

Komplex molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus myeloproliferatív neoplasiák diagnosztikájában

Krähling Tünde¹ ■ Balassa Katalin dr.¹ ■ Meggyesi Nóra dr.¹
 Bors András dr.¹ ■ Csomor Judit dr.² ■ Bártai Árpád dr.²
 Halm Gabriella dr.² ■ Egyed Miklós dr.³ ■ Fekete Sándor dr.²
 Reményi Péter dr.² ■ Masszi Tamás dr.^{2,4} ■ Tordai Attila dr.¹
 Andrikovics Hajnalka dr.¹

¹Országos Vérellátó Szolgálat, Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium, Budapest

²Egyesített Szent István és Szent László Kórház, Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály, Budapest

³Kaposi Mór Oktató Kórház, Hematológiai Osztály, Kaposvár

⁴Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, III. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Bevezetés: A Philadelphia-kromoszóma negatív, „klasszikus” myeloproliferatív neoplasiák genetikai hátterében a Janus kináz 2, a calreticulin- és a trombopoietinreceptor génmutációit azonosították. **Célkitűzés:** A kóroki mutáció azonosítása 949, myeloproliferatív neoplasiában szenvedő betegnél. **Módszer:** A szerzők minőségi és mennyiségi allélspecifikus polimeráz láncreakció, fragmensanalízis, nagy felbontású olvadási görbe-analízis és Sanger-szekvenálás kombinációit alkalmazták. **Eredmények:** 354 polycythaemia verében szenvedő beteg 98,6%-a (n = 349) hordozta a Janus kináz 2 gén V617F mutációját, 1,4%-uk (n = 5) pedig a 12. exon mutációit. Esszenciális thrombocythaemiában (n = 468) a betegek 61,3%-ánál (n = 287) V617F-, 25,2%-ánál (n = 118) calreticulin- és 2,1%-ánál (n = 10) trombopoietinreceptor-génmutációt találtak, míg a betegek 11,3%-a (n = 53) a fenti mutációk egyikét sem hordozta (triplán negatívak). Hasonló eloszlást tapasztaltak primer myelofibrosisban (n = 127): 58,3% (n = 74) V617F-, 23,6% (n = 30) calreticulin-, 6,3% (n = 8) trombopoietinreceptor mutáció pozitív, 11,8% (n = 15) triplán negatív. **Következtetések:** A calreticulingént érintő, nemrégiben felfedezett mutációk révén a Philadelphia kromoszóma negatív, „klasszikus” myeloproliferatív neoplasiában szenvedő betegek közel 90%-ánál határozható meg a betegséget okozó genetikai eltérés. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(52), 2074–2081.

Kulcsszavak: polycythaemia vera, esszenciális thrombocythaemia, primer myelofibrosis, Janus kináz 2, calreticulin

Complex molecular genetic diagnostic algorithm in the diagnosis of myeloproliferative neoplasms

Introduction: Mutations in Janus kinase 2, calreticulin and thrombopoietin receptor genes have been identified in the genetic background of Philadelphia chromosome negative, “classic” myeloproliferative neoplasms. **Aim:** The aim of the authors was to identify driver mutations in a large myeloproliferative cohort of 949 patients. **Method:** A complex array of molecular techniques (qualitative and quantitative allele-specific polymerase chain reactions, fragment analysis, high resolution melting and Sanger sequencing) was applied. **Results:** All 354 patients with polycythemia vera carried Janus kinase 2 mutations (V617F 98.6%, exon 12: 1.4%). In essential thrombocythemia (n = 468), the frequency of V617F was 61.3% (n = 287), that of calreticulin 25.2% (n = 118), and that of thrombopoietin receptor mutations 2.1% (n = 10), while 11.3% (n = 53) were triple-negative. Similar distribution was observed in primary myelofibrosis (n = 127): 58.3% (n = 74) V617F, 23.6% (n = 30) calreticulin, 6.3% (n = 8) thrombopoietin receptor mutation positive and 11.8% (n = 15) triple-negative. **Conclusions:** The recent discovery of calreticulin gene mutations led to definite molecular diagnostics in around 90% of clonal myeloproliferative cases.

Keywords: polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, Janus kinase 2, calreticulin

Kräbling, T., Balassa, K., Meggyesi, N., Bors, A., Csomor, J., Bártai, Á., Halm, G., Egyed, M., Fekete, S., Reményi, P., Masszi, T., Tordai, A., Andrikovics, H. [Complex molecular genetic diagnostic algorithm in the diagnosis of myeloproliferative neoplasms]. *Orv. Hetil.*, 2014, 155(52), 2074–2081.

(Beérkezett: 2014. október 7.; elfogadva: 2014. október 30.)

Rövidítések

ABL = Abelson tirozinkináz; BCR = breakpoint cluster region gén; bp = bázispár; CALR = calreticulin; CML = krónikus myeloid leukaemia; ET = esszenciális thrombocythaemia; FISH = fluoreszcencia in situ hibridizáció; HRM = (high resolution melting) nagy felbontású olvadásigörbe-analízis; JAK2 = 2. típusú Janus kináz; MF = myelofibrosis; MPL = trombopoetinreceptor gén; MPN = myeloproliferatív neoplasia; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; PMF = primer myelofibrosis; PV = polycythaemia vera; STAT = signal transducer and activator of transcription; V617F = a JAK2 gén 617. valin aminosav fenilalaninra történő cseréje; WHO = World Health Organization

A myeloproliferatív neoplasia (MPN) a haematopoeticus őssejt klonális zavara következtében kialakuló betegségecsoport, amelyre különböző érett myeloid sejtek felszaporodása a jellemző. *Dameshek* 1951-ben ismerte fel e külön kórképek közös eredetét, és elsőként használta a myeloproliferatív zavar kifejezést [1]. A World Health Organization (WHO) 2008. évi besorolása szerint a myeloproliferatív neoplaszián belül több kórkép különíthető el: a krónikus myeloid leukaemia (CML); a *BCR-ABL1* negatív, viszonylag gyakori „klasszikus” MPN-kórképek (polycythaemia vera [PV], esszenciális thrombocythaemia [ET] és primer myelofibrosis [PMF]), valamint az egyéb ritka vagy nem besorolható MPN [2].

