML csoportban univariancia analízissel a fiatalabb életkor (<45 év), illetve a közepes és a jó prognózisú karyotípus szignifikánsan hosszabb túléléssel társult (DFS és OS); viszont a nem, az FLT3 ITD és az NPM1 mutációk független tényezőként nem befolyásolták a túlélést. Mivel az FLT3 ITD és a NPM1 mutációk gyakran társulnak és a prognózist ellentétesen befolyásolják (az FLT3 ITD rossz, míg az NPM1 jó prognózisú) [74], megvizsgáltuk a két mutáció kombinált hatását is a túlélésre. Az NPM1 mutáció pozitívitás FLT3 ITD nélkül (NPM1<sup>pos</sup>-FLT3<sup>neg</sup>: alacsony kockázatú csoport) hosszabb DFS-el társult a többi kombinációhoz képest (NPM1<sup>neg</sup>-FLT3<sup>neg</sup>, NPM1<sup>pos</sup>-FLT3<sup>pos</sup>, NPM1<sup>neg</sup>-FLT3<sup>pos</sup> együtt: magas kockázatú csoport). A 46/1 haplotípus nem befolyásolta a túlélést a teljes AML csoportban. Univariancia analízissel az NK-AML csoportban szignifikáns különbséget figyeltünk meg a túlélésben (DFS és OS), ha a 46/1 haplotípus és az NPM1-FLT3 kombinált mutáció státusz kockázatát elemeztük. A 46/1 hordozók között szignifikánsan rövidebb volt a DFS és az OS a normál karyotípusú csoportban (DFS: p=0,028; OS: p=0,027), viszont a nem normál karyotípusú csoportban nem volt különbség (DFS: p=0,53; OS: p=0,30). Multivariancia analízissel a 46/1 haplotípus rövidebb túlélést eredményezett az életkortól és az NPM1-FLT3 kombinált mutáció státusztól függetlenül NK-AML-ben (DFS: p=0,024; OS: p=0,024) (13. ábra).





**13. ábra** Összesített túlélés a citogenetikailag normál AML (NK-AML) csoportban a 46/1 haplotípus hordozók és nem hordozók esetén.

Az NPM1 és az FLT3 ITD mutációkra negatív NK-AML betegcsoportban a 46/1 hordozóknál rövidebb túlélést figyeltünk meg a nem hordozókhöz képest (DFS:  $p=0,022$ ; OS:  $p=0,015$ ), azonban az NPM1 vagy az FLT3 ITD pozitív csoportokban nem találtunk ilyen különbséget. A terápiás lehetőségek nem különböztek a 46/1 hordozók és a nem hordozók között sem a teljes, sem pedig a NK-AML csoportban, így valószínűleg nem a terápia variabilitása felelős a túlélésbeli különbségekért.

## 5. Megbeszélés

### 5.1 Myeloproliferatív neopláziák

Munkánk során különböző szerzett és örökletes genetikai tényező szerepét vizsgáltuk egyes hematológiai betegségekben. Krónikus myeloid leukémiában a két fő tirozin kináz inhibitor rezisztencia mechanizmus, a BCR-ABL TKD mutációk és az addicionális kromoszóma eltérések (ACA) gyakoriságát és prognosztikai szerepét határoztuk meg. Ismereteink szerint ilyen típusú szisztematikus vizsgálat ezt megelőzően még nem történt. A BCR-ABL TKD mutáció gyakorisága imatinib rezisztens betegekben 12% és 63% között változott korábbi vizsgálatokban [22, 75-81]. Ezt a széles tartományt azzal magyarázhatjuk, hogy a különböző vizsgálatokban a betegek eltérő arányban voltak a betegség előrehaladottabb fázisaiban. Mi viszonylag alacsony (36%) mutáció gyakoriságot találtunk, valószínűleg a krónikus fázisú betegek nagyobb aránya miatt az akcelerált és blasztos fázisban lévő, illetve az ALL-es betegekhez képest (62%, 20%, 10%, 8% sorrendben). Az irodalmi adatok szerint a BCR-ABL TKD mutáció gyakorisága 13-42% volt CP-ben, 52-83% AP-ben és 67-83% BP-ben. Emelkedett mutáció gyakoriságot találtak késői CP-ben (31-42%) a korai CP-hez képest (13-25%) [22, 24, 82-84]. A betegség fázisa szerint csoportosítva a betegeket, mi is hasonló TKD mutáció gyakoriságot találtunk. A betegek nagyobb részénél alakult ki mutáció, ha az imatinib kezelést előrehaladottabb fázisban kezdték, azokhoz képest, akiknél krónikus fázisban indult a terápia (korai CP vs. késői CP és AP együtt vs. BP:  $p=0,026$ ). Hasonlóan az irodalmi adatokhoz [22, 23, 77, 79], a mi anyagunkban a következők voltak a leggyakoribb mutációk: M244V, E255V, T315I, M351T és F359I/V; a leggyakoribb ACA-k pedig a +8, a +Ph, és az i(17q) voltak. Elsőként vizsgáltuk a BCR-ABL TKD mutáció és ACA jelenléte közötti összefüggést. Mivel a mutáció és az ACA random módon társultak egymással (nem találtunk asszociációt), arra következtettünk, hogy két különböző rezisztencia mechanizmust képviselnek.

Megerősítettük, hogy az összesített túlélést a TKD mutáció jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja imatinibbel kezelt betegek esetén, és ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a rezisztencia TKD mutáció hiányában is kialakulhat [22]. Másrészről viszont azoknál a

betegeknél, akiknél volt ACA, az összesített és eseménymentes túlélés (OS és EFS) szignifikánsan rövidebbnek bizonyult, mint azoknál, akiknél nem találtunk ACA-t. Kimutatták, hogy a klonális evolúció a betegség progresszióját jelzi [23] és összefügg a betegség fázisával [77]. Mi azt találtuk, hogy imatinib rezisztens betegeknél az OS rosszabb BP esetén, mint AP-ben és CP-ben ( $p < 0,001$ ), ami arra utal, hogy az ACA kedvezőtlen prognosztikai faktor.

A nilotinib és a dasatinib *in vitro* aktivitással rendelkezik az imatinib rezisztens TKD mutánsokkal szemben, a T315I kivételével [85]. *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a nilotinib koncentrációtól függően főleg a T315I, az L248V, a P-loop mutációk, az F359C, az L384M és az L387F mutáns klónok jelennek meg, dasatinibnél pedig L248, Q252, 255, V299, T315, és F317 variánsokat hordozó mutáns klónokat találtak. Nilotinib kezelés során az Y253H, az E255K/V, az F359C/V, míg dasatinib alatt a V299L és a F317L/V/I/C mutációk társultak alacsonyabb válasz-aránnyal és magasabb progresszió aránnyal [75, 79, 81]. Ahogy az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján várható volt, mi is kevesebb féle mutációt találtunk második generációs TKI kezelés során, mint imatinib terápia alatt. Nilotinib rezisztens betegeknél Y253H, T315I, és F359V/I mutációk jelentek meg, illetve perzisztáltak. Az F359I mutációt a korábbi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban nem azonosították nilotinib rezisztenciában, csak az F359V és F359C aminosav cseréket.

Az ACA gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a különböző TKI kezelések során. Dasatinib rezisztens betegekben T315I, E279K, és L248M mutáció jelent meg, vagy perzisztált, ugyanakkor a dasatinib klinikailag hatékony volt az M244V, Y253H és F359V mutációkkal szemben. A mutáció gyakoriság magasabb volt nilotinib kezelés alatt, azonban a T315I mutáció szignifikánsan többször jelent meg dasatinib terápia során (2. táblázat). Ez megegyezik Soverini és mtsai megfigyelésével [86], miszerint a T315I a dasatinib rezisztens betegeknél egy úgynevezett mutációs “hotspot” lehet.

Korábban a második generációs TKI-val kezelt betegek terápiás válaszána és a betegség hosszútávú kimenetelének előrejelzéséhez azokat a BCR-ABL mutációkat vizsgálták [75, 76, 79], amelyek imatinib kezelés során jelentek meg, vagyis a második generációs TKI kezdetekor már detektálhatóak voltak. Ezek a vizsgálatok nem vették figyelembe, hogy az adott mutáció hogyan reagál a második generációs TKI kezelésre. A

fenti megközelítésekkel ellentétben, mi azokra a mutációkra koncentráltunk, amelyek a második generációs TKI terápia során voltak jelen (megjelentek, vagy perzisztáltak). Ezeknek a mutációknak és az ACA-knak a jelenléte rossz prognosztikai faktornak bizonyult. Korábban azt találták [25], hogy a TKD mutációk jelenléte a második generációs TKI kezeléskor sem befolyásolja a túlélést, de ott a T315I gyakorisága a mi vizsgálatunkhoz képest alacsonyabb volt, ami magyarázhatja a betegcsoportok különböző túlélési eredményeit. Megerősítettük, hogy a további kromoszóma eltérések rontják mind az OS-t, mind az EFS-t.

A BCR-ABL TKD mutációkon és a klonális evolúción kívül a közelmúltban egy újabb, a BCR-ABL-t érintő feltételezett rezisztencia mechanizmus került a figyelem középpontjába. Imatinib rezisztens CML betegeknél több esetben találtak BCR-ABL alternatív mRNS érést (splicing), amit pusztán ennek alapján hoztak összefüggésbe a rezisztenciával. [29, 33, 87]. Mivel egyes csoportok kimutatták az ABL INS35-t és a  $\Delta$ exon7-t normál cDNS mintákban [88, 89], az összefüggés a splice variánsok és az imatinib-rezisztencia között vitatottá vált. Egy újabb vizsgálat megerősítette, hogy a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> variáns gyakori imatinibvel kezelt betegeknél, és nincs összefüggés a variáns jelenléte és a rezisztencia kialakulása között [38]. Több csoport is detektált  $\Delta$ exon7-t direkt szekvenálással a BCR-ABL TKD mutáció analízis során imatinib rezisztens CML betegeknél, 2-34%-os gyakorisággal [37, 38, 87, 88, 90]. A mi szekvenálással kapott eredményünk (17%) egyezik a korábbi irodalmi adatokkal.

