

FAMILIÁRIS MYELOID KÓRKÉPEK GENETIKAI ANALÍZISE

Doktori értekezés

Dr. Király Péter Attila

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Bödör Csaba, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Laura , PhD, egyetemi tanársegéd
Dr. Alizadeh Hussain, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Erdélyi Dániel, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Tóth Erika, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2017

Tartalom

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Bevezetés	6
II.1. A hemopoézis.....	6
II.2. A vérképző rendszer daganatos betegségei.....	7
II.3. A sporadikus AML-ben megismert leggyakoribb genetikai eltérések.....	9
II.4. A familiáris onkohematológiai kórképek irodalmi áttekintése.....	10
II.5. Familiáris myeloid kórképek.....	15
II.5.1. Klasszifikáció.....	15
II.5.2. Myeloid tumorok csíravonali mutációval, megelőző betegség nélkül.....	16
II.5.2.1. AML a CEBPA gén mutációjával.....	16
II.5.2.2. AML a DDX41 gén mutációjával.....	19
II.5.3. Myeloid tumorok megelőző vérlemezke funkciózavarral.....	20
II.5.3.1. AML/MDS a RUNX1 gén mutációjával.....	20
II.5.3.2. AML/MDS az ANKRD26 gén mutációjával.....	23
II.5.3.3. AML/MDS az ETV6 gén mutációjával.....	24
II.5.4. Myeloid tumorok citopéniával/csontvelő kimerüléssel.....	25
II.5.4.1. AML/MDS a GATA2 gén mutációjával.....	25
II.5.4.2. AML/MDS csontvelő kimerüléssel (<i>TERT/TERC</i> gének mutációja).....	27
II.6. Familiáris myeloproliferatív kórképek.....	29
II.7. Familiáris aplasztikus anémia az <i>SRP72</i> gén mutációjával.....	30
II.8. Szekunder genetikai eltérések megismerésének története FPD-AML-ben.....	31
III. Célkitűzések	32
IV. Módszer	33
IV.1. Azonosított familiáris myeloid esetek.....	33
IV.2. Familiáris AML/MDS háttérben álló mutációk analízise.....	34
IV.2.1. DNS izolálás.....	34
IV.2.2. Familiáris MDS/AML gének PCR amplifikációja.....	34
IV.2.3. Familiáris MDS/AML gének Sanger szekvenálása.....	37
IV.3. A <i>JAK2</i> V617F mutáció, az <i>SH2B3</i> és a <i>RUNX1</i> gének mutációk vizsgálata sporadikus AML-ben.....	38
IV.4. Teljes exom szekvenálás (WES) a IV. családban.....	39
IV.5. <i>JAK2</i> és <i>SH2B3</i> gének mutációinak nagy érzékenységű analízise.....	42
IV.6. Allélspecifikus <i>RUNX1</i> expresszió vizsgálata digitális PCR-rel.....	42
IV.7. A <i>JAK2</i> 46/1 haplotípus vizsgálata.....	45

V. Eredmények	46
V.1 Az I.-IV. családok részletes klinikai és genetikai ismertetése.....	46
V.2. WES eredményei a IV. családban.....	51
V.3. A <i>RUNX1</i> és <i>JAK2/SH2B3</i> gének mutációinak együttes előfordulása sporadikus AML-ben.....	56
V.4. Allélspecifikus <i>RUNX1</i> expresszió vizsgálata digitális PCR-rel.....	57
V.5. Klonális evolúció vizsgálata a IV. családban.....	60
V.6. A <i>JAK2</i> 46/1 haplotípus vizsgálata az FPD-AML családban.....	62
VI. Megbeszélés	64
VII. Következtetések	75
VIII. Összefoglalás	76
IX. Summary	77
X. Irodalomjegyzék	78
XI. Saját Közlemények jegyzéke	89
XIII.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények	90
XIII.2 Egyéb témában megjelent közlemények	90
XII. Köszönetnyilvánítás	91

I. Rövidítések jegyzéke

AML	Akut myeloid leukémia
AA	Aplasztikus anémia
aUPD	Szerzett uniparentális diszómia
B-ALL	B-sejtes akut limfoid leukémia
CALR	Calreticulin
CBF	„core binding factor”
CCF	„cancer cell fraction
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha
CFU	Kolóniaformáló egység
CLL	Krónikus limfocitás leukémia
CN-AML	Citogenetikai aberrációt nem hordozó akut myeloid leukémia
DCML	dendritikus sejt, monocita, limfocita hiány
ddNTP	Didezoxi-nukleotid trifoszfát
DDX41	DEAD box protein 41
DLBCL	Diffúz nagy B-sejtes limfómák
dmCEBPA	Dupla típusú CEBPA mutáció
DNS	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxinukleotid-trifoszfát
dPCR	digitális PCR
FAB	Francia-Amerikai-Brit klasszifikáció (akut myeloid leukémiák)
FVS	Fehérvérsejt szám
FL	Follikuláris limfóma
FLI1	„friend leukemia integration 1 transcription factor”
FLT-3	fms-like tyrosine kinase 3
FPD-AML	Familiáris, vérlemezke funkciózavar talaján kialakuló akut myeloid leukémia
HL	Hodgkin limfóma
HGB	Hemoglobin
HSC	Hemopoetikus őssejt
JAK2	Janus arcú kináz-2