CML-ben a *BCR-ABL1* fúzió (a Philadelphia kromoszómaként ismert 9. és 22. kromoszóma transzlokációja) a betegek 100%-ánál kimutatható. Az elmúlt évtizedben több *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN (PV, ET, PMF) kialakulásáért felelős, csontvelői őssejtekben kialakuló, szerzett mutációt azonosítottak. Elsőként a 2. típusú Janus kináz (*JAK2*) gén 14. exonjában a 617. valin aminosav fenilalanin cseréjét eredményező pontmutációt (V617F) írták le 2005-ben [3, 4, 5, 6]. A trombopoetinreceptor gén (*MPL*) 10. exonjának pontmutációt V617F-negatív ET-ben és PMF-ben 2006-ban [7], a *JAK2* gén 12. exon mutációit V617F-negatív PV-ben 2007-ben ismertették. 2013-ban két munkacsoport, egymástól függetlenül, egyszerre azonosította a calreticulin (*CALR*) gén 9. exonját érintő mutációkat *JAK2* és *MPL*-negatív ET-ben és PMF-ben [8, 9].

A *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN genetikai hátterében álló mutációk mindegyike a JAK/STAT (STAT: signal transducer and activator of transcription) útvonalat aktiválja. A *JAK2* egyes citokin (például eritropoetin és trombopoetin) -receptorok jelátvitelében játszik szerepet. A V617F-mutáció jelenlétében a *JAK2* fehérje ön-

szabályozó funkciója sérül, és a fehérje ligand hiányában is állandóan aktivált állapotba kerül. Az aktivált *JAK2* foszforilálja a STAT fehérjéket, amelyek különböző sejtosztódást szabályozó gének kifejeződésére vannak hatásosak [4]. Az *MPL* ligandja a trombopoetin, amelynek kötődése esetén a receptor dimerizálódik, és a jelátvitel szintén a JAK/STAT útvonalon keresztül történik. Az *MPL*-mutációk ligandfüggetlen receptoraktivitást, így fokozott sejtosztódást eredményeznek [7]. A calreticulin egy kalciumkötő, endoplazmás reticulumban található dajkafehérje. Mutációinak jelenlétében a fehérje sejt belüli elhelyezkedése megváltozik. Ezáltal a JAK/STAT útvonal aktiválódik, citokinfüggetlen növekedés figyelhető meg, de nem ismert, hogy a mutáns calreticulin milyen mechanizmuson keresztül fejti ki a hatását [8, 9].

Munkánk célja egy kombinált molekuláris genetikai módszeregyüttes alkalmazása, amelynek segítségével meghatároztuk a polycythaemia verában, esszenciális thrombocythaemiában vagy primer myelofibrosisban szenvedő betegcsoportunkban a betegséget okozó (driver) mutációkat.

Módszer

Tanulmányunkban 1974 és 2013 között diagnosztizált, *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN-ben (PV, ET, PMF) szenvedő betegeknél vizsgáltuk a *JAK2*-t, a *CALR*-t és az *MPL*-mutációk előfordulását. A betegség diagnózisa WHO-kritériumok szerint történt [2]. A 949 főből álló betegcsoportból 354 beteg PV-ben (190 férfi, 164 nő; átlagéletkor diagnóziskor: 61±13 év), 468 beteg ET-ben (156 férfi, 312 nő; életkor 58±17 év) és 127 beteg PMF-ben (58 férfi, 69 nő; életkor 62±15 év) szenvedett [10, 11]. Az ET-ben és a PMF-ben szenvedő betegeknél a *BCR-ABL1* kizárása citogenetikai módszerekkel, azaz karyotipizálással, illetve fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálattal (FISH) vagy molekuláris genetikai vizsgálattal, azaz reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (PCR) történt. A *JAK2* V617F mennyiségi PCR beállításához 30 egészséges csontvelődonor perifériás vérmintájából, míg a betegcsoportban a *JAK2*-t, a *CALR*-t és az *MPL*-mutációk vizsgálatához alvadásgátló perifériás vérből vagy csontvelőből izolált genomialis DNS-t használtunk.

A *JAK2* V617F-mutáció jelenlétét allélspecifikus multiplex PCR-technikával vizsgáltuk diagnózistól függetlenül az összes betegnél. A PCR-t követően a DNS-fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el [3]. A V617F allél mennyiségi meghatáro-

zására valós idejű PCR-t alkalmaztunk TaqMan szondával LightCycler 480 készüléken [12]. A V617F mutáns allél relatív mennyiségét a mutáns és normálmplifikációs görbék amplifikációjának indulására jellemző ciklusszámok (crossing point) összevetéséből nyertük. A mutáns allél arányát a teljes *JAK2* allél arányához viszonyítottuk [$JAK2^{mut}/(JAK2^{mut}+JAK2^{norm})$]. Mennyiségi *JAK2* V617F-vizsgálat a *JAK2* V617F-pozitív (422/710) és negatív (59/239) betegek, valamint a 30 egészséges csontvelődonor perifériás vérmintájából történt. A *JAK2* gén 12. exonját érintő mutációkat a *JAK2* V617F-negatív PV-betegeknél vizsgáltuk fragmensanalízissel, amely a deletiós és az insertiós mutációk mellett a leggyakrabban előforduló K539L pontmutáció kimutatására is alkalmas [13].

A *JAK2* V617F-negatív ET- (n = 181) és PMF- (n = 53) betegeknel a *CALR* gén 9. exon deletiós/insertiós mutációk jelenlétét fragmensanalízissel vizsgáltuk [8]. Az *MPL* gén S505 és W515 kodonjait érintő mutációk jelenlétét a *JAK2* V617F- és a *CALR*-mutációkat nem hordozó ET- és PMF-betegeknél szűrtük nagy felbontású olvadási görbe-analízissel (HRM) [14]. Az olvadási görbe-eltérést mutató mintákat tovább vizsgáltuk a mutációk pontos azonosítása céljából minden egyes mutációra külön allélspecifikus PCR-rel (S505N, W515L, W515K, W515R) [15]. A *JAK2* 12. exon, a *CALR*- és a *MPL*-mutációra pozitív eseteket szekvenálással is meg erősítettük.