Irodalmi adatok szerint a szekvenálásnál érzékenyebb módszerekkel a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> nagyobb gyakorisággal detektálható (54% HRM-mel, 67% fragmens analízissel és 24% Scorpions-based allél specifikus PCR-rel az ABL-en, normál cDNS mintákon) [38, 88]. Mi fragmens analízissel és allél-specifikus PCR-rel az imatinib naív vagy rezisztens CML betegeknél több, mint 70%-ánál találtunk BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>-t. Diagnóziskor és rezisztenciakor gyakoribb volt a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>, mint a terápiás válasz időpontjában. A diagnózisos és rezisztens minták között viszont nem volt különbség a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> gyakoriságát illetően, amiből arra következtethetünk, hogy a  $\Delta$ exon7 jelenléte és a rezisztencia között nincs összefüggés. A terápiás válasz időpontjában mért szignifikánsan alacsonyabb BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> gyakoriságot pedig az alacsony BCR-ABL kópiaszámokkal magyarázhatjuk,

vagyis ahol nem találtunk  $\Delta$ exon7-t, ott a BCR-ABL is alacsonyabb szinten expresszáldott. Valószínűleg tehát ennek az összefüggésnek köszönhető a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> emelkedett gyakorisága rezisztens betegeknél [87, 88]. A BCR-ABL-lel ellentétben, az ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> kimutatásakor hasonló gyakoriságot figyeltünk meg érzékeny módszerekkel a terápia különböző időpontjaiban CML betegeknél, valamint az egészséges kontrolloknál. Továbbá, a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> gyakorisága hasonló volt az ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> gyakoriságához diagnóziskor és rezisztenciakor, vagyis a  $\Delta$ exon7 valószínűleg egy gyakori splice variáns, ami független a BCR-ABL transzlokációtól.

A  $\Delta$ exon7 mennyiségi meghatározásához, vagyis az ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>/ABL arány méréséhez kétféle módszert hasonlítottunk össze: alap és nested PCR-t, mindkettőt kétféle detektálással, Q-PCR-rel és fragmens analízissel. A variációs koefficiens (szórás/átlag) a nested PCR esetén magasabb volt, mint alap PCR esetén mindkét detektálási módszerrel (96% vs. 30% fragmens analízissel és 110% vs. 72% Q-PCR-rel), vagyis a nested PCR valószínűleg nem megfelelő módszer mennyiségi meghatározásra sem Q-PCR-rel, sem pedig fragmens analízissel. Egy korábbi vizsgálatban [38] fragmens analízist használtak nested PCR-t követően a BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> mennyiségi meghatározására, de alap Q-PCR-t az ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> esetében. Ennek oka az volt, hogy Q-PCR-nél SYBRGreen jelölési technikát alkalmaztak, és mivel ez a festék minden duplaszálú DNS-hez kötődik a DNS szekvenciájától függetlenül, nested PCR során esetleg egyéb, nem a második PCR reakcióban képződött PCR termék zavarta volna a kvantitálást. Azt találták, hogy a fragmens analízissel mért BCR-ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>/BCR-ABL arány 20-szor magasabb, mint a Q-PCR-rel mért ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>/ABL arány, de ezt a megfigyelésüket nem magyarázták meg [38]. A kétféle módszer összehasonlításakor mi is hasonló eredményre jutottunk. A fragmens analízissel mért ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup>/ABL arány nálunk is 15-100-szor magasabb volt, mint a Q-PCR-rel mért arány, attól függetlenül, hogy alap vagy nested PCR technikát alkalmaztunk. Feltételezzük, hogy a 7. exon deléciós és nem deléciós ABL amplifikációja ugyanazon reakcióban a rövidebb (deléciós) PCR termék preferenciális amplifikációjához vezethet fragmens analíziskor. Q-PCR esetén ez az amplifikációs eltérés nem történik meg, mivel ott allél-specifikus primert használunk, amely az ABL 6. és 8. exonok határára tapad, külön

amplifikálva a deléciós és a nem deléciós ABL-t. Úgy gondoljuk, hogy a  $\Delta$ exon7-t 20%-nál nagyobb mennyiségben való detektálása (pl. szekvenálással) csupán egy technikai probléma miatt lehetséges, amit a preferenciális amplifikáció okoz. Mindezek alapján minden olyan módszer, ahol a deléciós és a nem deléciós ABL-t ugyanazon reakcióban amplifikáljuk (szekvenálás, fragmens analízis) alkalmatlan a mennyiségi meghatározásra. Az ABL <sup>$\Delta$ exon7</sup> valós mennyisége inkább a Q-PCR módszerrel mért értékhez lehet közelebb (0.1-0.3% a mi mérésünk szerint, 1% Gaillard és mtsai eredményei szerint [38]). Ennél nagyobb mennyiségű splice variáns valószínűleg lebomlik a nonsense mediated decay (NMD) mechanizmus során *in vivo*, amely a transláció első körében a citoplazmában működő ún. ellenőrző (surveillance) mechanizmus gerincesekben [91]. A normál mRNS transláció első körében a riboszóma az mRNS-hez kötődik és megkezdí az aminosav lánc hosszabbítását. Folytatja ezt addig, amíg el nem ér egy exon junction komplexhez (EJC), ekkor azt eltávolítja. A transláció akkor van kész, ha a riboszóma stop kodonhoz ér. NMD során az mRNS korai stop kodont tartalmaz egy nonsense mutáció következtében, és ha ez a kodon az EJC előtt van, akkor megkezdődik az mRNS lebontása és nem képződik fehérje [92]. Mivel az ABL gén 11 exonból áll, az érett mRNS 10 exon junction complexet (EJC) tartalmaz. A  $\Delta$ exon7 olvasási keret eltolódást okoz, aminek következtében korai stop kodon (premature termination codon, PTC) jön létre a 8. exonban. A korai stop kodon után 3 EJC marad az mRNS-en, ami kiváltja az mRNS lebontását a NMD mechanizmus által. A legújabb kutatások szerint a PTC-t tartalmazó mRNS translációjának első köréből származó fehérjék korlátozott proteolízisen mennek keresztül és az MHC I útvonal szubsztrátjaivá válnak [93].

Mivel kevés információ áll rendelkezésre a minor izoformák által kódolt fehérjék létezéséről, számos cikkben bioinformatikai eszközök segítségével jósolják meg ezen izoformák életképességét [69, 94]. Ezzel a megközelítéssel azt találtuk, hogy azontúl, hogy a  $\Delta$ exon7 minor izoforma translációs hatékonysága erősen csökkent, az ebből képződött fehérje nem működőképes és nem életképes. Az ABL TKD-nek legalább két funkcionális része van, az N-terminális ATP-kötő hely (amely számos  $\beta$ -redőből áll) és az aktivációs hurok [73]. Míg az ATP-kötő régió érintetlen a  $\Delta$ exon7-t tartalmazó izoformában, az aktivációs hurok teljesen hiányzik (8B ábra), ami szignifikáns szerkezeti változást okoz és a

kináz domén így nem működőképes. Számos aminosav vesz részt az ABL TKD-en a kis molekulájú inhibitorok kötésében [95], amelyek közül 3 kulcsfontosságú aminosav (Ala380-Phe382) hiányzik a  $\Delta$ exon7 izoformánál. Mivel az inhibitor kötő zseb sérült, a kis molekulák kötődésének nagyon kicsi az esélye. Továbbá, az alternatív splicing nem csak a TKD funkcionális részeit roncsolja, hanem az egész TKD szerkezeti egységére is hatással van. Azt figyeltük meg (8C ábra), hogy a domén közepén lévő töréspont egy erősen hidrofób régiót érint, ami azt jelenti, hogy a csonka TKD miatt ez az erősen hidrofób régió kerülhet a BCR-ABL felszínére. Ilyen magas felszíni hidrofobicitás pedig az abnormális harmadlagos szerkezetű (kórosan feltekeredett) fehérjék jellemzője, ezért úgy gondoljuk, hogy a csonka TKD a  $\Delta$ exon7 izoformán beindítja az unfolded protein response (UPR) mechanizmust és a fehérje lebomlik a proteozóma útvonalon. Ez azt jelenti, hogy ha az  $\Delta$ exon7 izoformát kódoló mRNS mégsem bomlana le az NMD következtében, akkor a fehérje minőség ellenőrző mechanizmusok, elsősorban az UPR, távolíthatja el, mint egy abnormális harmadlagos szerkezetű csonkolt fehérjét [96, 97]. Ha ezt a minőségellenőrző rendszert is kikerülné a splice variáns által kódolt csonkolt fehérje, és kikerülne a citoplazmába, a feljebb bemutatott alapvető szerkezeti hiányosságok miatt az nem lenne működőképes.

BCR-ABL negatív MPN-ben a szerzett JAK2 V617F mutáció jelenlétét és szerepét vizsgáltuk. A JAK2 V617F mutáció előfordulási gyakorisága 75,9% (249/328) volt az MPN csoportban: 87,4% (153/175) a PV-s betegek között, 61,1% (77/126) ET-ben és 70,4% (19/27) a PMF betegek esetén, mely értékek megegyeznek az irodalomban közölt adatokkal [5-8, 58, 59]. A V617F pozitív MPN csoportban a nemek egyensúlya a nők irányába tolódott a V617F negatív csoporthoz képest ( $p=0,019$ ). Levine és mtsai. [8] szintén női predominanciát írtak le a V617F pozitív PV betegek körében. Egy svéd vizsgálatban [98], a PV előfordulási gyakorisága nem tért el szignifikánsan a férfiak és nők között ( $2.69/10^5$  férfi vs.  $3.12/10^5$  nő), míg az ET gyakrabban fordult elő nőknél ( $0.96/10^5$  férfi vs.  $2.35/10^5$  nő), bár a különbség csak 70 év felett szignifikáns.

Korábbi vizsgálatok eredményeihez hasonlóan [8, 99, 100] mi is azt találtuk, hogy a JAK2 V617F mutáció hordozó betegek idősebbek voltak ( $p<0,001$ ), és magasabb volt a Hb szintjük ( $p<0,001$ ). A vaszkuláris szövődmények (trombotikus illetve vérzéses)

gyakoribbak voltak a V617F mutáció hordozó betegeknél [ $p=0,039$ , 26,6% (64/241) vs. 15,2% (12/79)]. Cheung és mtsai. [101] szintén magasabb arányban találtak vénás szövődményt a V617F pozitív ET betegeknél. Eredményeink megerősítették a korábbi megfigyeléseket, miszerint a V617F pozitív ET-nek és PV-nek hasonlóak a klinikai jellemzői (emelkedett hemoglobin) [99, 101].

A szerzett genetikai eltéréseken kívül örökletes tényezők is befolyásolhatják az MPN kialakulását. Az örökletes genetikai háttér nem csak a betegség kialakulásának valószínűségét befolyásolhatja, hanem egyes polimorfizmusok a betegség kimenetelének előrejelzésében is fontos szerepet játszhatnak. Eddig főleg a gyógyszer metabolizmusban illetve a DNS repair-ben részt vevő genetikai variánsokat tartották a betegség kimenetelére szempontjából meghatározónak [74, 102, 103], a hematopoietikus szignál-transzdukciós útvonalban résztvevő SNP-eket ritkábban vizsgálták [104, 105].