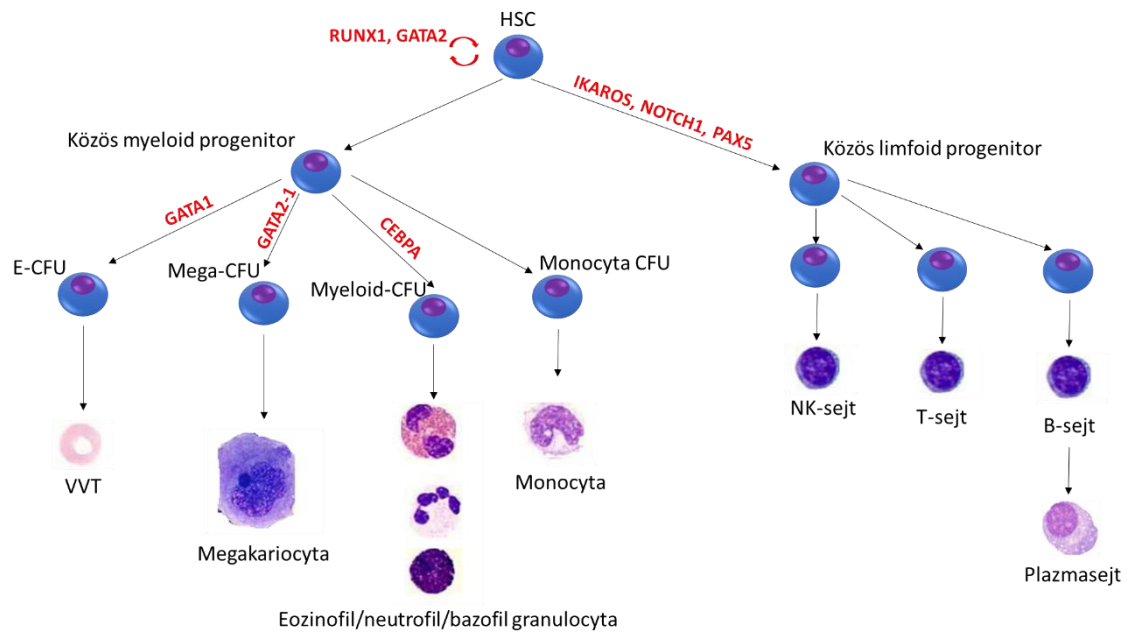
JMMol	Juvenilis myelomonocitaer leukémia
LDH	Laktát dehidrogenáz
MDS	Myelodiszpláziás szindróma
MPL	Thrombopoetin receptor
MPN	Myeloproliferatív neoplazma
NGS	Új generációs szekvenálás
NPM	Nucleophosmine
PCR	Polimeráz láncreakció
Ph	Philadelphia kromoszóma
RAEB	Refrakter anemia blasztszaporulattal
RNS	Ribonukleinsav
RUNX1	RUNT homológiai domént hordozó transzkripció faktor
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNV	Single nucleotide variant
TAE	TRIS-sósav EDTA
THR	Vérlemezke szám
THC2	2.-es típusú familiáris trombocitopénia
UDS	„ultra deep sequencing”
UTR	Átírózó, nem kódoló gén régió
VAF	Variáns allélfrekvencia
WES	Teljes exom szekvenálás.
WBC	Fehérvérsejt szám
WHO	Egészségügyi Világszervezet

II. Bevezetés

II.1. A hemopoézis

A hemopoézis a felnőtt szervezetben a csontvelőben zajló folyamat, mely felelős a vér alakos elemeinek termeléséért. A hemopoézist a hemopoetikus őssejt tartja fenn (HSC). A HSC korlátlan önmegújítási képességgel rendelkezik, valamint képes a vérképzés valamennyi irányába történő elköteleződésre. A HSC differenciálódása során kolóniaképző egységeket (CFU) hoz létre, melyek egy-egy sejtvonal kialakításáért lesznek felelősek. A myeloid CFU-k a myeloid rendszer valamennyi sejtfeleségének irányába képesek differenciálódni, azonban az érés során elköteleződnek egyes sejtvonalak irányába (pl. vörösvértest-CFU-E, granulocytá-CFU-G) és egy érési soron keresztül hozzák létre az érett alakokat. A limfoid irányba elköteleződő vérképző őssejtek B, T és NK kolóniaformáló sejtekké differenciálódva kezdik meg az érett alakok létrehozását a csontvelőben, majd a perifériás nyirokszervekben (1).

Régóta ismert a molekuláris biológiában, hogy a sejtosztódás irányításáért (és lényegében így a hemopoézis fenntartásáért) felelős főszerepet a különböző transzkripciós faktorok játsszák. A transzkripciós faktorok olyan fehérjék, melyek általában a jelátviteli útvonalak „végállomásaként” közvetlen DNS kötő képességgel rendelkeznek és más gének átíródását tudják szabályozni. Ezekben a „mester” regulátor fehérjékben, különböző típusú mutációk kapcsán keletkező károsodások károsíthatják a hemopoézist és daganatok kialakulásához vezethetnek. Számos hematológiai daganat kialakulásának hátterében ismertek a különböző szabályozó transzkripciós faktorokat érintő (például *CEBPA*, *GATA1-2*, *RUNX1*, *PAX5*, *ETV6*, *IKAROS*, *NOTCH1*) pontmutációk vagy transzlokációk, amelyek több esetben is biomarkerként szolgálnak e kórképek diagnosztikájában, kórjóslatában és molekuláris szintű nyomon követésében is (2-4) (1.ábra).



1.ábra: A hemopoézis folyamata. A hemopoetikus őssejtből az érés kezdetén szétválék a közös myeloid és limfoid útvonal. A közös myeloid őssejtből differenciálódnak a különböző kolóniaformáló egységek (E-CFU, Mega-CFU stb.) melyekből több osztódáson és érési folyamaton keresztül lesznek a perifériára kijutó alakos elemek. Rövidítések: *HSC*: Hemopoetic Stem Cell, *CFU*: Colony Forming Unit, *VVT*: Vörösvértest.

II.2. A vérképző rendszer daganatos betegségei

A vérképző rendszer klonális megbetegedéseit a myeloid és a limfoid rendszer daganataira oszthatjuk fel. A különféle entitások követik a myeloid/limfoid érés stádiumait, és az egyes szakaszoknak megfelelő érésgátoltság, klonális sejtszaporulat jellemző rájuk. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) klasszifikációja magában foglalja az egyes szövettani entitásokat, valamint ezen túlmenően rendszeresen kerülnek be a klasszifikációba új, jellemzően molekuláris genetikai alapokon nyugvó entitások. A jelenlegi, 2016-os WHO klasszifikáció egyszerűsített formái az 1-es és 2-es táblázatokban találhatóak (3).