A klinikai jellemzőket, az egyes mutációk és a szövőd-mények gyakoriságának összehasonlítását Fischer egzakt teszttel, míg a mennyiségi mutációmeghatározás eredményeit, valamint a hematológiai paramétereket Mann-Whitney-próbával hasonlítottuk össze az egyes MPN-al-csoportokban.

Eredmények

Tanulmányunkban a *BCR-ABLI* negatív, klasszikus MPN-kórképek genetikai hátterében álló mutációk kimutatását szekvenciálisan végeztük, mivel az egyes szomatikus mutációk egy adott betegnél nem fordulnak elő együtt. A vizsgálandó mutációk kiválasztása a klinikai diagnózis alapján történt: PV-ben *JAK2* V617F mutáció hiánya esetén a *JAK2* 12. exon mutációt, ET-ben és PMF-ben *JAK2* V617F-mutáció-negativitás esetén a *CALR*-, majd az *MPL*-mutációkat vizsgáltuk. Az egyes mutációk vizsgálati sorrendjét az irodalomban leírt gyakorisági adatok alapján állítottuk fel. A molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus az 1. ábrán látható.

A minőségi, allélspecifikus multiplex PCR-rel a *JAK2* V617F-mutáció PV-ben az esetek 98,6%-ában (349/354), ET-ben 61,3%-ában (287/468), míg myelofibrosisban (MF) 58,3%-ában (74/127) fordult elő. A *JAK2* V617F mennyiségi meghatározására valós idejű PCR-t alkalmaztunk TaqMan szondával (2. ábra). Az egészséges csontvelődonorok (n = 30) csoportjában a *JAK2* V617F mennyiségi meghatározás a következő

eredményeket adta: medián: 0,003%, tartomány: 0–0,0399%; 95. percentil: 0,0035%. Hasonlóan alacsony értékeket figyeltünk meg a *JAK2*-negatív MPN-betegek (n = 59) csoportjában (medián: 0,002%, tartomány: 0–0,199%; 95. percentil: 0,049%). A minőségi allélspecifikus PCR-rel *JAK2* V617F-pozitív betegek csoportjában a *JAK2* V617F allél mennyisége széles tartományban (0,5–100%) változott. Szignifikáns különbségeket találtunk a különböző diagnózisú betegcsoportokban (medián és tartomány): ET-ben 19% (0,5–96%), PV-ben 44% (1–99%), PMF-ben 48% (3–95%) (ET vs. PV vagy PMF p<0,001). A betegség progressziójakor kialakuló szekunder myelofibrosisban (post-PV MF: 85% [1–99%]; p<0,001; post-ET MF: 66% [1–95%]; p = 0,002) is magasabb *JAK2* V617F allélmennyiséget találtunk, mint a myelofibrosisos szövődmény nélküli PV- és ET-esetekben.

A *JAK2* 12. exon mutáció kimutatására használt PCR-t követően az olvasási kereteltolódással nem járó deletiós vagy inszerciós mutációk (leggyakrabban 6 bp deletio vagy 33 bp duplikáció), valamint a K539L-mutáció esetében az allélspecifikus PCR-t követően a méretváltozásoknak megfelelő második PCR-termék is megfigyelhető az elektroforetogramon. *JAK2* 12. exon mutációt 5 PV-beteg esetében azonosítottunk (1,4%): F537-K539delinsL, K539L, I540-E543delinsMK, R541-E543delinsK, E543-D544del.

A *JAK2* V617F-mutáció-negatív ET- és PMF-betegeknél a *CALR* gén olvasási keret eltolódásával járó deletiós és inszerciós mutációit vizsgáltuk. A leggyakrabban előforduló *CALR*-mutációk 52 bázispár deletiával (1. típusú mutáció: L367fs*46), vagy 5 bázispár inszercióval (2. típusú mutáció, K385fs*47) járnak (3. ábra). A *CALR*-mutáció gyakorisága ET-ben 25,2% (118/468), míg PMF-ben 23,6% (30/127) volt. A *JAK2* V617F- és a *CALR*-mutáció-negatív ET-, illetve PMF-betegeknél az *MPL* gén mutációit vizsgáltuk. ET-ben 10 betegnél (2,1%, 10/468), PMF-ben pedig 8 betegnél (6,3%, 8/127) találtunk eltérést az *MPL* génben.

Az allélspecifikus PCR, a valós idejű PCR TaqMan szondával, a fragmensanalízis, a nagy felbontású olvadási görbe-analízis és a Sanger-szekvenálás kombinációit alkalmazva 354 PV-ben, 468 ET-ben és 127 PMF-ben szenvedő betegnél kerestük az MPN hátterében álló kóroki mutációt. PV-ben a betegek 98,6%-a hordozta a *JAK2* V617F-mutációt, míg 1,4%-ban találtunk *JAK2*-mutációt a 12. exonban. ET-ben 61,3%-ban (n = 287) *JAK2* V617F-, 25,2%-ban (n = 118) *CALR*- és 2,1%-ban (n = 10) *MPL*-mutációt találtunk, míg a betegek 11,3%-a (n = 53) a fenti mutációk egyikét sem hordozta (triplán negatív). Hasonló eloszlást tapasztaltunk PMF-ben: 58,3% (n = 74) *JAK2* V617F+, 23,6% (n = 30) *CALR*+, 6,3% (n = 8) *MPL*+, 11,8% (n = 15) pedig triplán negatív.