Tanulmányunkban meghatároztuk a 2009 áprilisában leírt JAK2 46/1 haplotípus frekvenciáját a hazai MPN és AML betegcsoportokban, valamint vizsgáltuk a betegség kimenetelében való szerepét AML esetén. A haplotípus vizsgálatára az rs12343867 SNP-t választottuk, mivel a 46/1 haplotípussal kapcsolatosan öröklődik és a JAK2 V617F mutáció közelében (attól 418 bázispár távolságra) található [47]. A JAK2 lókuszt esetében ismert, hogy MPN-ben az érintett hematopoietikus klónban mitotikus rekombináció játszódhat le az anyai és az apai kromoszómák között, amely az általunk vizsgált régiót érintve a V617F mutáció és a közelben található SNP-k uniparentális diszómiajához (UPD) vezethet. Ez a folyamat genotípus szinten a heterozigotitás elvesztését és ál-homozigóta genotípust eredményez [47]. Mivel nem tumoros szövet (pl. szájnnyálkahártya kaparék, fibroblaszt vagy szeparált nem-myeloid sejt) nem állt rendelkezésünkre az MPN csoportban, egy alternatív megközelítéssel (a JAK2 allélek 617F és 617V specifikus amplifikációjával) mutattuk ki a veleszületett 46/1 haplotípust, azaz az rs12343867 genotípust perifériás vérből vagy csontvelőből, amely klonális és egészséges sejtek ismeretlen arányú keverékét tartalmazza. A 617V specifikus amplifikáció (10. ábra) V617F pozitív esetekben is lehetővé tette a nem klonális sejtek genotipizálását. A 617F specifikus amplifikációval kimutattuk, hogy a V617F mutáció melyik haplotípuson alakult ki. A korábbi irodalmi adatoknak megfelelően [47-49], a 46/1 heterozigóta egyéneknél végzett genotipizálási



eredményeink azt tükrözik, hogy a V617F mutáció a statisztikailag várható 50%-os esély helyett preferenciálisan (az esetek 85%-ában) a 46/1 haplotípust hordozó allélon keletkezik, valamint ritkán (az esetek 2%-ában) egymástól függetlenül egy beteg mindkét allélján is kialakulhat. Módszerünk egyik hiányossága, hogy a JAK2 V617F negatív (14. exon), de a JAK2 12. exon mutáció szempontjából pozitív esetekben szintén kialakulhat 9pUPD. V617F negatív PV betegek esetében a JAK2 12. exon mutációk gyakorisága elérheti a 90%-ot, ha kimutatásuk eritroid kolóniákból történik [106], azonban perifériás vérből vagy csontvelőből csak az esetek 10-30%-ában mutathatóak ki [107, 108]. A 46/1 haplotípust hordozó egyéneknél nemcsak a JAK2 V617F, hanem a JAK2 12. exon pontmutációk vagy deléciók kialakulási valószínűsége is emelkedett [49]. Mindezen megfontolásból, valamint mivel a JAK2 V617F negatív PV esetében nehéz a klonalitás igazolása, a JAK2 V617F negatív PV eseteket kizártuk a vizsgálatból.

A hazai kontroll csoport 46/1 haplotípus gyakorisága, azaz a rs1234867 C allél frekvenciája (AF $\pm$ 95%CI: 27,5 $\pm$ 3,8%), valamint hordozó gyakorisága (48,0 $\pm$ 5,5%) az irodalmi adatoknak megfelelő tartományba esett. Eredményeink megerősítették, hogy a 46/1 haplotípus (rs12343867 polimorfizmus C allél) hordozóknál fokozott a hajlam a JAK2 V617F pozitív MPN, PV, ET, PMF kialakulására (6. táblázat). A 46/1 haplotípus szerepe, mint a V617F negatív MPN-re hajlamosító faktor az irodalomban kezdetben vitatott volt. A három, 46/1 haplotípust egymástól függetlenül leíró tanulmány közül, Olcaydu és mtsai. [49] nem találtak összefüggést a 46/1 haplotípus és a V617F negatív MPN között, Kilpivaara és mtsai. [48] emelkedett 46/1 haplotípus frekvenciát találtak, míg a harmadik tanulmány [47] szerzői pozitív asszociációt írtak le az angol V617F negatív ET/PMF betegek csoportjában, amely megfigyelést nem tudtak megismételni egy független görög MPN és kontroll csoporton. Tefferi és mtsai [51], valamint Pardani és mtsai [50] emelkedett 46/1 haplotípus frekvenciát találtak V617F negatív PMF-ben és ET-ben. Egyezően ez utóbbi közlésekkel, mi is emelkedett C allél hordozó gyakoriságot találtunk V617F negatív MPN eseteinknél (ET és PMF) a kontroll csoportéhoz viszonyítva (p=0,05, OR [95%CI]: 1,79 [1,02-3,13]). Eredményeink szerint a 46/1 haplotípus V617F negatív MPN kialakulására is hajlamosíthat, mint azt a később megjelent tanulmányok is sugallták [109, 110].

Mivel a 46/1 haplotípus JAK2 V617F mutáció kialakulására hajlamosít, ezért megvizsgáltuk az MPN klinikai képeinek jellemzőit különböző 46/1 genotípusú MPN betegcsoportokban. Azonban a 46/1 haplotípus önmagában (a V617F mutációtól függetlenül) nem befolyásolta az életkort, a nemek eloszlását, a diagnóziskor észlelt laboratóriumi paramétereket (Hb, WBC, PLT) vagy a vaszkuláris szövődmények (vénas vagy artériás trombózis, vérzés) gyakoriságát más tanulmányokhoz hasonlóan [50, 51]. A primer és a szekunder myelofibrosis kialakulását szignifikánsan magasabbnak találtuk a 46/1 homozigóta egyének csoportjában (32% CC homozigóta [17/53 CC genotípus]) vs. 12% nem CC homozigóta MPN [32/275 TT és TC-genotípus],  $p < 0,001$ ). A megfigyelés jellemző volt poszt-PV myelofibrosisra is (21% myelofibrosis CC genotípusú vs. 6% TT és TC genotípusú betegeknél,  $p < 0,001$ ). Hasonló tendencia volt megfigyelhető ET-t követő myelofibrosis esetében is (15% vs. 4%,  $p = 0,075$ ), amely valószínűleg az alacsony esetszám miatt nem szignifikáns. Feltételezéseink szerint, a 46/1 haplotípust homozigóta formában hordozó klonális sejtek fogékonyabbak a JAK2 gént tartalmazó régió szomatikus rekombinációjára és az uniparentális diszómia (UPD) kialakulására, mint a 46/1 heterozigóta sejtek, mivel a haplotípus régiójában mintegy 280 kb nagyságú kromoszóma szakaszon tökéletes egyezés áll fenn a két szülői kromoszóma között. Az UPD kialakulásakor a JAK2 V617F mutáció homozigóta formája jön létre, amely szelekciós előnyt biztosíthat az érintett klónnak. Homozigóta V617F jelenlétében nő a mutáns allél aránya és a kórkép gyakrabban progrediál szekunder myelofibrosisba. Érdekes módon, hasonló tendencia volt megfigyelhető a JAK2 V617F negatív ET és PMF betegek csoportjában is [50% (2/4 CC) vs. 12% (7/57 nem-CC)], de ebből a megfigyelésből az alacsony esetszám miatt nem lehetett következtetést levonni.

## 5.2 Akut myeloid leukémia

A leukémiás transzformáció szintén az MPN ismert szövődményei közé tartozik. Bár a különböző 46/1 haplotípusú betegek csoportjában nem találtunk eltérést a leukémiás transzformáció gyakoriságában, mégis megvizsgáltuk a 46/1 haplotípus előfordulási gyakoriságát akut myeloid leukémiában. A betegek beválasztásánál a korábbi MPN az

anamnézisban és/vagy a V617F mutáció jelenléte kizáró kritériumként szerepelt, nehogy az MPN-ből transzformálódott esetek jelenléte miatt tolódjon el a 46/1 haplotípus gyakorisága az AML csoportban. Mivel a haplotípus jelenléte a JAK2 V617F mutáció kialakulására hajlamosít, felmerült, hogy a haplotípus genomiális instabilitást eredményezhet. Mivel az AML egy heterogén genetikai hátterű kórkép, elképzelhető volt, hogy a különböző alcsoportokban az örökletes, illetve szerzett tényezők más hangsúllyal játszanak szerepet. Mind a számbeli és szerkezeti kromoszóma elváltozások, mind a normál karyotípus gyakran észlelhető AML-ben. Érdekes módon, az UPD és az onkogén mutációk (pl. FLT3 mutációk) többszörös, egymástól független kialakulása az AML-re, különösen az NK-AML-re is jellemző. A teljes genomra kiterjedő polimorfizmus vizsgálatokkal az AML-ben szenvedő betegek 20%-ánál mutattak ki szegmentális UPD-t, amelyek a genom preferenciális helyein (WT1, FLT3, CEBPA és RUNX1 gének lókuszáinál) fordulhatnak elő a leggyakrabban [111]. Az FLT3 lókuszt nemcsak az UPD-re jellemző példa, hanem a mutációk többszörös kialakulására is. AML-ben diagnóziskor az FLT3 többféle méretű internal tandem duplikációja (ITD) 10%-os gyakoriságú [54], míg az FLT3 ITD és az FLT3 tirozin kináz domén (TKD, D835 kodon) mutációk együttes előfordulása 3%-os gyakoriságú [112]. Ez utóbbi esetekben igazolható, hogy a mutációk egymástól függetlenül két különböző allélon alakultak ki [113]. Biallélikus, kettős heterozigóta mutációkat leírtak a CEBPA és a RUNX1 gének esetében is [114, 115]. A 46/1 haplotípus és a különböző mutációs mechanizmusok kapcsolatának vizsgálatára összevetettük néhány AML alcsoport (karyotípus, FLT3 és NPM1 mutáció-státusz szerint csoportosítva) 46/1 haplotípus hordozó gyakoriságát. Emelkedett 46/1 haplotípus, azaz rs1234867 C allél hordozó gyakoriságot találtunk NK-AML-ben, ha a nemben és korban nem eltérő kóros karyotípusú csoporthoz viszonyítottuk. Multifaktoriális kórképek esetén (mint pl. a leukemogenezis is) az egyén genetikai háttere nagyobb szerepet játszik fiatal életkorban, míg a szerzett rizikófaktorok akkumulációja az időskori betegség manifesztációkban tölthet be fontosabb szerepet. E miatt összevetettük a normál és a kóros karyotípusú betegek 46/1 haplotípus gyakoriságát fiatalabb életkorban kialakult AML esetén. Míg NK-AML-ben a 46/1 hordozó gyakoriság szignifikáns emelkedését észleltük, kóros karyotípusú AML-ben a hordozó gyakoriság nem

változott. Mindezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a 46/1 haplotípus a NK-AML kialakulásában is szerepet játszhat, mint örökletes hajlamosító tényező.