1. Táblázat: A myeloid rendszer daganatai

Entitás
Myeloproliferatív neoplazmák
Myeloid/limfoid neoplazmák eozinofiliával és a PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, vagy PCM1-JAK2 átrendeződéssel
Myelodiszplastikus/myeloproliferatív neoplazmák
Myelodiszplastikus szindróma
Akut myeloid leukémia

2. Táblázat: A limfoid rendszer daganatai

Entitás
B-sejtes limfoblasztos leukémia
Érett B-sejtes limfómák
T-sejtes limfoblasztos leukémia
Érett T és NK sejtes neoplazmák
Hodgkin limfóma
Transzplantáció asszociált limfoproliferatív betegség
Hisztiocitás és dendritikus sejtes neoplazmák

Külön kiemelt a myeloid rendszer daganatain belül a myelodiszpláziás szindrómák (MDS), hiszen bár a kórképek döntően sporadikusak, elsőként itt jelent meg önálló entitásként a csíravonali hajlamosító tényezővel bíró alcsoport, melynek genetikai megismerésével elkezdődött a familiáris hematológiai kórképek feltérképezése. A familiáris MDS/AML az első olyan hematológiai betegségcsoport, ahol genetikai eltéréseket ismerhettünk meg (3. táblázat).

3. Táblázat: Myelodiszpláziás szindróma (MDS)

Entitás
MDS egy sejtvonal diszpláziájával
MDS gyűrű szideroblasztokkal
MDS több sejtvonal diszpláziájával
MDS blaszt szaporulattal
MDS izolált 5q- kromoszóma eltéréssel
MDS másképpen nem osztályozható
MDS csíravonali hajlamosító tényezővel

II.3. A sporadikus AML-ben megismert leggyakoribb genetikai eltérések

Az AML egy igen heveny lefolyású betegség, mely mai elképzeléseink szerint csontvelő transzplantáció nélkül gyógyíthatatlan (5). A betegség hátterében a myeloid blasztok érésatlása és felszaporodása áll a csontvelőben, illetve a perifériás vérben. A betegség WHO felosztása alapján visszatérő genetikai abnormalitásokkal társuló, diszpláziás vonásokkal társuló, illetve terápiaasszociált, valamint máshogy nem osztályozható kategória különíthető el (6). A visszatérő citogenetikai aberrációkat hordozó AML mellett az ún. normál kariotípusú AML (NK-AML) megismerésében hatalmas előrelépést jelentett az új generációs szekvenálás (WES) elterjedése. Az NK-AML-ben megismert genetikai eltérések közül a *CEBPA* génről jelen dolgozatban részletesen fogunk értekezni. Az *FLT-3* (fms-like tyrosine kinase 3) nevű receptor-tirozin kináz és az NPM (nucleophosmin) magi transzporter fehérje, a leggyakrabban érintett, terápia konzekvenciával is rendelkező gének sporadikus AML-ben. Ezen eltéréseken túlmenően a WES vizsgálatok elterjedésével számos új patogenetikai útvonalat ismertünk meg AML-ben. A leggyakoribb eltérés a sejtciklus szabályozó és az epigenetikai gépezet tagjaiban található meg. Az epigenetikai szabályzásában részt vevő DNS metil transzferáz (*DNMT3A*), a *TET2* DNS metil transzferáz gyakran fordulnak elő NK-AML-ben. Az epigenetikai szabályozást közvetett módon befolyásoló metabolikus szereppel bíró *IDH1* és *IDH2* mutációi mintegy 10%-ban fordulnak elő AML-ben bár terápia és prognosztikus szerepük még kérdéses. A hiszton fehérjék kémiai módosításában szerepet játszó *EZH2* és *ASXL1* az NK-AML mintegy 20%-ban fordulnak elő. Ezen felül leírták az RNS splicing és az RNS splicing tagjainak mutációit is, melyek szintén a sejtciklus szabályzásában vesznek részt.

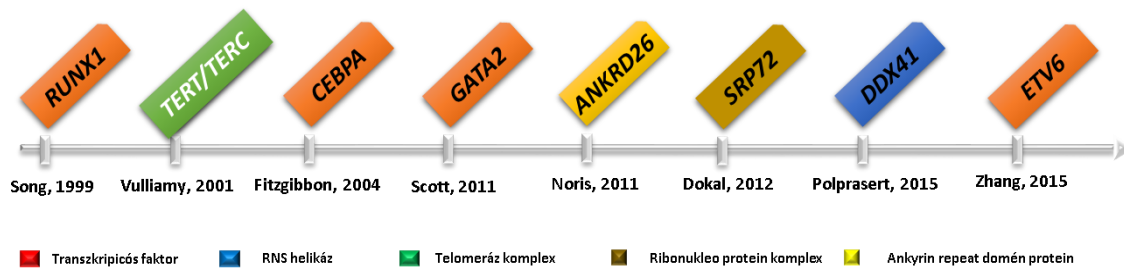
Kiemelhető, hogy a sporadikus AML kialakításában részt vevő gének spektruma eltérést mutat a familiáris betegségekben megismertektől, egyfajta különleges biológiai útvonalra világítva rá (7).

II.4 A familiáris onkohematológiai kórképek irodalmi áttekintése

A hematológiai malignitások családi halmozódásának ismerete immáron több évtizedre nyúlik vissza, korai esettanulmányok és beszámolók szóltak ezekről a kórképekről, de a genetikai megismerésük az elmúlt évtizedben indult csak meg (8, 9). Az esetek pontos száma nem ismert még, azonban valószínűleg alábecsüljük előfordulásukat. Ezt támasztja alá a tény, hogy az új WHO klasszifikációban önálló entitásként jelennek meg (6). A technika fejlődésének, az új generációs szekvenálás (NGS) elterjedésének köszönhetően egyre több gént ismerünk meg melynek csíravonali mutációi a familiáris kórképek hátterében állhatnak, így egyre több esetben derül fény a családon belüli halmozódás hátterében álló genetikai rendellenességre. Habár egyre bővülnek ismereteink és egyre több diagnosztikus értékű célpont áll rendelkezésünkre, a rutin diagnosztikának napjainkban még nem része familiáris halmozódás esetén sem a genetikai vizsgálat elvégzése. A bővülő ismeretek, és az egyre több hajlamosító genetikai komponens megismerése arra is rámutat továbbá, hogy a kezdetben csupán irodalmi ritkaságnak vélt örökletes hematológiai kórképek sokkal nagyobb számban fordulnak elő a vélnél, sokszor felfedezetlenek maradnak és sporadikus betegségekként követjük és kezeljük őket (10).