A klinikai jellemzők és az egyes kóroki mutációk jelenléte közötti összefüggéseket tanulmányozva megállapítottuk, hogy a *JAK2* V617F+ PV-betegekhez viszonyítva

a 12. exon mutációpozitív PV-betegek fiatalabbak voltak diagnóziskor (medián életkor: 63 vs. 40 év, $p = 0,005$). Részletesebb klinikai adatok hiányában további összehasonlítás a PV-csoportban nem volt lehetséges. A *CALR*⁺ és a *JAK2 V617F*⁺ ET-betegek klinikai és laboratóriumi adatait összevetve a következőket tapasztaltuk: a *CALR*⁺ betegek a *JAK2 V617F*⁺ betegekhez képest a diagnóziskor fiatalabbak (53 vs. 62 év, $p = 0,007$) voltak, magasabb volt a thrombocytaszámuk (1021 vs. 779 G/L, $p < 0,001$), alacsonyabb a hemoglobinszintjük (134 vs. 146 g/L, $p < 0,001$) és a fehérvérsejtszámuk (10 vs. 11 G/L, $p = 0,001$). Vénás trombozisz ritkábban fordult elő *CALR*⁺ ET-ben, mint *JAK2 V617F*⁺ ET-ben (7% vs. 18%, $p = 0,008$). A PMF-betegek csoportjában a *CALR*⁺ betegek a diagnóziskor fiatalabbak voltak (58 vs. 68 év, $p = 0,003$) és thrombocytaszámuk magasabb volt (523 vs. 250 G/L, $p < 0,001$).

Megbeszélés

A beállított molekuláris genetikai szűrő és megerősítő módszerekkel a klasszikus, *BCR-ABL1* negatív MPN-

ben szenvedő betegcsoportunkban az esetek 90%-ában tudtuk azonosítani a betegséget okozó genetikai eltérést. PV-ben a betegek 98,6%-ában *JAK2 V617F*⁻, 1,4%-ában *JAK2* 12. exon-mutációkat találtunk. Irodalmi adatok szerint a *JAK2* 12. exon-mutáció gyakorisága az európai populációban 1,9–7,4% [16, 17]. Mivel a nemzetközi tanulmányok szerint a *JAK2* gén közel 100%-ban érintett PV-ben, jelen tanulmányunkban a PV-gyanúval vizsgált *JAK2* mutáció negatív eseteket nem elemeztük. ET-ben és PMF-ben a mutációk előfordulási gyakorisága hasonlóan alakult: 61–58%-ban *JAK2 V617F*⁻, 25–24%-ban *CALR*⁻ és 2–6%-ban *MPL*⁻ mutációkat azonosítottunk. Betegcsoportunkban a talált mutációk előfordulási gyakorisága megfelel az irodalomban ismert adatoknak (1. táblázat).

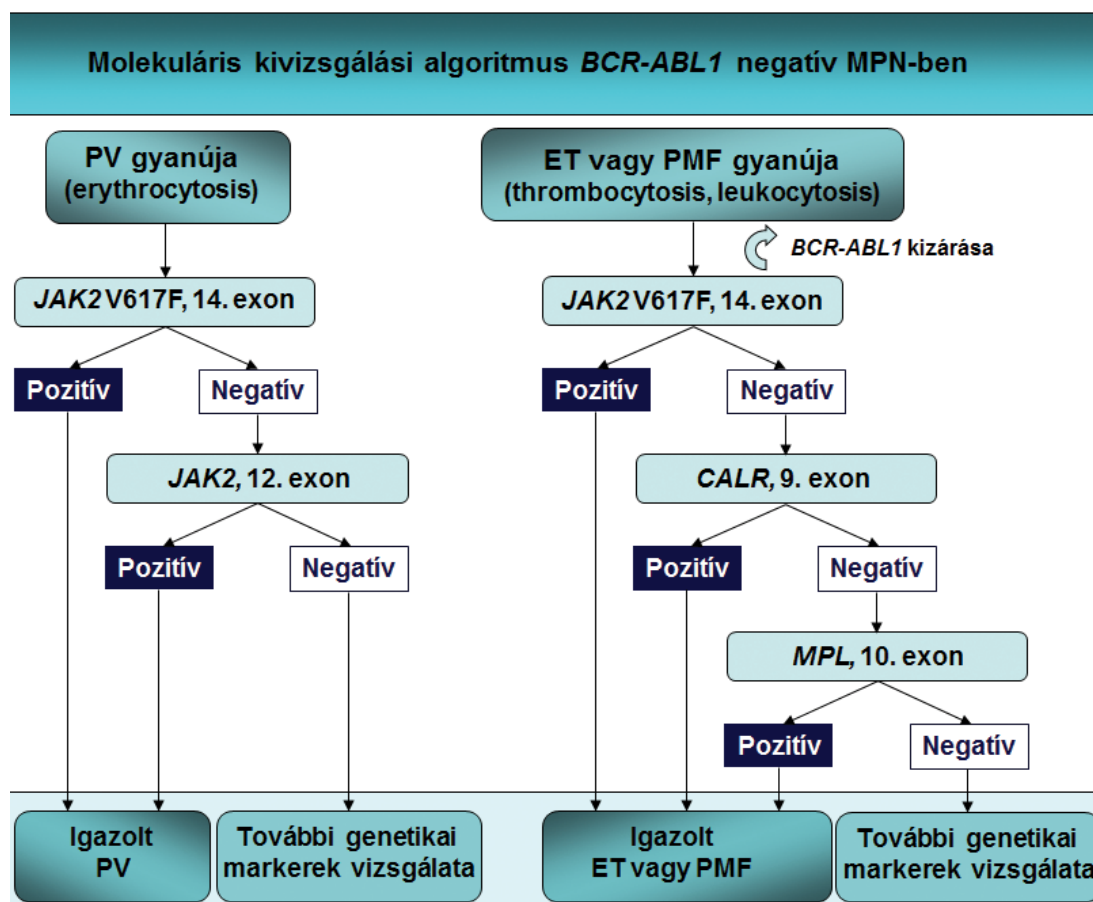
A laboratóriumi hatékonyság és gazdaságosság növelése érdekében a klasszikus, *BCR-ABL1* negatív MPN gyanúja esetén meghatároztunk egy rutindiagnosztikai vizsgálati sorrendet az irodalomban megállapított mutációgyakoriságok alapján (1. ábra) [8, 9, 18, 19]. Mivel az egyes szomatikus mutációk kölcsönösen kizárják egymást [8, 9], azaz a mutációk együttes előfordulása egy