A pontos patomechanizmus, ahogy a 46/1 haplotípus a JAK2 V617F mutáció, így az MPN kialakulására hajlamosít, nem ismert. Két feltételezett patomechanizmust javasoltak [116]: (i) a "hipermutátor hipotézis" szerint a 46/1 haplotípus a régió genetikai instabilitását eredményezi, míg (ii) a "termékeny táptalaj hipotézis" szerint a mutáció mindkét haplotípus esetén egyenlő eséllyel alakul ki, viszont a 46/1 haplotípusú mutáns klón szelektív előnnyel rendelkezik a vad típusú alléllal szemben. A JAK2 V617F negatív, de JAK2 exon 12 mutáció pozitív betegeknél észlelt allél frekvencia emelkedés a "hipermutátor hipotézist" támasztja alá. Amennyiben nemcsak a JAK2 V617F mutáció pozitív MPN esetében (hanem a V617F negatív MPN és NK-AML-ben is) igazolható a 46/1 haplotípus betegség hajlamosító hatása, az a "termékeny táptalaj hipotézis" felé billentheti a mérleg nyelvét. Ez utóbbi hipotézis kismértékű, jelenleg még nem bizonyított funkcionális eltérést feltételez a vad típusú és a 46/1 pozitív haplotípus által kódolt JAK2 fehérje működése között. Két, nemrégiben megjelent cikk szerzői vizsgálták a 46/1 haplotípus és a JAK2 géntől független mutációs mechanizmussal kialakuló MPN (MPL mutáció pozitív MPN) kapcsolatát. Patnaik et al. [117] nem találtak 46/1 allél frekvencia emelkedést a V617F-negatív, MPL mutáció pozitív ET betegek csoportjában (n=22). Jones és al. [47] szintén nem mutattak ki 46/1 allél frekvencia emelkedést egy hasonló létszámú betegcsoportban (n=32, p=0,06). Azonban több munkacsoport összesített MPL pozitív beteg és kontroll csoportok meta-analízisével már szignifikáns allél frekvencia emelkedést észleltek. Eredményeink szerint az MPN és az NK-AML közös patogenetikai útvonallal rendelkezhetnek, amelyben a 46/1 haplotípus által okozott feltételezett funkcionális eltérés fontos szerepet tölthet be a JAK2 jelátviteli rendszerben.

A JAK2 46/1 haplotípus prognosztikai szerepe szerint is vizsgált 176 AML betegnél összefüggést mutattunk ki a 46/1 haplotípus jelenléte és az AML betegség jellemzői, illetve a kezelés kimenetele között. Azt találtuk, hogy a 46/1 haplotípus az akut myelomonocitás leukémia hajlamosító tényezője lehet. NK-AML-ben jelentősen alacsonyabb remissziós rátát és remisszióban illetve apláziában több fertőzés miatti halálozást figyeltünk meg a 46/1 haplotípust hordozók között a nem hordozókhoz képest, ami csökkent túlélést (DFS és

OS) eredményezett. Egy másik JAK2 SNP (rs2230724, NT\_008413.18: g.5071780G>A, p.830I>I) és a betegség kimenetele között már mutattak ki összefüggést egy korábbi tanulmányban, kínai AML-ben szenvedő betegekénél [118, 119]. A HapMap Project kínai populációra vonatkozó haplotípus információi szerint az rs12343867 (T>C csere) és az rs2230724 (G>A csere) SNP-k részben kapcsoltak (az rs12343867/rs2230724 becsült haplotípus gyakorisága: T/G: 57%, C/A: 23%, T/A: 18%, C/G: 2%, D': 0.892; p<0.000) [120], vagyis az rs2230724 G allélja főként az rs12343867 T alléljához kapcsol, de az A allél az általunk vizsgált rs12343867 SNP T és C allélján egyaránt előfordulhat (11 táblázat).

**11. táblázat** Az rs12343867 (T>C csere) és az rs2230724 (G>A csere) SNP-k becsült haplotípus gyakorisága kínai populációban.

		rs2230724	
		G	A
rs12343867	T	57%	18%
	C	2%	23%

Kínai AML betegekben az rs2230724 AA genotípusúakra szignifikánsan magasabb CR arány volt jellemző, a GG genotípusúakra pedig gyakori korai halálozás. A mi ettől eltérő eredményeinket (CC és TC genotípus függ össze a fertőzés okozta halállal, pedig a T kapcsol G-vel a két SNP-ben) a betegek eltérő etnikai hátterével és a terápiás protokollok különbözőségével magyarázhatjuk, illetve azzal, hogy a vizsgált polimorfizmusok nem kapcsolnak teljes mértékben.

A "termékeny táptalaj hipotézis" szerint a 46/1 haplotípus hordozók és nem hordozók között finom különbségek lehetnek a JAK2 funkciójában, ami növelheti a klonális myeloproliferációra való hajlamot. A 46/1 haplotípus hordozók között csökkent granulocita-makrofág kolónia képződést írtak le egészséges egyéneknél [47]. Saját anyagunkban a fertőzések okozta halál esetén a hordozók és nem hordozók közötti különbséget (46.8% hordozókban vs. 23.5% nem hordozókban, p=0.038) a JAK2 46/1

haplotípusra esetlegesen jellemző funkcionális eltéréssel magyarázhatjuk. A JAK2 központi szerepet játszik különböző myeloid és limfoid citokin receptorok jelátvitelében (pl. granulocytá makrofág kolónia stimuláló faktor, GM-CSF), így a megváltozott JAK2 funkció kemoterápiát követően késleltetheti a csontvelő rekonstrukcióját és okozhat csökkent immunválaszt, ami elhúzódó, súlyosabb lefolyású infekciókhoz vezethet.

Érdekes, hogy genom szintű asszociációs vizsgálatok összefüggést találtak a JAK2 46/1 haplotípus és a gyulladásoos bélbetegség (IBD) között. A szerzők azt feltételezték, hogy a JAK2 funkciójának károsodása hatással lehet az interleukin 23 (IL23) jelátvitelre és a gyulladásoos T sejtek (Th17) differenciációjára IBD-ben [121-124]. Másrészt, több irodalmi adat is azt sugallja, hogy a GM-CSF jelátvitel is érintett lehet az IBD patomechanizmusában: csökkent GM-CSF szekréciót [125], a GM-CSF elleni neutralizáló autoantitestek jelenlétét [126] és károsodott GM-CSF receptor expressziót és funkciót [127] írtak le az IBD-ben észlelt eltérések sorában. A GM-CSF jelátvitel károsodása, mely neutrofil és makrofág funkcionális abnormalitásához vezet, elősegítheti a baktériumok bejutását az epithel sejteken keresztül és gyulladáshoz vezethet.

## 6. Következtetések

- a) Vizsgálatunk az első szisztematikus analízis a két fő tirozin kináz inhibitor rezisztencia mechanizmus, a BCR-ABL TKD mutációk és ACA tekintetében. Elsőként vizsgáltuk a két rezisztencia mechanizmus kombinált szerepét első- és második generációs TKI-val történő kezelés során. Imatinib kezelés során csak az ACA, míg dasatinib és nilotinib kezelés során a mutáció és az ACA is rossz prognosztikai faktornak bizonyult. A BCR-ABL mutáció vizsgálat a TKI rezisztens betegeknél javasolt a TKI váltást megelőzően, mert a különböző mutációk jelenléte befolyásolhatja a TKI választást és prognosztikai szerepük is lehet. A T315I mutációt hordozó betegek esetén alternatív kezelés alkalmazása lehet szükséges.
- b) A BCR-ABL 7. exon deléció esetében az irodalomban egymásnak ellentmondó adatokat találunk azzal kapcsolatban, hogy a deléció jelenléte összefügg-e az imatinib rezisztenciával. Átfogó vizsgálattal elsőként bizonyítottunk, hogy mivel a deléció imatinib naív CML betegekből és egészséges kontroll egyénekből a BCR-ABL-en és az ABL génekben is detektálható, független a BCR-ABL transzlokációtól és nem függ össze a rezisztenciával. A 7. exon deléció kimutathatósági határa a BCR-ABL és az ABL expressziós szintjétől és a kimutatási módszer érzékenységétől függ. Eredményeinket bioinformatikai módszerekkel is megerősítettük. A variáns mRNS lebomlása az NMD során alacsony transzlációs hatékonysághoz vezet, ami a csonka fehérje szignifikáns szerkezeti változásaival együtt ellene szól annak a lehetőségnek, hogy a deléció kapcsolatban lenne az imatinib rezisztenciával.
- c) A JAK2 V617F mutáció gyakorisága 75,9% (249/328) volt a BCR-ABL negatív MPN betegcsoportban. Kimutattuk, hogy a V617F pozitív betegeknél a hemoglobin szint emelkedett volt a V617F negatív betegekhez képest ( $p < 0,001$ ). A V617F pozitív betegeknél a nemek aránya a nők felé tolódott (57,4% vs. 41,8%,  $p = 0,019$ ), valamint gyakoribb volt a vérzéses szövődmény (26,6% vs. 15,2%,  $p = 0,039$ ).

- d) Jelen vizsgálatunk megerősíti, hogy a JAK2 46/1 haplotípus hajlamosíthat JAK2 V617F-pozitív és negatív MPN kialakulására is. A 46/1 haplotípus nem befolyásolja ugyanakkor az MPN klinikai képét, (betegség típusa, splenomegalia jelenléte, fokozott erythropoiesis vagy myelopoiesis laboratóriumi jelei), sem a vaszkuláris szövődmények gyakoriságát, azonban a 46/1 homozigóta esetekben növelheti az esélyét a myelofibrosis kialakulásának.
- e) Tanulmányunkban elsőként vetettük fel annak a lehetőségét, hogy a JAK2 46/1 haplotípus normál karyotipusú AML szempontjából is örökletes hajlamosító tényező. A JAK2 46/1 haplotípus befolyásolja az AML morfológiai megoszlását, az arányt a myelomonocytá formá felé eltolva. Eredményeink arra utalnak, hogy a JAK2 46/1 haplotípus egy független kedvezőtlen prognosztikai faktor lehet AML-ben, amely NK-AML-ben a kezelés során fellépő fertőzések súlyosságát befolyásolhatja. Ez az eredmény hasznos lehet a kockázat-alapú kezelési stratégiák kialakításában intermedier prognózisú AML-ben.



## 7. Összefoglalás

A myeloid hematopoietikus őssejtbetegségek genetikai háttere heterogén, szerzett és örökletes eltérések is szerepet játszhatnak kialakulásukban. Munkánk célja egyrészt a myeloproliferatív neopláziák (MPN) csoportjába tartozó krónikus myeloid leukémia (CML), polycythemia vera (PV), primer myelofibrosis (PMF) és essentialis thrombocythemia (ET), másrészt pedig az akut myeloid leukémia (AML) egyes genetikai tényezőinek vizsgálata volt. A CML genetikai hátterében a BCR-ABL fúziós gén által kódolt kiméra fehérje fokozott tirozin kináz aktivitása áll. A fúziós fehérje célzott első- és második generációs tirozin kináz inhibitorokkal (TKI) (imatinib, illetve nilotinib és dasatinib) gátolható, azonban ezekkel szemben a betegek egy részénél rezisztencia alakulhat ki. A PV, PMF és ET hátterében a JAK2 gén aktiváló mutációját (V617F) azonosították de a szerzett mutációk mellett az örökletes JAK2 46/1 haplotípus is befolyásolhatja az egyes betegségek kialakulására való hajlamot és a fenotípust.