A familiáris daganatszindrómákat (obligát praeneoplasztikus állapotok) az egyszerű családi halmozódást mutató tumoroktól az különíti el, hogy az előző kategóriába eső daganatok hátterében egy kimutatható genetikai mutáció áll, mely a daganat kialakulását iniciálja. Az onkológiában régóta fennálló feltételezés, hogy az örökletes daganat szindrómák eseteinek egy részében a mutáció a betegség megjelenésének szinte 100% penetranciájával jár (pl. familiáris adenomatosis polyposis szindróma az *APC* gén mutációjával), míg más esetekben nem minden mutációt hordozó családtagban jelenik meg malignus fenotípus (pl. *BRCA1/2* és emlőtumor kapcsolata). Ezen utóbbi esetekben a malignus fenotípus megjelenéséhez további genetikai eltérésekre van szükség, melyek a daganat kialakulását elősegítik. A hematológiai daganatokon belül, - mint fentebb említésre került - is már régóta ismert a családi halmozódás jelensége, azonban a XX. század végéig nem derült fény konkrét genetikai eltérésre, amely az örökletesség hátterében állhat. Az első szindróma, melynek hátterében sikerült genetikai komponenszt igazolni az irodalomban a familiáris

vérlemezke funkciózavar, emelkedett myelodiszplázia (MDS)/akut myeloid leukémia (AML) rizikóval elnevezésű kórkép volt (ún. „familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy”: FPD-AML), melyben valamennyi hordozó betegben változatos súlyosságú vérzészavar, ill. vérlemezke funkciózavar jelentkezett, fokozott MDS/AML hajlammal. A szindróma hátterében a *RUNX1* génben változatos lokalizációban elhelyezkedő mutációkat találtak meg (11). Néhány év múlva következett az igen magas penetranciával járó familiáris akut leukémia hátterében felfedezett (sporadikus esetekben már ismert) *CEBPA* nevű gén inzercióval/delációval járó mutációinak leírása (12). Az elkövetkező évtizedben szinte évről évre újabb géneket ismertünk meg és több különleges betegségsoport képe kezdett kirajzolódni (2. ábra).



2. ábra: A familiáris hematológiai kórképek hátterében álló genetikai eltérések megismerésének kronológiai sorrendje. Piros színnel jelölve a transzkripciós faktorok, zöld a telomeráz komplex részei, sárga az ankirin repeat doménnel rendelkező fehérje, kék az RNS helikáz, barna a ribonukleo-protein komplex része. (Az ábrán feltüntetett szerzők és folyóiratok: Song et al, 1999 Nat Genet, Vulliamy et al, 2001 Nat Genet, Fitzgibbon et al, 2004 NEJM, Scott et al, 2011 Nat Genet, Noris et al, 2011 Blood, Dokal et al, 2012 AJHG, Polprasert et al, 2015 Cell, Zhang et al, 2015 Nat Genet).

A familiáris vérlemezke funkciózavarok és malignitási rizikó hátterében újabb gének kerültek felfedezésre, az *ETV6* és az *ANKRD26*. Utóbbi a 2. típusú familiáris trombocitopénia hátterében álló hajlamosító mutáció (13, 14). A *GATA2* gén mutációját több változatos és színes immunológiai kórkép hátterében írták le, melyek egy közös ismérve, hogy fokozott MDS rizikóval jár gyermek, illetve fiatal felnőttkorban, igen nagy penetranciával (15). Külön kórképekként tartjuk számont a telomeráz génkomplex érintettségével járó kórképeket, melyek jellegzetes több szervi fejlődési

rendellenességekkel járnak, de ezek közt található olyan betegség is melynek fő tünete a korai csontvelő kimerülés és az emelkedett AML/MDS rizikó (telomeráz biológiát érintő kórképek, a *TERT* ill. *TERC* gének mutációival) (16). A legfrissebben felfedezett gének az *SRP72* és a *DDX41*. A *DDX41* mutációit az első közlemények alapján idősebb életkorban fellépő familiárisan halmozódó MDS háttérben írták le, azonban egy későbbi közleményben más hematológiai kórképek háttérben is megtalálták (17-19). Az *SRP72* gén mutációját familiáris aplasztikus anémiában írták le (20).

Kezdetben döntően familiárisan halmozódó MDS háttérben találtak egyértelmű genetikai hajlamosító tényezőket, azonban napjainkra más onkohematológiai kórképekben is ismert a családi halmozódás jelensége. A Philadelphia kromoszóma (Ph) negatív myeloproliferatív kórképek családi halmozódásának vizsgálata során igen érdekes megfigyelésre jutott Saliba és munkacsoportja. A familiáris halmozódás kapcsán a Ph negatív kórképekben jól ismert Janus arcú kináz (*JAK2*) és calreticulin (*CALR*) gének mutációi csak a tumorsejtekben jelentek meg, mint szomatikus mutációk, míg a csíravonali komponens egy nagyobb kromoszóma régió duplikációja volt, mely érintette az *ATG2B* és *GSKIP* géneket (21). Familiáris halmozódás háttérben ezen felül leírták még az *SH2B3* gén, illetve az *RBBP6* nevű gének mutációit, melyek közül az utóbbi a tumorszupresszor retinoblasztóma kötőfehérjéje, míg az előbbi gén a JAK-STAT jelátvitel fontos szereplője és jelen dolgozatban külön fejezetben foglalkozunk vele (22, 23).

Bár a limfoid kórképek esetében is megfigyelhető a családi halmozódás jelensége, ezen kórképek genetikájának irodalma ma még nem annyira szerteágazó, mint a myeloid kórképeknél ismertetett. 2013-ban Shah és munkacsoportja fedezte fel a *PAX5* gén mutációit két független családban, melyben gyermekkori B-sejtes ALL fordult elő több generációban is, több gyermeket is érintve. A *PAX5* csíravonalbeli mutációt hordozók közt tünetmentes hordozók is előfordultak, a leukémia kialakulásához ugyan is a vad allél elvesztésére volt szükség a betegekben. A *PAX5* a limfoid érésben szerepet játszó transzkripciós faktor, sporadikus ALL-ben is ismert szomatikus érintettsége (24). Habár a limfómák körében erős családi aggregáció figyelhető meg, külön rizikófaktort jelent a családi pozitivitás, – különösen igaz ez a krónikus limfocitás leukémiában (CLL) – ezen kórképek genetikai háttéréről igen kevés ismerettel rendelkezünk.