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

Publikáció	Dg	n	<i>JAK2 V617F</i> ⁺		<i>CALR</i> ⁺		<i>MPL</i> ⁺		Triplán negatív	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Klampfl [8]*	ET	894	581	(65)	186	(21)	35	(4)	92	(10)
Rumi [26]*	ET	717	466	(65)	176	(25)	0	(0)	75	(10)
Rotunno [28]	ET	576	369	(64)	89	(15)	25	(4)	93	(16)
Fu [29]	ET	436	240	(55)	99	(23)	6	(1)	91	(21)
Tefféri [30]	ET	402	227	(56)	114	(28)	11	(3)	50	(12)
Nangalia [9]	ET	312	173	(55)	98	(31)	5	(2)	36	(12)
Chi [31]	ET	289	189	(65)	25	(9)	8	(3)	67	(23)
Chen [32]	ET	147	94	(64)	33	(22)	4	(3)	16	(11)
Wu [33]	ET	80	45	(56)	20	(25)	4	(5)	–	–
Lundberg [16]	ET	69	41	(59)	17	(25)	2	(3)	9	(13)
<i>Jelen közlemény</i>	<i>ET</i>	<i>468</i>	<i>287</i>	<i>(61)</i>	<i>118</i>	<i>(25)</i>	<i>10</i>	<i>(2)</i>	<i>53</i>	<i>(11)</i>
Guglielmelli [34]§	PMF	394	–	–	70	(18)	–	–	–	–
Tefféri [35]§	PMF	358	195	(54)	95	(27)	–	–	–	–
Li [36]	PMF	357	178	(50)	76	(21)	11	(3)	96	(27)
Klampfl [8]	PMF	321	189	(59)	99	(31)	18	(6)	15	(5)
Tefféri [37]§	PMF	254	147	(58)	63	(25)	21	(8)	22	(9)
Nangalia [9]	PMF	168	125	(74)	26	(15)	2	(1)	15	(9)
Panagiota [38]	PMF	133	74	(56)	28	(21)	5	(4)	–	–
Wu [33]	PMF	50	29	(58)	16	(32)	3	(6)	–	–
Lundberg [16]	PMF	34	15	(44)	11	(32)	3	(9)	5	(15)
<i>Jelen közlemény</i>	<i>PMF</i>	<i>127</i>	<i>74</i>	<i>(58)</i>	<i>30</i>	<i>(24)</i>	<i>8</i>	<i>(6)</i>	<i>15</i>	<i>(12)</i>

Megjegyzés: *, § Átfedő betegcsoportokon végzett vizsgálatok.

CALR = calreticulingén; Dg = diagnózis; ET = esszenciális thrombocythaemia; *JAK2* = 2. típusú Janus kináz gén; *MPL* = trombopoetinreceptor-gén; n = vizsgált betegek száma; PMF = primer myelofibrosis; V617F = a *JAK2* gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra.



1. ábra

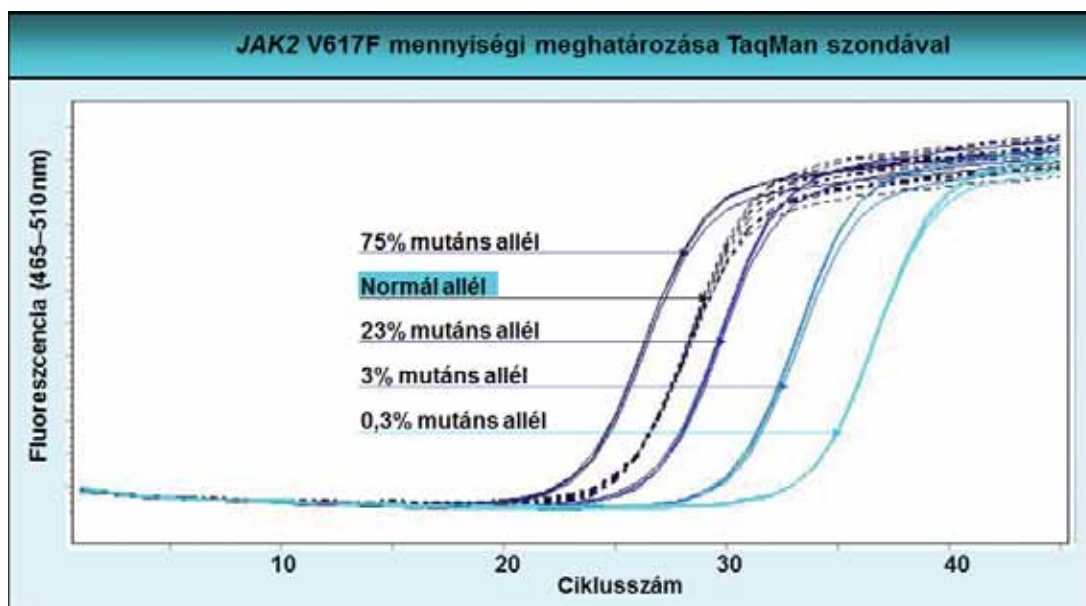
Rutinszerű, molekuláris diagnosztikai vizsgálatok egymáshoz viszonyított folyamatábrája az irodalomban megállapított mutációgyakoriságok alapján *BCR-ABL1* negatív, klasszikus myeloproliferatív neoplasiákban

BCR-ABL1 = breakpoint cluster region – Abelson fúziós gén; *CALR* = calreticulingén; ET = esszenciális thrombocythaemia; *JAK2* = 2. típusú Janus kináz gén; *MPL* = trombopoietinreceptor-gén; MPN = myeloproliferatív neoplasiák; PMF = primer myelofibrosis; PV = polycythaemia vera; V617F = a *JAK2* gén 617. valin aminosav cseréje fenilalaninra

betegnél irodalmi ritkaságnak számít, a mutációk vizsgálatát szekvenciálisan végeztük a diagnózis alapján. Irodalmi ajánlások is a párhuzamos helyett a szekvenciális vizsgálati sorrendet ajánlják [18, 19]. Első lépésként PV gyanúja esetén a *JAK2* V617F-pontmutációt szűrtük, ami a *JAK2*-mutációk több mint 90%-át adja. A *JAK2* gén 12. exonját érintő változások ritkák, vizsgálatuk csak *JAK2* V617F hiányában és alacsony eritropoetinszint vagy PV-re utaló csontvelőszövetten esetén indokolt [20]. Míg PV-ben a Philadelphia kromoszóma kizárása nem diagnosztikai kritérium, addig ET-ben és PMF-ben elsődleges [21]. ET és PMF gyanújakor a molekuláris diagnosztikát a *JAK2* V617F vizsgálatával kezdtük, és a negatív betegeknél a *CALR*-mutáció szűrésével folytattuk. A *CALR*-vizsgálatok bevezetésével nemcsak a rutin molekuláris diagnosztika algoritmusunk módosult, hanem lehetővé vált az ET- és PMF-megbetegedések genetikai hátterének pontosabb meghatározása is. Azokban az esetekben, ahol kétszeresen (mind *JAK2* V617F-re, mind *CALR*-ra nézve) negatív eredményeket kaptunk, a továbbiakban az *MPL* gén 10. exonját elemeztük. A *JAK2* V617F-, a *CALR*- és az *MPL*-mutációk MPN-re