CML-ben a két fő rezisztencia mechanizmus, a BCR-ABL tirozin kináz domén (TKD) mutációk és társuló kromozómaeltérések (ACA) vizsgálata során imatinib kezelés alatt csak az ACA, míg dasatinib és nilotinib kezelés során a mutáció és az ACA jelenlétét is rossz prognosztikai faktornak találtuk. A BCR-ABL 7. exon deléció, amit szintén összefüggésbe hoztak a TKI rezisztenciával, imatinib naív CML betegekben és egészséges kontroll egyénekben a BCR-ABL-en és az ABL-en is detektálható volt, tehát független a BCR-ABL transzlokációtól és nem függ össze a rezisztenciával. Eredményünket a fúziós fehérje bioinformatikai vizsgálatával is megerősítettük. BCR-ABL negatív MPN-ben a JAK2 V617F pozitív betegeknél a nemek aránya a nők felé tolódott, valamint gyakoribb volt a vérsékes szövődmény. Az örökletes JAK2 46/1 haplotípus JAK2 V617F pozitív és negatív MPN kialakulására is hajlamosított. AML-ben a JAK2 46/1 haplotípus fiatal életkorban normál kariotípusú akut myeloid leukémia (NK-AML) kialakulására hajlamosított és a morfológiai megoszlást a myelomonocyta forma felé toltta el. Befolyásolta továbbá kezelés során fellépő fertőzések súlyosságát is, ezáltal NK-AML-ben független kedvezőtlen prognosztikai faktornak bizonyult. A szerzett és örökletes genetikai faktorok szerepének vizsgálata hozzásegíthet a myeloid őssejtbetegségek prognózisának becsléséhez és így a személyre szabott célzott kezeléséhez.

## 8. Summary

Hereditary and acquired genetic alteration may also play a role in the development of myeloid hematopoietic stem cell diseases. The aim of this study was the investigation of certain genetic alterations in chronic myeloid leukemia (CML), polycythemia vera (PV), primer myelofibrosis (PMF) and essential thrombocythemia (ET) belonging to the group of myeloproliferative neoplasms (MPN), and in acute myeloid leukemia. In the genetic background of CML, increased tyrosine kinase activity of the chimera protein encoded by BCR-ABL fusion gene has been identified. The fusion protein may be inhibited by targeted, first and second generation tyrosine kinase inhibitors (TKI) (imatinib, nilotinib and dasatinib), but resistance occurs in a considerable proportion of patients. In the background of BCR-ABL negative MPN, a common causative genetic alteration, an acquired Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation has been identified, but beside the acquired mutation, also the inherited JAK2 46/1 haplotype may influence susceptibility of MPN. In CML, the two major resistance mechanisms, BCR-ABL tyrosine kinase domain (TKD) mutations and additional chromosome abnormalities (ACA) were investigated. The presence of ACA predicted shorter survival during first and second generation TKI therapy, while TKD mutations only influenced survival during second generation TKI therapy. The BCR-ABL exon 7 deletion, which was also proposed as a mechanism for imatinib resistance, proved to be independent from BCR-ABL translocation and was not associated with imatinib resistance, since it was abundantly detected in imatinib naive CML patients on BCR-ABL and on normal ABL. In BCR-ABL negative MPN, we found a female predominance among V617F positive MPN compared with V617F negative patients and vascular complications were more common in V617F carrier patients. JAK2 46/1 haplotype was a susceptibility factor for JAK2 V617F positive and negative MPN. In AML, JAK2 46/1 haplotype influenced morphological distribution increasing a predisposition to the acute myelomonocytoid form. The JAK2 46/1 haplotype may be an independent adverse prognostic factor affecting the severity of infections occurring during treatment in normal karyotype (NK) AML.

Investigation of acquired and inherited genetic factors may help the estimation of prognosis and thus the development of personalized targeted therapy.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Gilliland, D.G., C.T. Jordan, and C.A. Felix, The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 80-97.
2. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. N Engl J Med, 2005. 353(2): p. 172-87.
3. Vardiman, J.W., J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, N.L. Harris, M.M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi, and C.D. Bloomfield, The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood, 2009. 114(5): p. 937-51.
4. Cools, J., D.J. DeAngelo, J. Gotlib, E.H. Stover, R.D. Legare, J. Cortes, J. Kutok, J. Clark, I. Galinsky, J.D. Griffin, N.C. Cross, A. Tefferi, J. Malone, R. Alam, S.L. Schrier, J. Schmid, M. Rose, P. Vandenberghe, G. Verhoef, M. Boogaerts, I. Wlodarska, H. Kantarjian, P. Marynen, S.E. Coutre, R. Stone, and D.G. Gilliland, A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. N Engl J Med, 2003. 348(13): p. 1201-14.
5. Baxter, E.J., L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G.S. Vassiliou, A.J. Bench, E.M. Boyd, N. Curtin, M.A. Scott, W.N. Erber, and A.R. Green, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet, 2005. 365(9464): p. 1054-61.
6. James, C., V. Ugo, J.P. Le Couedic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garcon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J.L. Villeval, S.N. Constantinescu, N. Casadevall, and W. Vainchenker, A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature, 2005. 434(7037): p. 1144-8.
7. Kralovics, R., F. Passamonti, A.S. Buser, S.S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola, and R.C. Skoda, A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med, 2005. 352(17): p. 1779-90.

8. Levine, R.L., M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J. Huntly, T.J. Boggon, I. Wlodarska, J.J. Clark, S. Moore, J. Adelsperger, S. Koo, J.C. Lee, S. Gabriel, T. Mercher, A. D'Andrea, S. Frohling, K. Dohner, P. Marynen, P. Vandenberghe, R.A. Mesa, A. Tefferi, J.D. Griffin, M.J. Eck, W.R. Sellers, M. Meyerson, T.R. Golub, S.J. Lee, and D.G. Gilliland, Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005. 7(4): p. 387-97.
9. A.V. Hoffbrand, P.A.H.M., J.E. Pettit, ed. *Essential Haematology*. 2006, Blackwell Publishing Ltd.
10. Matolcsy András, U.M., Kopper László, ed. *Hematológiai betegségek atlasza*. 2006, Medicina.
11. Druker, B.J., F. Guilhot, S.G. O'Brien, I. Gathmann, H. Kantarjian, N. Gattermann, M.W. Deininger, R.T. Silver, J.M. Goldman, R.M. Stone, F. Cervantes, A. Hochhaus, B.L. Powell, J.L. Gabilove, P. Rousselot, J. Reiffers, J.J. Cornelissen, T. Hughes, H. Agis, T. Fischer, G. Verhoef, J. Shepherd, G. Saglio, A. Gratwohl, J.L. Nielsen, J.P. Radich, B. Simonsson, K. Taylor, M. Baccarani, C. So, L. Letvak, and R.A. Larson, Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2006. 355(23): p. 2408-17.
12. Faderl, S., M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'Brien, R. Kurzrock, and H.M. Kantarjian, The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999. 341(3): p. 164-72.
13. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000. 96(10): p. 3343-56.
14. Deininger, M.W., S.G. O'Brien, J.M. Ford, and B.J. Druker, Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol*, 2003. 21(8): p. 1637-47.
15. Gambacorti-Passerini, C.B., R.H. Gunby, R. Piazza, A. Galiotta, R. Rostagno, and L. Scapozza, Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*, 2003. 4(2): p. 75-85.

16. Milojkovic, D. and J. Apperley, Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(24): p. 7519-7527.
17. Sherbenou, D.W., O. Hantschel, I. Kaupe, S. Willis, T. Bumm, L.P. Turaga, T. Lange, K.H. Dao, R.D. Press, B.J. Druker, G. Superti-Furga, and M.W. Deininger, BCR-ABL SH3-SH2 domain mutations in chronic myeloid leukemia patients on imatinib. *Blood*, 2010. 116(17): p. 3278-85.
18. Soverini, S., A. Hochhaus, F.E. Nicolini, F. Gruber, T. Lange, G. Saglio, F. Pane, M.C. Muller, T. Ernst, G. Rosti, K. Porkka, M. Baccarani, N.C. Cross, and G. Martinelli, BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, 2011. 118(5): p. 1208-15.
19. Cang, S. and D. Liu, P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 2008. 1: p. 15.
20. Ernst, T., P. Erben, M.C. Muller, P. Paschka, T. Schenk, J. Hoffmann, S. Kreil, P. La Rosee, R. Hehlmann, and A. Hochhaus, Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica*, 2008. 93(2): p. 186-92.
21. Jones, D., D. Thomas, C.C. Yin, S. O'Brien, J.E. Cortes, E. Jabbour, M. Breeden, F.J. Giles, W. Zhao, and H.M. Kantarjian, Kinase domain point mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia emerge after therapy with BCR-ABL kinase inhibitors. *Cancer*, 2008. 113(5): p. 985-94.
22. Kim, S.H., D. Kim, D.W. Kim, H.G. Goh, S.E. Jang, J. Lee, W.S. Kim, I.Y. Kweon, and S.H. Park, Analysis of Bcr-Abl kinase domain mutations in Korean chronic myeloid leukaemia patients: poor clinical outcome of P-loop and T315I mutation is disease phase dependent. *Hematol Oncol*, 2009. 27(4): p. 190-7.
23. O'Dwyer, M.E., M.J. Mauro, G. Kurilik, M. Mori, S. Balleisen, S. Olson, E. Magenis, R. Capdeville, and B.J. Druker, The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*, 2002. 100(5): p. 1628-33.

24. Soverini, S., S. Colarossi, A. Gnani, G. Rosti, F. Castagnetti, A. Poerio, I. Iacobucci, M. Amabile, E. Abruzzese, E. Orlandi, F. Radaelli, F. Ciccone, M. Tiribelli, R. di Lorenzo, C. Caracciolo, B. Izzo, F. Pane, G. Saglio, M. Baccarani, and G. Martinelli, Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(24): p. 7374-9.
25. Verma, D., H. Kantarjian, J. Shan, S. O'Brien, Z. Estrov, G. Garcia-Manero, C. Koller, G. Borthakur, and J. Cortes, Survival outcomes for clonal evolution in chronic myeloid leukemia patients on second generation tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*, 2010. 116(11): p. 2673-81.
26. Bixby, D. and M. Talpaz, Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: p. 461-76.
27. Hochhaus, A., H.M. Kantarjian, M. Baccarani, J.H. Lipton, J.F. Apperley, B.J. Druker, T. Facon, S.L. Goldberg, F. Cervantes, D. Niederwieser, R.T. Silver, R.M. Stone, T.P. Hughes, M.C. Muller, R. Ezzeddine, A.M. Countouriotis, and N.P. Shah, Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*, 2007. 109(6): p. 2303-9.
28. Kantarjian, H.M., F. Giles, N. Gattermann, K. Bhalla, G. Alimena, F. Palandri, G.J. Ossenkoppele, F.E. Nicolini, S.G. O'Brien, M. Litzow, R. Bhatia, F. Cervantes, A. Haque, Y. Shou, D.J. Resta, A. Weitzman, A. Hochhaus, and P. le Coutre, Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*, 2007. 110(10): p. 3540-6.
29. Curvo, R.P., I.R. Zalcberg, V. Scholl, V. Pires, A. Moellmann-Coelho, and M.A. Moreira, A recurrent splicing variant without c-ABL Exon 7 in Imatinib-resistant patients. *Leuk Res*, 2008. 32(3): p. 508-10.