Neven és munkacsoportja 2013-ban ismertette a korai kialakulású gyulladós bélbetegség (VEO-IBD) és a diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) közötti kapcsolat genetikai hátterét. A VEO-IBD hajlamosító szerepe limfoproliferatív betegségek megjelenésére ismert volt már korábban is, illetve az interleukin 10 (IL-10) és receptorának (IL-10R) mutációi is ismertek voltak ezekben a kórképekben, azonban ebben a tanulmányban elsőként írták le a genetikai hajlamosító hatásukat extraintesztinális megjelenésű DLBCL-ben, egy új limfóma altípust körülhatárolva mely VEO-IBD-ben jelenik meg az IL-10 és IL-10R csíravonali mutációi mellett (25). A Hodgkin limfóma (HL) egy ritka B-sejtes limfoproliferatív megbetegedés, mely bár nem örökletes betegség, a családon belüli előfordulása magasra emeli a betegség kialakulásának kockázatát (26). A Svéd familiáris daganat adatbázis alapján is ismert, hogy a betegség családon belüli előfordulása szignifikánsan növeli a kialakulás esélyét a családtagokban is (27). Napjainkig azonban egyetlen genetikai vizsgálat tudott igazolni örökletes eltérést a betegség hátterében. Ristolainen és munkacsoportja azonosította az *ACAN* gén homozigóta delécióját egy családban, ahol 5 gyermek közül hárman szenvedtek HL-ban. A heterozigóta formában hordozókban nem jelent meg a betegség (28). Az *ACAN* gén az aggrecan géncsaládba tartozó, az extracelluláris mátrix felépítésében résztvevő gén, mely fokozott expressziója a porcszövetben figyelhető meg.

2016-ban pedig az egyik legerősebb familiáris aggregációt mutató kórkép hátterében sikerült először csíravonali hajlamosító tényezőt felfedezni. A krónikus limfocitás leukémia (CLL) családi halmozódása is régóta megfigyelt és leírt jelenség, genetikai eltérések azonban nem ismertek ebben a betegségben melyek monogénes öröklődés mintázat hátterében állhatnak (27). Speedy és munkacsoportja azonosított 66 családból 6 esetben mutációkat a *POT1* és *ACD* génekben, ahol visszatérően/familiáris jelleggel jelent meg a CLL. Mind a két gén a telomérák fenntartásáért felelős ún. Shelterin komplex tagjai. A *POT1* (Protection of Telomeres) gén a DNS telomérákra jellemző TTAGGG repeatekhez kötődve védi a kromoszómák végeit. Az *ACD* gén a Shelterin komplex térszerkezetét stabilizáló fehérjét kódol (29).

Az irodalmi ismereteink bővülésével, szükségessé válik a diagnosztikai és terápiás aktivitás bővítése is. A familiáris myeloid kórképek már bekerültek a WHO 2016-os klasszifikációjába és klinikai ajánlások is születtek már ezen kórképek kiemelt

figyelemmel történő kezelésére és követésére, különös tekintettel a csontvelő transzplantáció és a tünetmentes mutáció hordozók kérdéskörében (30).

II.5. Familiáris myeloid kórképek

II.5.1 Klasszifikáció

A 2016-os WHO klasszifikáció egyik legjelentősebb változása az volt, hogy a myeloid rendszer betegségei közt megjelent egy új kategória: a myeloid neoplazmák csíravonali hajlamosító tényezővel elnevezéssel. A klasszifikációban ez a kategória foglalja össze, és rendszerezi klinikai, illetve patológiai jellemzők szerint az elmúlt évtizedben megismert örökletes kórképeket. A klasszifikáció az MDS-t továbbra is döntően sporadikus kórképnek írja le, a familiáris MDS diagnózisának leírását pedig nem az öröklési mintázathoz, hanem a mutáció kimutatásához köti, felhívva a figyelmet pozitív esetén a közeli rokonok, a család többi tagjának vizsgálatára is (6). A 2016-os WHO klasszifikációban megjelenő familiáris myeloid kórképeket, a 4. táblázat foglalja össze. Munkánk során ennek sorrendje szerint haladunk végig az egyes kórképek ismertetésén.

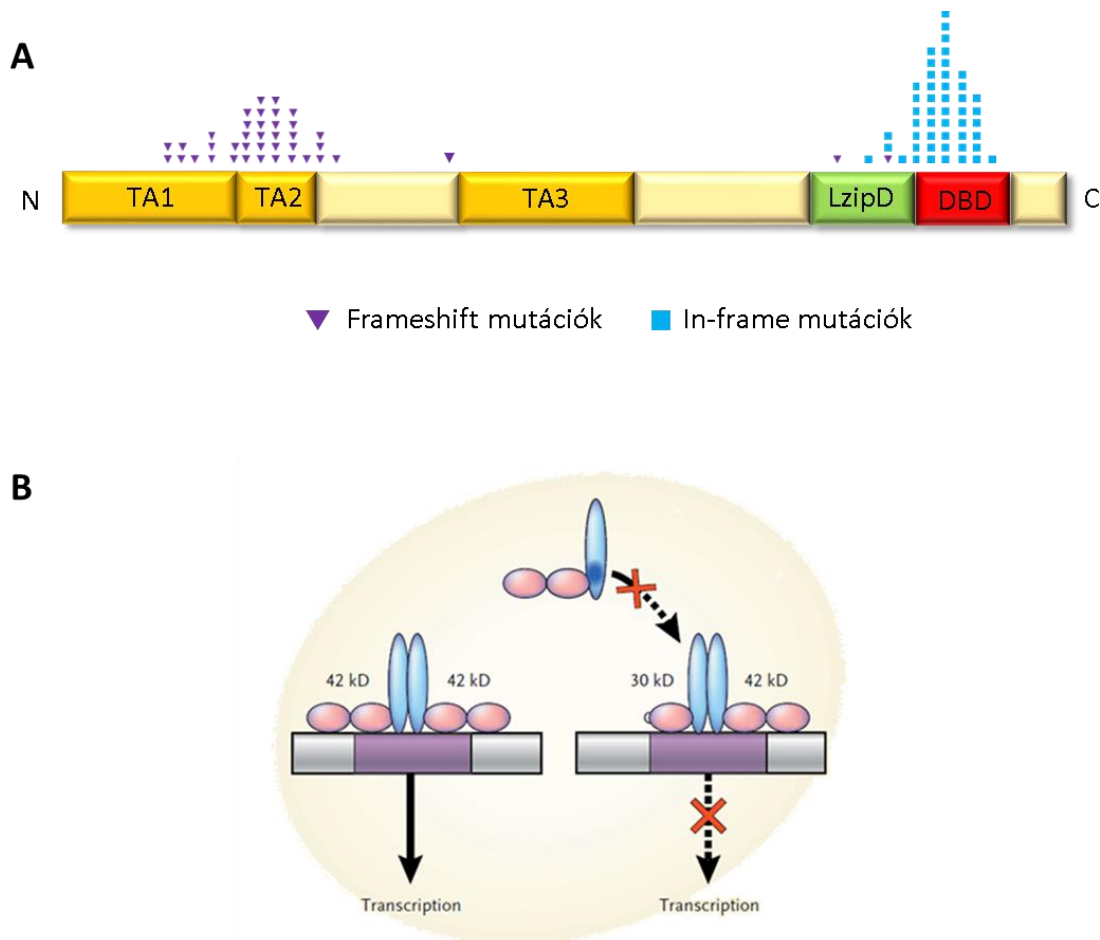
4. Táblázat: Myeloid kórképek familiáris predispozícióval