(PV, ET, PMF) jellemző eltérések, ritkán fordulnak elő egyéb myeloid malignitásokban [22, 23]. Mivel a három gén mutációja a klasszikus MPN-esetek 90%-ánál pozitív, a mutációk kimutatását felhasználhatjuk a reaktív hematológiai válasz (például tüdő-, illetve szívbetegségek által kiváltott polyglobulia vagy például gyulladás által kiváltott thrombocytosis) és a klonális megbetegedések elkülönítéséhez.

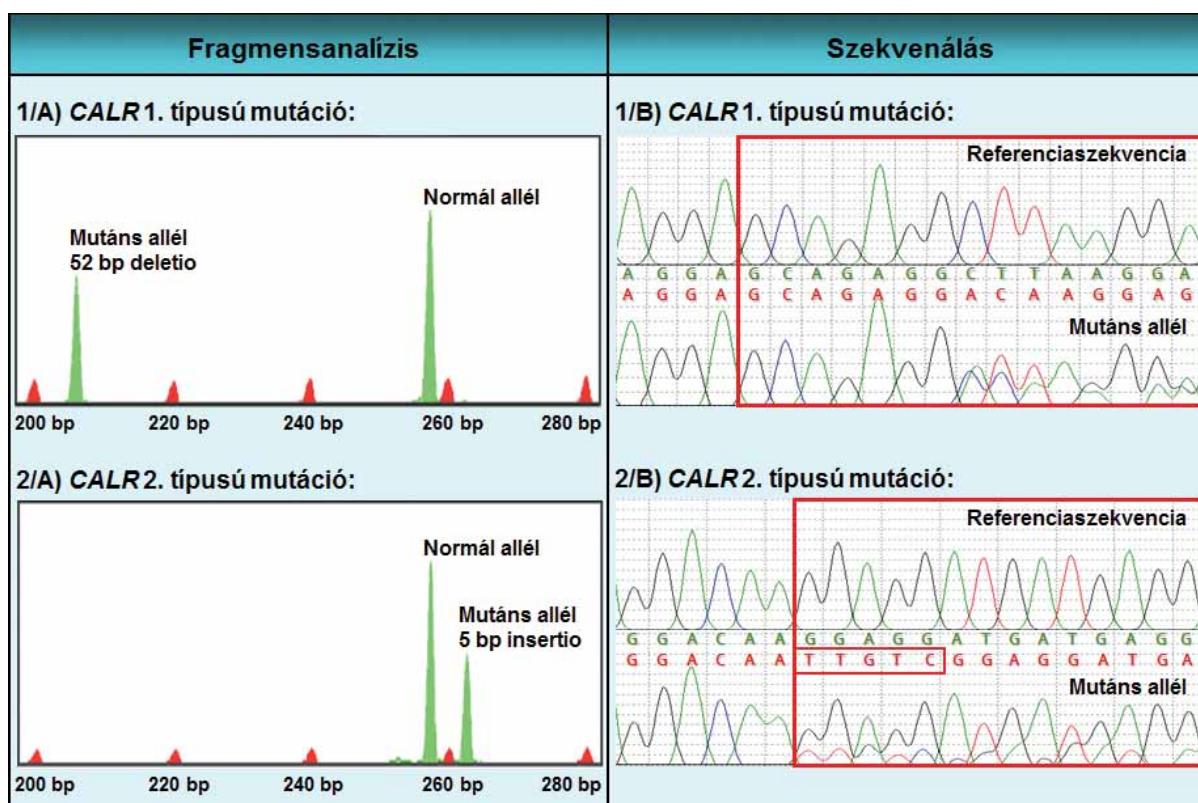
Negatív *JAK2* V617F-vizsgálat esetén a molekuláris genetikai laboratórium számára a megfelelő klinikai adatok ismerete nélkülözhetetlen a további vizsgálatok elvégzéséhez. Jelen beteganyagunk klinikai jellemzői megfelelnek a WHO-kritériumoknak, azonban a mindennapi rutin diagnosztikai tevékenység során számos, polyglobuliával, szekunder thrombocytosisal vagy leukocytosisal vizsgált betegnél végezzük el a molekuláris diagnosztikai teszteket. A 2005–2014 közötti 9 évben közel 5500 *JAK2* V617F-tesztet végeztünk, amelyek 29%-a bizonyult V617F-pozitívnek. Más laboratóriumok is hasonló V617F-pozitivitási arányokról (14–38%) számoltak be [19, 24]. A *JAK2* V617F vizsgálata viszonylag egyszerű és olcsó, évek óta ismeretlen ok miatt fennálló



2. ábra

A *JAK2* V617F-pontmutáció mennyiségi meghatározása valós idejű PCR és TaqMan szonda alkalmazásával

A képen a mutáns (kék folyamatos vonal) és normál (fekete szaggatott vonal) amplifikációs görbék láthatók. Az amplifikáció indulására jellemző ciklusszámok a mutáns allél mennyiségétől függően eltérnek. A normál allélhoz viszonyítva alacsonyabb ciklusszámot kapunk 50%-nál magasabb mutáns allélt tartalmazó minták esetén, míg a kevesebb mutáns allél jelenléte magasabb ciklusszámot eredményez. A minták V617F negatív genomiális DNS-be különböző mennyiségben hozzákevert V617F pozitív PCR termékeket tartalmaznak (MPN&MPNr-EuroNet referéncia anyag, engedéllyel)