30. Gruber, F.X., H. Hjorth-Hansen, I. Mikkola, L. Stenke, and T. Johansen, A novel Bcr-Abl splice isoform is associated with the L248V mutation in CML patients with acquired resistance to imatinib. *Leukemia*, 2006. 20(11): p. 2057-60.
31. Lee, T.S., W. Ma, X. Zhang, F. Giles, J. Cortes, H. Kantarjian, and M. Albitar, BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(12): p. 3834-41.
32. Ma, W., F. Giles, X. Zhang, X. Wang, Z. Zhang, T.S. Lee, C.H. Yeh, and M. Albitar, Three novel alternative splicing mutations in BCR-ABL1 detected in CML patients with resistance to kinase inhibitors. *Int J Lab Hematol*, 2011. 33(3): p. 326-31.
33. Ma, W., H. Kantarjian, C.H. Yeh, Z.J. Zhang, J. Cortes, and M. Albitar, BCR-ABL truncation due to premature translation termination as a mechanism of resistance to kinase inhibitors. *Acta Haematol*, 2009. 121(1): p. 27-31.
34. Pan, Q., O. Shai, L.J. Lee, B.J. Frey, and B.J. Blencowe, Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 2008. 40(12): p. 1413-5.
35. Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth, and C.B. Burge, Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008. 456(7221): p. 470-6.
36. Laudadio, J., M.W. Deininger, M.J. Mauro, B.J. Druker, and R.D. Press, An intron-derived insertion/truncation mutation in the BCR-ABL kinase domain in chronic myeloid leukemia patients undergoing kinase inhibitor therapy. *J Mol Diagn*, 2008. 10(2): p. 177-80.
37. Sherbenou, D.W., O. Hantschel, L. Turaga, I. Kaupe, S. Willis, T. Bumm, R.D. Press, G. Superti-Furga, B.J. Druker, and M.W. Deininger, Characterization of BCR-ABL deletion mutants from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2008. 22(6): p. 1184-90.
38. Gaillard, J.B., C. Arnould, S. Bravo, D. Donadio, C. Exbrayat, E. Jourdan, D. Reboul, J. Chiesa, and T. Lavabre-Bertrand, Exon 7 deletion in the bcr-abl gene is

- frequent in chronic myeloid leukemia patients and is not correlated with resistance against imatinib. *Mol Cancer Ther*, 2011. 9(11): p. 3083-9.
39. Dameshek, W., Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 1951. 6(4): p. 372-5.
  40. Passamonti, F., M. Maffioli, D. Caramazza, and M. Cazzola, Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*, 2011. 2(6): p. 485-90.
  41. Ingram, W., N.C. Lea, J. Cervera, U. Germing, P. Fenaux, B. Cassinat, J.J. Kiladjian, J. Varkonyi, P. Antunovic, N.B. Westwood, M.J. Arno, A. Mohamedali, J. Gaken, T. Kontou, B.H. Czepulkowski, N.A. Twine, J. Tamaska, J. Csomer, S. Benedek, N. Gattermann, E. Zipperer, A. Giagounidis, Z. Garcia-Casado, G. Sanz, and G.J. Mufti, The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*, 2006. 20(7): p. 1319-21.
  42. Steensma, D.P., R.F. McClure, J.E. Karp, A. Tefferi, T.L. Lasho, H.L. Powell, G.W. DeWald, and S.H. Kaufmann, JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia*, 2006. 20(6): p. 971-8.
  43. Goldman, J.M., A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005. 352(17): p. 1744-6.
  44. Passamonti, F., E. Rumi, D. Pietra, M.G. Della Porta, E. Boveri, C. Pascutto, L. Vanelli, L. Arcaini, S. Burcheri, L. Malcovati, M. Lazzarino, and M. Cazzola, Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3676-82.
  45. Scott, L.M., M.A. Scott, P.J. Campbell, and A.R. Green, Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*, 2006. 108(7): p. 2435-7.
  46. Landgren, O., L.R. Goldin, S.Y. Kristinsson, E.A. Helgadottir, J. Samuelsson, and M. Bjorkholm, Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia,



- and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2199-204.
47. Jones, A.V., A. Chase, R.T. Silver, D. Oscier, K. Zoi, Y.L. Wang, H. Cario, H.L. Pahl, A. Collins, A. Reiter, F. Grand, and N.C. Cross, JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 446-9.
  48. Kilpivaara, O., S. Mukherjee, A.M. Schram, M. Wadleigh, A. Mullally, B.L. Ebert, A. Bass, S. Marubayashi, A. Heguy, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, K. Offit, R.M. Stone, D.G. Gilliland, R.J. Klein, and R.L. Levine, A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 455-9.
  49. Olcaydu, D., A. Harutyunyan, R. Jager, T. Berg, B. Gisslinger, I. Pabinger, H. Gisslinger, and R. Kralovics, A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 450-4.
  50. Pardanani, A., T.L. Lasho, C.M. Finke, N. Gangat, A.P. Wolanskyj, C.A. Hanson, and A. Tefferi, The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia*, 2010. 24(1): p. 110-4.
  51. Tefferi, A., T.L. Lasho, M.M. Patnaik, C.M. Finke, K. Hussein, W.J. Hogan, M.A. Elliott, M.R. Litzow, C.A. Hanson, and A. Pardanani, JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*, 2010. 24(1): p. 105-9.
  52. Dohner, H., E.H. Estey, S. Amadori, F.R. Appelbaum, T. Buchner, A.K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R.A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G.J. Ossenkoppele, M.A. Sanz, J. Sierra, M.S. Tallman, B. Lowenberg, and C.D. Bloomfield, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010. 115(3): p. 453-74.

53. Stone, R.M., Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2009. 22(4): p. 523-8.
54. Schnittger, S., C. Schoch, W. Kern, W. Hiddemann, and T. Haferlach, FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol*, 2004. 112(1-2): p. 68-78.
55. Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettirossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P.G. Pelicci, and M.F. Martelli, Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 2005. 352(3): p. 254-66.
56. Thiede, C., S. Koch, E. Creutzig, C. Steudel, T. Illmer, M. Schaich, and G. Ehninger, Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2006. 107(10): p. 4011-20.
57. Frohling, S., D.B. Lipka, S. Kayser, C. Scholl, R.F. Schlenk, H. Dohner, D.G. Gilliland, R.L. Levine, and K. Dohner, Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood*, 2006. 107(3): p. 1242-3.
58. Jelinek, J., Y. Oki, V. Gharibyan, C. Bueso-Ramos, J.T. Prchal, S. Verstovsek, M. Beran, E. Estey, H.M. Kantarjian, and J.P. Issa, JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*, 2005. 106(10): p. 3370-3.
59. Jones, A.V., S. Kreil, K. Zoi, K. Waghorn, C. Curtis, L. Zhang, J. Score, R. Seear, A.J. Chase, F.H. Grand, H. White, C. Zoi, D. Loukopoulos, E. Terpos, E.C. Vervessou, B. Schultheis, M. Emig, T. Ernst, E. Lengfelder, R. Hehlmann, A. Hochhaus, D. Oscier, R.T. Silver, A. Reiter, and N.C. Cross, Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 2005. 106(6): p. 2162-8.
60. Levine, R.L., M. Loriaux, B.J. Huntly, M.L. Loh, M. Beran, E. Stoffregen, R. Berger, J.J. Clark, S.G. Willis, K.T. Nguyen, N.J. Flores, E. Estey, N. Gattermann, S. Armstrong, A.T. Look, J.D. Griffin, O.A. Bernard, M.C. Heinrich, D.G.

- Gilliland, B. Druker, and M.W. Deininger, The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2005. 106(10): p. 3377-9.
61. Baccarani, M., J. Cortes, F. Pane, D. Niederwieser, G. Saglio, J. Apperley, F. Cervantes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, A. Hochhaus, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, J. Radich, B. Simonsson, R.T. Silver, J. Goldman, and R. Hehlmann, Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*, 2009. 27(35): p. 6041-51.
  62. van Dongen, J.J., E.A. Macintyre, J.A. Gabert, E. Delabesse, V. Rossi, G. Saglio, E. Gottardi, A. Rambaldi, G. Dotti, F. Griesinger, A. Parreira, P. Gameiro, M.G. Diaz, M. Malec, A.W. Langerak, J.F. San Miguel, and A. Biondi, Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1999. 13(12): p. 1901-28.
  63. Ernst, T., J. Hoffmann, P. Erben, B. Hanfstein, A. Leitner, R. Hehlmann, A. Hochhaus, and M.C. Muller, ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 2008. 93(9): p. 1389-93.
  64. Kabsch, W. and C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983. 22(12): p. 2577-637.
  65. Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004. 25(13): p. 1605-12.
  66. Cuff, J.A. and G.J. Barton, Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins*, 2000. 40(3): p. 502-11.

67. Ouali, M. and R.D. King, Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci*, 2000. 9(6): p. 1162-76.
68. Fleming, P.J., N.C. Fitzkee, M. Mezei, R. Srinivasan, and G.D. Rose, A novel method reveals that solvent water favors polyproline II over beta-strand conformation in peptides and unfolded proteins: conditional hydrophobic accessible surface area (CHASA). *Protein Sci*, 2005. 14(1): p. 111-8.
69. Hegyi, H., L. Kalmar, T. Horvath, and P. Tompa, Verification of alternative splicing variants based on domain integrity, truncation length and intrinsic protein disorder. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(4): p. 1208-19.
70. Kottaridis, P.D., R.E. Gale, M.E. Frew, G. Harrison, S.E. Langabeer, A.A. Belton, H. Walker, K. Wheatley, D.T. Bowen, A.K. Burnett, A.H. Goldstone, and D.C. Linch, The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 2001. 98(6): p. 1752-9.
71. Lippert, E., M. Boissinot, R. Kralovics, F. Girodon, I. Dobo, V. Praloran, N. Boiret-Dupre, R.C. Skoda, and S. Hermouet, The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 2006. 108(6): p. 1865-7.
72. Sole, X., E. Guino, J. Valls, R. Iniesta, and V. Moreno, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006. 22(15): p. 1928-9.
73. Schindler, T., W. Bornmann, P. Pellicena, W.T. Miller, B. Clarkson, and J. Kuriyan, Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, 2000. 289(5486): p. 1938-42.
74. Monzo, M., S. Brunet, A. Urbano-Ispizua, A. Navarro, G. Perea, J. Esteve, R. Artells, M. Granell, J. Berlanga, J.M. Ribera, J. Bueno, A. Llorente, R. Guardia, M. Tormo, P. Torres, J.F. Nomdedeu, E. Montserrat, and J. Sierra, Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 2006. 107(12): p. 4871-9.