Entitás
Myeloid tumor csíravonali mutációval, megelőző betegség nélkül
AML a <i>CEBPA</i> gén mutációjával
AML/MDS a <i>DDX41</i> gén mutációjával
Myeloid tumor megelőző vérlemezke funkciózavarral
AML/MDS a <i>RUNX1</i> gén mutációjával
AML/MDS az <i>ANKRD26</i> gén mutációjával
AML/MDS az <i>ETV6</i> gén mutációjával
Myeloid tumor cytopéniával/csontvelő kimerüléssel
AML/MDS a <i>GATA2</i> gén mutációjával
AML/MDS csontvelő kimerüléssel (TERT/TERC gének JMML neurofibromatózissal a Noonan Szindróma részeként
Noonan szindróma szerű kórképek
AML/MDS Down szindróma részeként

II.5.2. Myeloid tumorok csírvonali mutációval, megelőző betegség nélkül

II.5.2.1 AML a CEBPA gén mutációjával

A *CEBPA* gén (CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha) egy ún. leucin cipzár motívumot tartalmazó DNS-kötő transzkripció faktor, mely homo-, illetve heterodimerizálódva a DNS CCAAT motívumaihoz kötődve a génátírás szabályozásában játszik szerepet. A myeloid progenitor sejtek érésében játszott fő szerepe a proliferáció leállításának szabályozása. (31). A *CEBPA* gén terméke egy 42 kD méretű fehérje melynek inzerció/deléción (in/del) mutációi érinthetik a fehérje N-terminális részét, melynek következténgátlódik a dimerizáció, illetve a C-terminális részét, mely a DNS kötéséért felelős (3. ábra) (32). Sporadikus AML ún. citogenetikai aberrációt nem hordozó csoportjában (CN-AML) a betegek mintegy 6-10%-a hordozza a *CEBPA* gén mutációját. Ha a fehérje N- illetve C-terminális régiója érintett, monoallélikus vagy ún. „single” *CEBPA* mutációról beszélünk, ha mind a két régió érintett akkor az elnevezés biallélikus vagy ún. „double” *CEBPA* mutáció. A biallélikus *CEBPA* mutációt hordozó sporadikus AML egy új, különálló csoport (dmCEBPA AML) a 2016-os WHO klasszifikációban, amely klinikailag kedvező kórlefolyással társul (5, 6, 33).



3. ábra: **A:** A CEBPA fehérje vázlatos szerkezete és leggyakoribb mutációinak lokalizációja. TA: transzaktivációs domén, LzipD: leucin cipzár motívumot tartalmazó domén, DBD: DNS kötő domén. A mutációk jellegzetesen in/del típusúak és a gén N, illetve C-terminálisán helyezkednek el. **B:** A mutáns allélról átíródó trunkált CEBPA fehérje domináns negatív hatást fejt ki az ép allélról átíródóra és akadályozza a transzkripció szabályozását (Forrás: Smith et al, NEJM 2004).

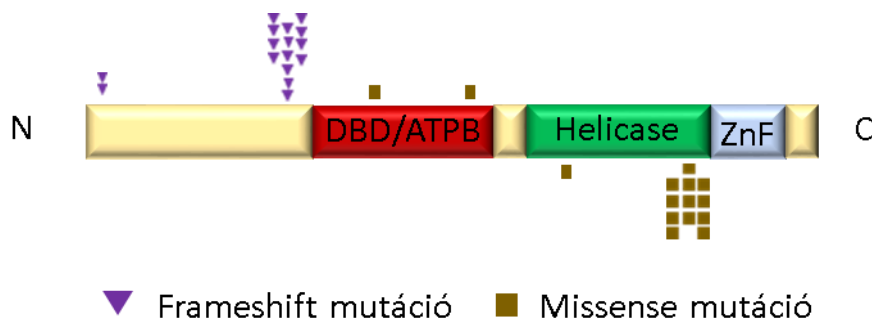
A *CEBPA* génben előforduló csírvonali mutációkat 2004-ben fedezték fel egy családban, ahol 3 generációban is megjelent az AML fenotípusa, fiatal életkorban (12). A későbbiekben egyidőben több tanulmány is alátámasztotta hasonló fiatal kori, családi halmozódást mutató esetekben a *CEBPA* gén mutációját (34, 35). Azóta több munkacsoport is vizsgálta a *CEBPA* mutáció előfordulását és a csírvonali komponens meglétét AML-ben. Pabst és munkacsoportja 187 AML-ben szenvedő beteget vizsgálva 18 betegben talált *CEBPA* mutációt. 2 esetben csírvonali N-terminális és szomatikus C-terminális mutáció eredményezte a biállélikus *CEBPA* mutáció kialakulását, felvetve a

gondolatot, hogy a betegség patogenezise során az örökletes komponens mellett a leukemogenezis során jelenik meg a másik allél mutációja, és a *CEBPA* mutációt hordozó esetek akár 11%-a familiáris eredetű lehet (89). Tawana és munkatársai egy nemzetközi kollaboráció kapcsán 10 családot azonosított, ahol csíravonali *CEBPA* mutáció állt a családon belül halmozódó AML háttérben. Egy esetben a betegség relapszusakor eltérő C-terminális mutációt azonosítottak, mely arra utal, hogy a betegség két stádiumát két független sejtklón hozta létre (36). Mindezek alapján a 2016-os klasszifikációban megjelenő, AML a *CEBPA* gén mutációjával egy autoszomális domináns öröklődést mutató monogénes kórkép, mely 100%-os penetranciával hozza létre a malignus fenotípust.