3. ábra

Calreticulin- (*CALR*-) mutációk kimutatása fragmensanalízissel („A” panelek) és szekvenálással („B” panelek). „1/A és 1/B” panelek: 1. típusú, 52 bázispár (bp) deletiójával járó *CALR*-pozitív minta (c.1092–1143del; p.L367fs*46; gyakorisága 50%). „2/A és 2/B” panelek: 2. típusú 5 bázispár inszerciójával (TTGTC) járó *CALR*-pozitív minta (c.1154–1155insTTGTC; p.K385fs*47; gyakorisága 30%). „A” panelek: A 257 bp-os normál allél mellett egy további 205, illetve 262 bp hosszúságú PCR-termék is megfigyelhető. A pozitív eredmények megerősítéseként a „B” panelek a szekvenálás során kapott fluoreszcens regisztrátumokat tartalmazzák: az 1. és 2. típusú mutáns allélt a referenciaszekvenciához viszonyítva

A = adenin; bp = bázispár; C = citozin; *CALR* = calreticulingén; G = guanin; T = timin

polyglobulia, thrombocytosis vagy leukocytosis esetén a reaktív okok kizárására irányuló vizsgálatokkal párhuzamosan elvégezhető. *JAK2* V617F-negativitás esetén PV-ben a szérumeritropoetin, illetve ET-ben és PMF-ben a csontvelő-szöveti vizsgálat indokolt a további molekuláris genetikai vizsgálatok előtt. A *JAK2* V617F jelenléte olyan betegnél, akinél nem teljesülnek az MPN diagnosztikai kritériumok, felhívhatja a figyelmet a háttérben meghúzódó MPN lehetőségére (például splanchnicus vénatrombózis esetén a splenomegalia anaemiát, thrombocytopeniát eredményezhet, amely elfedi az MPN tüneteit).

A *JAK2* V617F kimutatására számos módszer elfogadott [18]. Nemzetközi ajánlások szerint a V617F-mutáció jelenléte legalább 1–3% mennyiségben patogenetikai jelentőségű [18]. A minőségi, allélspecifikus multiplex PCR agaróz gélelektroforetikus kimutatás egy egyszerű, olcsó, 1–5% érzékenységgel rendelkező módszer, amely azonban az 1–5%-os tartományban nem minden esetben reprodukálható. Az esetek kis hányadában álnegatív eredményt kaphatunk. Ajánlott a 0,1–1% tartományban is megbízható érzékenységgel rendelkező mennyiségi, valós idejű PCR bevezetése [25]. A nagy érzékenységgel, valós idejű PCR esetében az álpozitív eredmények elkerülése miatt közel 100 *JAK2* V617F-negatív személy mintáját analizáltuk. A nemzetközi ajánlások szerint 1% felett értékeljük az eredményt V617F-pozitívnak. Az eredmények véleményezését 0,1–1% között a klinikai, hematológiai, morfológiai és egyéb laboratóriumi eredmények integrált kiértékelésétől tesszük függővé (például citoreduktív kezelés, őssejt-transzplantáció, több MPN-klón egyidejű jelenléte). Ilyen esetekben 3–6 hónapon belüli ismétlés és megfigyelés javasolt.

A *JAK2*-, a *CALR*- és az *MPL*-pozitív vizsgálati eredmények bár alátámasztják az MPN diagnózist, nem tesznek különbséget a három *BCR-ABL1* negatív MPN között. Nem ismert, hogy ugyanazon genetikai eltérések milyen molekuláris mechanizmussal okozhatnak különböző klinikai képpel járó kórformákat: más progenitor érintett, vagy esetleg egyéb faktorok alakítják ki a fenotípust. Mindezek mellett a triplán (*JAK2*, *CALR* és *MPL*) negatív eseteknél sem zárható ki az MPN. Előfordulhat, hogy a mutáns klón a választott molekuláris genetikai módszer kimutathatósági szintje alatti mennyiségben van jelen (a fragmensanalízis 1–5%, a HRM 5–10%, a szekvenálás 20% mutáns klón jelenlétét mutatja ki), vagy a betegséget egy nem vizsgált génmutáció okozza. A végleges diagnózis felállítását a vércép, a klinikai kép, a csontvelő szöveti vizsgálata és a molekuláris genetikai vizsgálatok együttesen segítik.

Az MPN-ben előforduló mutációk kimutatása nemcsak diagnosztikai jelentőségű, azonosításukkal a várható szövődésminták gyakorisága és az MPN prognózisa is megbecsülhető. Az irodalmi adatokkal megegyezően a *CALR*⁺ és a *JAK2* V617F⁺ ET-betegek adatait összevetve azt tapasztaltuk, hogy a vénás trombózis ritkábban fordult elő *CALR*⁺ ET-ben [26, 27]. Az MPN-ben előforduló mutá-

ciók mennyiségi meghatározása további prognosztikai információt adhat, magasabb allélarány előrehaladottabb betegségekre utal. Az érzékeny, 0,01–100% nagyságrendű mennyiségi meghatározásra is alkalmas V617F valós idejű PCR a választandó módszer a minimális residualis betegség követésére (például haematopoieticus őssejt-transzplantáció, ritkán interferonkezelés után). A célzott terápiás lehetőségek terjedésével elképzelhető, hogy a későbbiekben a genetikai eltérés azonosítása a kezelés kiválasztásában is segítséget nyújthat.

Következtetések

Megállapítható, hogy a *CALR*-mutációk felfedezésével lehetővé vált a betegséget okozó molekuláris háttér meghatározása a *BCR-ABL1* negatív ET- és PMF-betegek közel 90%-ánál. A myeloproliferatív betegségek esetén a szerzett mutációk azonosítása nemcsak diagnosztikai, hanem prognosztikai szerepet is játszhat; minimális residualis betegség követési markerként szolgálhat, hosszabb távon segítséget nyújthat célzott, egyénre szabott terápiás megközelítésekhez.