75. Hughes, T., G. Saglio, S. Branford, S. Soverini, D.W. Kim, M.C. Muller, G. Martinelli, J. Cortes, L. Beppu, E. Gottardi, D. Kim, P. Erben, Y. Shou, A. Haque, N. Gallagher, J. Radich, and A. Hochhaus, Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol*, 2009. 27(25): p. 4204-10.
76. Jabbour, E., D. Jones, H.M. Kantarjian, S. O'Brien, C. Tam, C. Koller, J.A. Burger, G. Borthakur, W.G. Wierda, and J. Cortes, Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*, 2009. 114(10): p. 2037-43.
77. Kim, T.D., S. Turkmen, M. Schwarz, G. Koca, H. Nogai, C. Bommer, B. Dorken, P. Daniel, and P. le Coutre, Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 2010. 95(4): p. 582-8.
78. Lewandowski, K., K. Warzocha, A. Hellmann, A. Skotnicki, W. Prejzner, K. Foryciarz, T. Sacha, M. Gniot, M. Majewski, I. Solarska, G. Nowak, B. Wasag, M. Kobelski, C. Scibiorski, M. Siemiatkowski, M. Lewandowska, and M. Komarnicki, Frequency of BCR-ABL gene mutations in Polish patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib: a final report of the MAPTEST study. *Pol Arch Med Wewn*, 2009. 119(12): p. 789-94.
79. Muller, M.C., J.E. Cortes, D.W. Kim, B.J. Druker, P. Erben, R. Pasquini, S. Branford, T.P. Hughes, J.P. Radich, L. Ploughman, J. Mukhopadhyay, and A. Hochhaus, Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood*, 2009. 114(24): p. 4944-53.
80. Press, R.D., S.G. Willis, J. Laudadio, M.J. Mauro, and M.W. Deininger, Determining the rise in BCR-ABL RNA that optimally predicts a kinase domain mutation in patients with chronic myeloid leukemia on imatinib. *Blood*, 2009. 114(13): p. 2598-605.

81. Soverini, S., A. Gnani, S. Colarossi, F. Castagnetti, E. Abruzzese, S. Paolini, S. Merante, E. Orlandi, S. de Matteis, A. Gozzini, I. Iacobucci, F. Palandri, G. Gugliotta, C. Papayannidis, A. Poerio, M. Amabile, D. Cilloni, G. Rosti, M. Baccarani, and G. Martinelli, Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 2009. 114(10): p. 2168-71.
82. Guilhot, F., J. Apperley, D.W. Kim, E.O. Bullorsky, M. Baccarani, G.J. Roboz, S. Amadori, C.A. de Souza, J.H. Lipton, A. Hochhaus, D. Heim, R.A. Larson, S. Branford, M.C. Muller, P. Agarwal, A. Gollerkeri, and M. Talpaz, Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood*, 2007. 109(10): p. 4143-50.
83. Jabbour, E., H. Kantarjian, D. Jones, M. Talpaz, N. Bekele, S. O'Brien, X. Zhou, R. Luthra, G. Garcia-Manero, F. Giles, M.B. Rios, S. Verstovsek, and J. Cortes, Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*, 2006. 20(10): p. 1767-73.
84. Lahaye, T., B. Riehm, U. Berger, P. Paschka, M.C. Muller, S. Kreil, K. Merx, U. Schwindel, C. Schoch, R. Hehlmann, and A. Hochhaus, Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer*, 2005. 103(8): p. 1659-69.
85. Bradeen, H.A., C.A. Eide, T. O'Hare, K.J. Johnson, S.G. Willis, F.Y. Lee, B.J. Druker, and M.W. Deininger, Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood*, 2006. 108(7): p. 2332-8.
86. Soverini, S., S. Colarossi, A. Gnani, F. Castagnetti, G. Rosti, C. Bosi, S. Paolini, M. Rondoni, P.P. Piccaluga, F. Palandri, P. Giannoulia, G. Marzocchi, S. Luatti, N. Testoni, I. Iacobucci, D. Cilloni, G. Saglio, M. Baccarani, and G. Martinelli,

- Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica*, 2007. 92(3): p. 401-4.
87. Cho, E.H., S.K. Kang, and S.Y. Kim, Supplemental results of the detection of splicing variant with c-ABL exon 7 deletion by direct sequencing Comment on "A recurrent splicing variant without c-ABL Exon 7 in Imatinib-resistant patients" by Curvo et al. [*Leuk. Res.*]. *Leuk Res*, 2009. 33(3): p. 505-6.
  88. Khorashad, J.S., D. Milojkovic, and A.G. Reid, Variant isoforms of BCR-ABL1 in chronic myelogenous leukemia reflect alternative splicing of ABL1 in normal tissue - letter. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(7): p. 2152.
  89. Santamaria, I., A.S. Pitiot, and M. Balbin, ABL alternative splicing is quite frequent in normal population - letter. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(3): p. 772; author reply 772.
  90. Gruber, F.X., T. Lundan, R. Goll, A. Silye, I. Mikkola, O.P. Rekvig, S. Knuutila, K. Remes, T. Gedde-Dahl, K. Porkka, and H. Hjorth-Hansen, BCR-ABL isoforms associated with intrinsic or acquired resistance to imatinib: more heterogeneous than just ABL kinase domain point mutations? *Med Oncol*, 2011.
  91. Maquat, L.E., W.Y. Tarn, and O. Isken, The pioneer round of translation: features and functions. *Cell*, 2010. 142(3): p. 368-74.
  92. Lewis, B.P., R.E. Green, and S.E. Brenner, Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(1): p. 189-92.
  93. Apcher, S., C. Daskalogianni, F. Lejeune, B. Manoury, G. Imhoos, L. Heslop, and R. Fahraeus, Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(28): p. 11572-7.
  94. Floris, M., D. Raimondo, G. Leoni, M. Orsini, P. Marcatili, and A. Tramontano, MAISTAS: a tool for automatic structural evaluation of alternative splicing products. *Bioinformatics*, 2011. 27(12): p. 1625-9.
  95. Cowan-Jacob, S.W., G. Fendrich, A. Floersheimer, P. Furet, J. Liebetanz, G. Rummel, P. Rheinberger, M. Centeleghe, D. Fabbro, and P.W. Manley, Structural

- biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007. 63(Pt 1): p. 80-93.
96. Kincaid, M.M. and A.A. Cooper, ERADicate ER stress or die trying. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(12): p. 2373-87.
  97. Vashist, S. and D.T. Ng, Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol*, 2004. 165(1): p. 41-52.
  98. Ridell, B., J. Carneskog, H. Wedel, L. Vilen, I. Hogh Dufva, U.H. Mellqvist, N. Brywe, H. Wadenvik, and J. Kutti, Incidence of chronic myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden 1983-1992. *Eur J Haematol*, 2000. 65(4): p. 267-71.
  99. Campbell, P.J., L.M. Scott, G. Buck, K. Wheatley, C.L. East, J.T. Marsden, A. Duffy, E.M. Boyd, A.J. Bench, M.A. Scott, G.S. Vassiliou, D.W. Milligan, S.R. Smith, W.N. Erber, D. Bareford, B.S. Wilkins, J.T. Reilly, C.N. Harrison, and A.R. Green, Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 2005. 366(9501): p. 1945-53.
  100. Speletas, M., A. Kioumi, E. Mandala, E. Katodritou, G. Papaioannou, K. Ritis, and I. Korantzis, Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greek patients with myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*, 2003. 110(1): p. 53-4.
  101. Cheung, B., D. Radia, P. Pantelidis, G. Yadegarfar, and C. Harrison, The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*, 2006. 132(2): p. 244-5.
  102. Kuptsova, N., K.J. Kopecky, J. Godwin, J. Anderson, A. Hoque, C.L. Willman, M.L. Slovak, and C.B. Ambrosone, Polymorphisms in DNA repair genes and therapeutic outcomes of AML patients from SWOG clinical trials. *Blood*, 2007. 109(9): p. 3936-44.
  103. Seedhouse, C.H., M. Grundy, P. White, Y. Li, J. Fisher, D. Yakunina, A.V. Moorman, T. Hoy, N. Russell, A. Burnett, and M. Pallis, Sequential influences of leukemia-specific and genetic factors on p-glycoprotein expression in blasts from



- 817 patients entered into the National Cancer Research Network acute myeloid leukemia 14 and 15 trials. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(23): p. 7059-66.
104. Damm, F., M. Heuser, M. Morgan, H. Yun, A. Grosshennig, G. Gohring, B. Schlegelberger, K. Dohner, O. Ottmann, M. Lubbert, W. Heit, L. Kanz, G. Schlimok, A. Raghavachar, W. Fiedler, H. Kirchner, H. Dohner, G. Heil, A. Ganser, and J. Krauter, Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2010. 28(4): p. 578-85.
  105. Wagner, K., F. Damm, G. Gohring, K. Gorlich, M. Heuser, I. Schafer, O. Ottmann, M. Lubbert, W. Heit, L. Kanz, G. Schlimok, A.A. Raghavachar, W. Fiedler, H.H. Kirchner, W. Brugger, M. Zucknick, B. Schlegelberger, G. Heil, A. Ganser, and J. Krauter, Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*, 2010. 28(14): p. 2356-64.
  106. Scott, L.M., W. Tong, R.L. Levine, M.A. Scott, P.A. Beer, M.R. Stratton, P.A. Futreal, W.N. Erber, M.F. McMullin, C.N. Harrison, A.J. Warren, D.G. Gilliland, H.F. Lodish, and A.R. Green, JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 2007. 356(5): p. 459-68.
  107. Schnittger, S., U. Bacher, C. Haferlach, T. Geer, P. Muller, J. Mittermuller, P. Petrides, R. Schlag, R. Sandner, J. Selbach, H.R. Slawik, H.W. Tessen, J. Wehmeyer, W. Kern, and T. Haferlach, Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica*, 2009. 94(3): p. 414-8.
  108. Williams, D.M., A.H. Kim, O. Rogers, J.L. Spivak, and A.R. Moliterno, Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*, 2007. 35(11): p. 1641-6.
  109. Guglielmelli, P., F. Biamonte, A. Spolverini, L. Pieri, A. Isgro, E. Antonioli, A. Pancrazzi, A. Bosi, G. Barosi, and A.M. Vannucchi, Frequency and clinical correlates of JAK2 46/1 (GGCC) haplotype in primary myelofibrosis. *Leukemia*, 2010. 24(8): p. 1533-7.