A *CEBPA* mutációt hordozó sporadikus és familiáris AML jellegzetesen FAB M1 és M2 morfológiával társul, diszplasztikus vonások nélkül, az esetek egy részében aberráns CD7 expresszióval (37). A sporadikus dm*CEBPA* AML-ben klinikailag jellemző a fiatal életkor, az egyéb altípusokhoz hasonlítva magasabb fehérvérsejt szám és a kedvezőbb kórlefordulás (38). A *CEBPA* gén mutációját hordozó familiáris AML patológiai és klinikai sajátosságai nem különböznek a sporadikus formától, a betegség kemoterápia szenzitív, azonban relapszus esetén a kemoterápia szenzitivitás és a teljes túlélés magasabb, mint a sporadikus dm*CEBPA* AML-ben. Ennek magyarázata a fenti biklonális teória, mely a relapszust inkább második de-novo AML-nek tekinti (36). A *CEBPA* mutációt hordozó familiáris AML mai felfogás szerinti egyetlen definitív gyógyítási lehetősége az őssejt-transzplantáció. A betegség karakterisztikájából fakadóan a genetikai vizsgálat és így az örökletesség felderítése jelen betegség esetében az AML diagnózisa után történik meg. Tekintetbe véve az őssejt-átültetés és a tünetmentes hordozók követésének szabályait, a csíravonali *CEBPA* mutációt hordozó AML-ben szenvedő betegek valamennyi egyenes ági rokonát genetikai vizsgálatnak kell alávetni. Testvér illetve rokon csak abban az esetben jöhet szóba csontvelői őssejt donorforrásnak, ha mutációhordozó státusz előzetesen kizárásra került(39).

II.5.2.2 AML a DDX41 gén mutációjával.

A *DDX41* gén (DEAD box protein 41) mutációja az egyik legfrissebben felfedezett genetikai eltérés familiáris MDS/AML háttérben (17, 18). A géntermék egy evolúciósan erősen konzervált Asp-Glu-Ala-Asp motívumot tartalmazó, vélhetően RNS helikáz fehérje (4. ábra). A sejtbiológiai funkciója az RNS molekula érésében, másodlagos struktúrájának kialakításában, splicing-jában és a riboszóma RNS komplex kialakításában van (40). Ismereteink szerint az RNS helikázok mutációs érintettsége sporadikus MDS-ben és AML-ben alacsony (17). Familiáris halmozódást mutató MDS/AML háttérben először 2015-ben került leírásra. Polprasert és munkacsoportja az általuk vizsgált 7 családban, melyben több generációban előfordult MDS/AML, találta meg a *DDX41* gén 3 különféle mutációját. Vizsgálataikat kiterjesztve 1034 sporadikus MDS/AML-re 8 további csírvonali *DDX41* mutációt azonosítottak. A csírvonali mutációt hordozó esetek mintegy felében primer, illetve MDS talaján kialakuló AML jelent meg, míg a többi esetben MDS. 7 esetben találtak komplex citogenetikai eltéréseket, a betegek átlagéletkora 67 év volt. A betegség lefolyása a 19 csírvonali *DDX41* mutációt hordozó betegben kedvezőtlennek bizonyult. Érdekességként a 19 betegből 9 esetben az ép allél szomatikus mutációját találták meg a tumorsejtekben, mely alapján a klasszikus Knudson hipotézisnek megfelelően a *DDX41* egy tumorszupresszor gén, melynek csírvonali mutációja haploinsufficienciához, genomiális instabilitáshoz és az ép allél mutációjához vezet. (17).



4. ábra: A DDX41 fehérje vázlatos szerkezete és a mutációinak elhelyezkedése. DBD/ATPB: Dead-Boksz domén/ ATP kötő domén, Helicase: RNS helikáz domén, ZnF: cinkujj motívumot tartalmazó domén

2016-ban Lewinsohn és munkacsoportja 9 családot azonosított csírvonali *DDX41* mutációval, melynek során 5 esetben új típusú mutációt írtak le. A családok között változatos karakterisztikájú MDS/AML jelent meg, illetve egy esetben familiáris folliculáris limfóma volt azonosítható. Tanulmányukban felvetették, hogy a különböző *DDX41* mutációk típusa befolyásolja a betegség viselkedését. Két esetben ugyanis, ahol az általuk újonnan azonosított, a helikáz domént érintő mutációt találtak, heveny lefolyású, fiatalabb életkorban kialakuló MDS/AML-t láttak. A vizsgált betegekben az első fenotípus az MDS megjelenése volt, nem előzte meg a betegség kialakulását perifériás vérvérvétel (41).