Anyagi támogatás: A. H. Bólyai János kutatási ösztöndíjban részesült, valamint ösztöndíjként részt vett az MPN&MPNr-EuroNet (COST Action BM0902) III. Gyakorlati Képzésén 2012-ben. A kutatás T. A. OTKA-pályázat (KI04903) támogatásával készült.

Szerzői munkamegosztás: K. T., M. T., T. A., A. H.: A hipotézisek kidolgozása. K. T., B. K., M. N., B. A., A. H.: Molekuláris genetikai vizsgálatok. Cs. J.: Szöveti vizsgálatok. B. K., Cs. J., B. Á., H. G., E. M., F. S., R. P., M. T., T. A., A. H.: A klinikai adatok gyűjtése és elemzése. K. T., T. A., A. H.: Statisztikai elemzések. K. T., A. H.: A kézirat megszövegezése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Csehné Bánbidi Klárának, Haluska Brigittának, Mezibroczy Martinának és Petró Péternének a molekuláris genetikai tesztek végrehajtásában nyújtott segítségért.

Irodalom

- [1] Dameshek, W.: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 1951, 6(4), 372–375.
- [2] Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., et al.: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009, 114(5), 937–951.
- [3] Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., et al.: Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005, 365(9464), 1054–1061.

- [4] James, C., Ugo, V., Le Couédic, J. P., et al.: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005, 434(7037), 1144–1148.
- [5] Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., et al.: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352(17), 1779–1790.
- [6] Levine, R. L., Wadleigh, M., Coombs, J., et al.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005, 7(4), 387–397.
- [7] Pikman, Y., Lee, B. H., Mercher, T., et al.: MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.*, 2006, 3(7), e270.
- [8] Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A. S., et al.: Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 369(25), 2379–2390.
- [9] Nangalia, J., Massie, C. E., Baxter, E. J., et al.: Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.*, 2013, 369(25), 2391–2405.
- [10] Andrikovics, H., Krähling, T., Balassa, K., et al.: Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*, 2014, 99(7), 1184–1190.
- [11] Andrikovics, H., Szilvási, A., Meggyesi, N., et al.: Role of the activating mutation Val617Phe of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative diseases and significance of its detection. [A 2-es típusú Janus tirozin kináz Val617Phe aktiváló pontmutáció szerepe és kimutatásának jelentősége myeloproliferatív szindrómában]. *Orv. Hetil.*, 2007, 148(5), 203–210. [Hungarian]
- [12] Larsen, T. S., Christensen, J. H., Hasselbalch, H. C., et al.: The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.*, 2007, 136(5), 745–751.
- [13] Furtado, L. V., Weigelin, H. C., Elenitoba-Johnson, K. S., et al.: A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of JAK2 exon 12 mutations. *J. Mol. Diagn.*, 2013, 15(5), 592–599.
- [14] Boyd, E. M., Bench, A. J., Goday-Fernández, A., et al.: Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. *Br. J. Haematol.*, 2010, 149(2), 250–257.
- [15] Bergamaschi, G. M., Primignani, M., Barosi, G., et al.: MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd–Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. *Blood*, 2008, 111(8), 4418.
- [16] Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., et al.: Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2014, 123(14), 2220–2228.
- [17] Scott, L. M.: The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am. J. Hematol.*, 2011, 86(8), 668–676.
- [18] Bench, A. J., White, H. E., Foroni, L., et al.: Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br. J. Haematol.*, 2013, 160(1), 25–34.
- [19] Schnittger, S., Bacher, U., Eder, C., et al.: Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow. *Haematologica*, 2012, 97(10), 1582–1585.
- [20] Passamonti, F., Elena, C., Schnittger, S., et al.: Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*, 2011, 117(10), 2813–2816.
- [21] Tefferi, A., Thiele, J., Vannucchi, A. M., et al.: An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 2014, 28(7), 1407–1413.
- [22] Jones, A. V., Kreil, S., Zoi, K., et al.: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 2005, 106(6), 2162–2168.
- [23] Levine, R. L., Loriaux, M., Huntly, B. J., et al.: 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), 3377–3379.
- [24] Langabeer, S. E.: Referral centre variation in requesting JAK2 V617F mutation analysis for the investigation of a myeloproliferative neoplasm. *J. Clin. Pathol.*, 2012, 65(12), 1149–1150.
- [25] Jovanovic, J. V., Ivey, A., Vannucchi, A. M., et al.: Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia*, 2013, 27(10), 2032–2039.
- [26] Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., et al.: JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 2014, 123(10), 1544–1551.
- [27] Rumi, E., Pietra, D., Pascutto, C., et al.: Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*, 2014, 124(7), 1062–1069.
- [28] Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., et al.: Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*, 2014, 123(10), 1552–1555.
- [29] Fu, R., Xuan, M., Zhou, Y., et al.: Analysis of calreticulin mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia: clinical implications in diagnosis, prognosis and treatment. *Leukemia*, 2014, 28(9), 1912–1914.
- [30] Tefferi, A., Wassie, E. A., Guglielmelli, P., et al.: Type 1 versus type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am. J. Hematol.*, 2014, 89(8), E121–E124.
- [31] Chi, J., Nicolaou, K. A., Nicolaidou, V., et al.: Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*, 2014, 28(5), 1152–1154.
- [32] Chen, C. C., Gau, J. P., Chou, H. J., et al.: Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann. Hematol.*, 2014. Jul 13. [Epub ahead of print] PMID: 25015052.
- [33] Wu, Z., Zhang, X., Xu, X., et al.: The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Hematol. Oncol.*, 2014, 7, 48.
- [34] Guglielmelli, P., Lasho, T. L., Rotunno, G., et al.: The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*, 2014, 28(9), 1804–1810.
- [35] Tefferi, A., Lasho, T. L., Finke, C., et al.: Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*, 2014, 28(7), 1568–1570.
- [36] Li, B., Xu, J., Wang, J., et al.: Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica*, 2014. 99(11): 1697–1700.
- [37] Tefferi, A., Lasho, T. L., Finke, C. M., et al.: CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*, 2014, 28(7), 1472–1477.
- [38] Panagiotou, V., Thol, F., Markus, B., et al.: Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*, 2014, 28(7), 1552–1555.

(Krähling Tünde
Budapest, Karolina út 19–21., 1113
e-mail: tunde.krahling@gmail.com)