110. Jones, A.V., P.J. Campbell, P.A. Beer, S. Schnittger, A.M. Vannucchi, K. Zoi, M.J. Percy, M.F. McMullin, L.M. Scott, W. Tapper, R.T. Silver, D. Oscier, C.N. Harrison, H. Grallert, A. Kisialiou, P. Strike, A.J. Chase, A.R. Green, and N.C. Cross, The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2010. 115(22): p. 4517-23.
111. Fitzgibbon, J., L.L. Smith, M. Raghavan, M.L. Smith, S. Debernardi, S. Skoulakis, D. Lillington, T.A. Lister, and B.D. Young, Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res*, 2005. 65(20): p. 9152-4.
112. Kottaridis, P.D., R.E. Gale, and D.C. Linch, Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*, 2003. 122(4): p. 523-38.
113. Auewarakul, C.U., N. Sritana, C. Limwongse, W. Thongnoppakhun, and P.T. Yenchitsomanus, Mutations of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia: determination of incidence and identification of a novel mutation in a Thai population. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. 162(2): p. 127-34.
114. Lin, L.I., C.Y. Chen, D.T. Lin, W. Tsay, J.L. Tang, Y.C. Yeh, H.L. Shen, F.H. Su, M. Yao, S.Y. Huang, and H.F. Tien, Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(4): p. 1372-9.
115. Tang, J.L., H.A. Hou, C.Y. Chen, C.Y. Liu, W.C. Chou, M.H. Tseng, C.F. Huang, F.Y. Lee, M.C. Liu, M. Yao, S.Y. Huang, B.S. Ko, S.C. Hsu, S.J. Wu, W. Tsay, Y.C. Chen, L.I. Lin, and H.F. Tien, AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*, 2009. 114(26): p. 5352-61.
116. Campbell, P.J., Somatic and germline genetics at the JAK2 locus. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 385-6.
117. Patnaik, M.M., T.L. Lasho, C.M. Finke, N. Gangat, D. Caramazza, S. Siragusa, C.A. Hanson, A. Pardanani, and A. Tefferi, MPL mutation effect on JAK2 46/1

- haplotype frequency in JAK2V617F-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 2010. 24(4): p. 859-60.
118. Chen, B.A., Y.J. Zhong, J.F. Feng, Y.F. Li, J.H. Ding, C. Gao, J. Cheng, G.H. Xia, N. Sun, N.N. Chen, X.P. Zhang, P.P. Xu, X.P. Pei, J. Qian, L. Cheng, and Z.H. Lu, Association of Janus Kinase 2(JAK2) A830G Polymorphism with Acute Leukemia Susceptibility. *Blood*, 2009. 114(22): p. 629-629.
119. Zhong, Y., B. Chen, J. Feng, L. Cheng, Y. Li, J. Qian, J. Ding, F. Gao, G. Xia, N. Chen, and Z. Lu, The associations of Janus kinase-2 (JAK2) A830G polymorphism and the treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2010. 51(6): p. 1115-20.
120. Consortium, T.I.H., The International HapMap Project. *Nature*, 2003. 426(6968): p. 789-96.
121. Anderson, C.A., G. Boucher, C.W. Lees, A. Franke, M. D'Amato, K.D. Taylor, J.C. Lee, P. Goyette, M. Imielinski, A. Latiano, C. Lagace, R. Scott, L. Amininejad, S. Bumpstead, L. Baidoo, R.N. Baldassano, M. Barclay, T.M. Bayless, S. Brand, C. Buning, J.F. Colombel, L.A. Denson, M. De Vos, M. Dubinsky, C. Edwards, D. Ellinghaus, R.S. Fehrmann, J.A. Floyd, T. Florin, D. Franchimont, L. Franke, M. Georges, J. Glas, N.L. Glazer, S.L. Guthery, T. Haritunians, N.K. Hayward, J.P. Hugot, G. Jobin, D. Laukens, I. Lawrance, M. Lemann, A. Levine, C. Libioulle, E. Louis, D.P. McGovern, M. Milla, G.W. Montgomery, K.I. Morley, C. Mowat, A. Ng, W. Newman, R.A. Ophoff, L. Papi, O. Palmieri, L. Peyrin-Biroulet, J. Panes, A. Phillips, N.J. Prescott, D.D. Proctor, R. Roberts, R. Russell, P. Rutgeerts, J. Sanderson, M. Sans, P. Schumm, F. Seibold, Y. Sharma, L.A. Simms, M. Seielstad, A.H. Steinhart, S.R. Targan, L.H. van den Berg, M. Vatn, H. Verspaget, T. Walters, C. Wijmenga, D.C. Wilson, H.J. Westra, R.J. Xavier, Z.Z. Zhao, C.Y. Ponsioen, V. Andersen, L. Torkvist, M. Gazouli, N.P. Anagnou, T.H. Karlsen, L. Kupcinkas, J. Sventoraityte, J.C. Mansfield, S. Kugathasan, M.S. Silverberg, J. Halfvarson, J.I. Rotter, C.G. Mathew, A.M. Griffiths, R. Gearry, T. Ahmad, S.R. Brant, M. Chamailard, J. Satsangi, J.H. Cho, S. Schreiber, M.J. Daly, J.C. Barrett, M. Parkes, V. Annese, H. Hakonarson, G. Radford-Smith, R.H. Duerr, S. Vermeire, R.K.

- Weersma and J.D. Rioux, Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*, 2011. 43(3): p. 246-52.
122. Brand, S., Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 2009. 58(8): p. 1152-67.
  123. Ferguson, L.R., D.Y. Han, A.G. Fraser, C. Huebner, W.J. Lam, A.R. Morgan, H. Duan, and N. Karunasinghe, Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat Res*, 2010. 690(1-2): p. 108-15.
  124. Lees, C.W., J.C. Barrett, M. Parkes, and J. Satsangi, New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*, 2011.
  125. Brosbol-Ravnborg, A., C.L. Hvas, J. Agnholt, J.F. Dahlerup, I. Vind, A. Till, P. Rosenstiel, and P. Hollsberg, Toll-like receptor-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion is impaired in Crohn's disease by nucleotide oligomerization domain 2-dependent and -independent pathways. *Clin Exp Immunol*, 2009. 155(3): p. 487-95.
  126. Han, X., K. Uchida, I. Jurickova, D. Koch, T. Willson, C. Samson, E. Bonkowski, A. Trauernicht, M.O. Kim, G. Tomer, M. Dubinsky, S. Plevy, S. Kugathsan, B.C. Trapnell, and L.A. Denson, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies in murine ileitis and progressive ileal Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2009. 136(4): p. 1261-71, e1-3.
  127. Goldstein, J.I., D.J. Kominsky, N. Jacobson, B. Bowers, K. Regalia, G.L. Austin, M. Yousefi, M.T. Falta, A.P. Fontenot, M.E. Gerich, L. Golden-Mason, and S.P. Colgan, Defective Leukocyte GM-CSF Receptor (CD116) Expression and Function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 2011.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

**Meggyesi N**, Kalmár L, Fekete S, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Characterization of ABL exon 7 deletion by molecular genetic and bioinformatic methods reveals no association with imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol.* 2011 Oct 30. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22038725.

**IF: 2,210**

**Meggyesi N**, Kozma A, Halm G, Nahajevszky S, Bártai Á, Fekete S, Barta A, Ujj Gy, Lueff S, Sipos A, Emma Á, Bors A, Reményi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Additional chromosome abnormalities, BCR-ABL tyrosine kinase domain mutations and clinical outcome in Hungarian tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous leukemia patients. *Acta Haematol.* 2011 Oct 14;127(1):34-42. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22005133.

**IF:1,316**

Nahajevszky S\*, Andrikovics H\*, Bártai A, Bors A, Csomor J, Gopcsa L, Koszarska M, Kozma A, Lovas N, Lueff S, Matrai Z, **Meggyesi N**, Sipos A, Varkonyi A, Adam E, Fekete S, Tordai A, Masszi T. The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2011 Nov;96(11):1613-8. Epub 2011 Jul 26. PubMed PMID: 21791467; PubMed Central PMCID: PMC3208678.

\*NS and AH equally contributed

**IF: 6,552**

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. JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2010;24(10):1809-13.

Andrikovics H, Bors A, **Meggyesi N**, Szilvási A, Tordai A. Az akut myeloid leukémia molekuláris genetikai háttere. *Hemat Transzf.* 2007 S1:117-21.

Andrikovics H, Szilvási A, **Meggyesi N**, Király V, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Mikala G, Sipos A, Lovas N, Csukly Z, Mátrai Z, Tamáska J, Tordai A, Masszi T. A 2-es típusú Janus tirozin kináz V617F aktiváló pontmutáció szerepe és kimutatásának jelentősége myeloproliferatív szindrómában. *Orv Hetil.* 2007 Feb 4;148(5):203-10.

## 10.2 A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények

**Meggyesi N**, Kiss LS, Koszarska M, Bortlik M, Duricova D, Lakatos L, Molnar T, Leniček M, Vitek L, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Tordai A, Andrikovics H, Lukas M, Lakatos PL NKX2-3 and IRGM variants are associated with disease susceptibility to IBD in Eastern European patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16(41):5233-40.

**IF: 2,240**

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.: HFE C282Y Mutation as a Genetic Modifier Influencing Disease Susceptibility for Chronic Myeloproliferative Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):929-34

**IF: 4,310**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet mondok közvetlen témavezetőimnek. Köszönöm Dr. Tordai Attilának, hogy lehetővé tette, hogy az általa vezetett laboratóriumban dolgozhassak, irányítása mellett sokat tanulhattam és kérdéseimmel, problémáimmal bármikor fordulhattam hozzá. Köszönöm Dr. Andrikovics Hajnalkának, hogy megmutatta nekem a kutatás szépségeit és ötleteivel, biztatásával valamint töretlen lelkesedésével folyamatos tanulásra ösztönzött és átsegített a nehezebb időszakokon is. Köszönöm, hogy annyi időt áldozott rám.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá Dr. Sarkadi Baláznak valamint Dr. Váradi Andrásnak és munkacsoportjaiknak a rendszeres szakmai konzultációk során nyújtott építő kritikákért és tanácsokért.

Hálás köszönet munkatársaimnak, Dr. Bors Andrásnak, Szilvási Anikónak, Dr. Kalmár Lajosnak és Magdalena Koszarska-nak hasznos gyakorlati tanácsaikért, a folyamatos konzultációs lehetőségért és végtelen türelmükért. Köszönet illeti asszisztenseinket, Pfundt Antalné Júliát, Horváth Csongorné Magdit, Petró Péternét és Csehné Bánhidi Klárát, akik tapasztalatukkal segítették munkámat és sokat biztattak az évek során.

A betegek klinikai adatainak összegyűjtése Budapesten az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Hematológiai és Óssejttranszplantációs Osztályán, valamint Szolnokon a Hetényi Géza kórházban történt. Ez Dr. Masszi Tamás, Dr. Fekete Sándor, Dr. Nahajevszky Sarolta, Dr. Batai Árpád, Dr. Halm Gabriella, Dr. Lovas Nóra, Dr. Sipos Andrea, Dr. Gopcsa László, Dr. Reményi Péter és Dr. Lueff Sándor, valamint Dr. Ujj György segítségével nélkül nem jöhetett volna létre. A citogenetikai vizsgálatokat az Egyesített Szent István és Szent László Kórház Citogenetikai Laboratóriumban Dr. Ádám Emma és Kozma András végezte, akik az eredmények feldolgozásában is segítségemre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm öröklött és szerzett családtagjaimnak, főként édesanyámnak és férjemnek támogatásukat és türelmüket.