II.5.3. Myeloid tumorok megelőző vérlemezke funkciózavarral

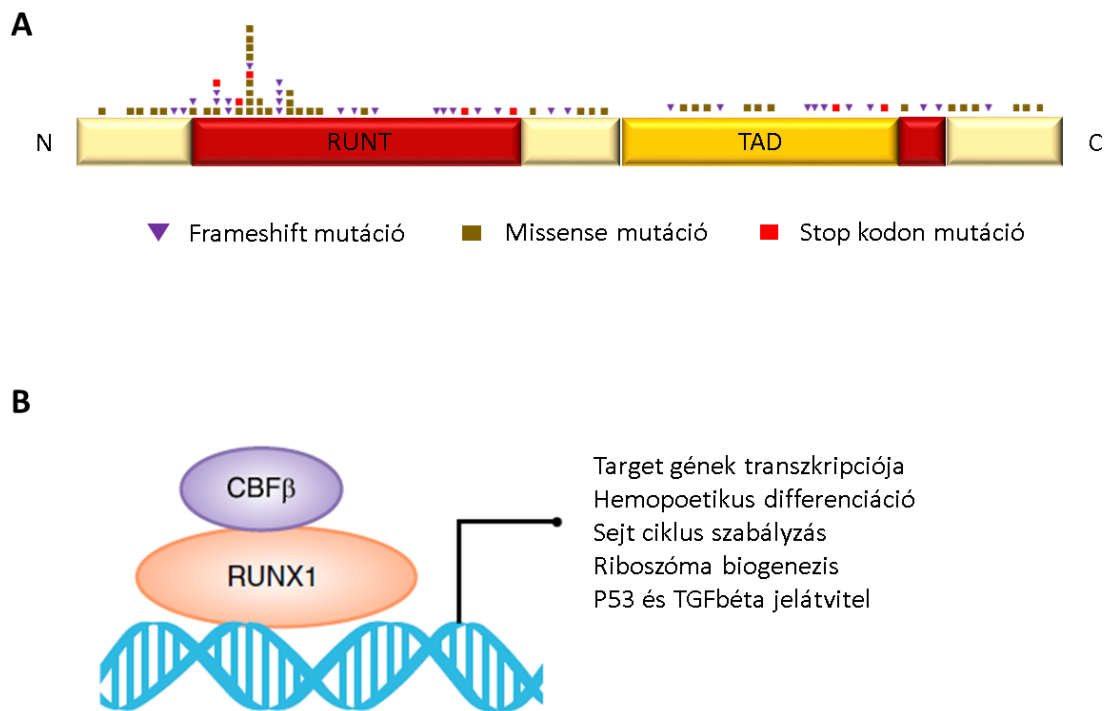
II.5.3.1. AML/MDS a *RUNX1* gén mutációjával

A legrégebben felismert örökletes hematológiai kórkép a familiáris vérlemezke funkciózavar, fokozott MDS/AML rizikóval (az angol nyelvű irodalomból átvéve: FPD-AML).

Luddy és munkacsoportja írta le 1978-ban a „fatális kimenetelű myeloproliferatív kórképet” mely trombocitopéniával járt együtt (42). Dowton és munkacsoportja alapos és mélyreható kutatással feltárt egy családfát, melyben több generáción keresztül visszatérő vérzékenységi zavarok és hematológiai daganatok fordultak elő (9). Egy évtized múltán sikerült azonosítani ebben a családban kapcsoltsági analízissel a 21-es kromoszóma hosszú kar 22-es régiójának érintettségét (43). Végül pedig Song és munkacsoportja azonosította a fenti kromoszóma régióban elhelyezkedő *RUNX1* kandidáns gént a szindróma hátterében (11).

A *RUNX1* gén a core binding factor (CBF) heterodimér képző transzkripciós faktor komplex alfa alegységét kódolja. Ez a transzkripciós komplex felelős számos gén programozott átíródásáért, mely a hemopoézist irányítja. Különleges szerepet tölt be a megakariocyták érésében, így a vérlemezkék számának és funkciójának fenntartásában (44). Sporadikus AML-ben és MDS-ben is gyakran érintett gén, míg az előbbiben transzlokáció kapcsán, az utóbbi kórképben főleg pontmutációk révén (45).

A legrégebben felfedezett familiáris szindrómaként az irodalma is igen széleskörű, legalább 30 jól dokumentált családot ismerünk napjainkig (46-57). Az eddig azonosított mutációk döntően a DNS kötéséért és a dimerizációért felelős Runt doménben helyezkednek el, a mutációk típusa viszont igen szerteágazó. Pontmutáció, in/del típusú mutáció, stop kodont eredményező mutáció és nagyobb génszakaszt érintő deléció is előfordul az eddig megismert esetekben (5. ábra) (48).



5. ábra: **A:** a RUNX1 fehérje vázlatos szerkezete és a mutációinak elhelyezkedése. RUNT: az igen konzervált, DNS kötő és dimerizációért felelős Runt domén. TAD: transzaktivációs domén. **B:** a RUNX1 a CBF (core binding faktor) transzkripció komplex részeként a DNS-hez kötődve számos sejtszintű programot aktivál (forrás: Soeed et al, Blood 2017).

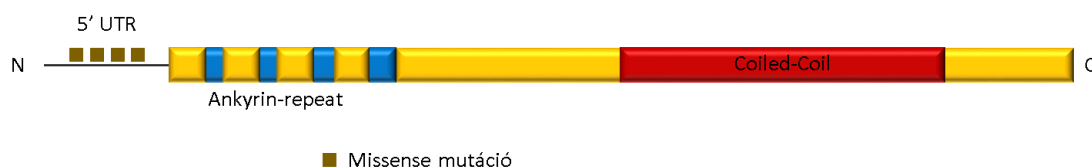
A *RUNX1* mutációt hordozó betegekben változatos súlyosságú enyhe, vagy szubklinikai vérszámzavar, változatos vérlemezke számbeli és szerkezeti eltérések fordulnak elő. A mutációt hordozó egyének vérlemezke száma általában 80-100 G/L közötti és gyakran fordulnak elő vérlemezke-aggregációs zavarok is (58). Az irodalomban fellelhető családokban igen változatos myeloid és limfoid kórképek fordultak elő, sőt adott családon belül akár több eltérő hematológiai malignitás is

megjelenhetett, mely egyfelől felveti a különböző *RUNXI* mutációk szerepét, másfelől az addicionális kooperáló mutációk fenotípus módosító hatását (56, 59). A leggyakrabban megfigyelt malignus fenotípus az MDS, illetve ennek talaján kialakult szekunder AML (50, 57). A *RUNXI* génmutációval karakterizálható FPD-AML egyik legkarakterisztikusabb ismertetője, hogy a malignus fenotípus igen változatos penetranciával jelenik meg egy adott családon belül is. Ennek háttérében feltételezett jelenség, hogy a *RUNXI* mutációja önmagában nem elég malignitás kialakításához, a környezetet azonban megteremti újabb kooperáló mutációk megjelenéséhez, melyek végül kialakíthatják a malignus fenotípust. Jelen dolgozat egyik kiemelt témája az FPD-AML háttérében álló másodlagos genetikai eltérések ismertetése ezért ezzel külön fejezetben foglalkozunk.

Klinikailag a változatos lefolyás, az enyhe vagy sokszor szubklinikai vérszavarok miatt a szindróma általában az MDS/AML megjelenése, familiáris halmozódása miatt került felfedezésre. Mivel nem egyféle myeloid betegséget alakít ki a *RUNXI* csíravonali mutációja, kezelése a betegség formájától függ. Általános érvényű, hogy MDS-ben illetve szekunder AML-ben csak a csontvelő-transzplantáció jelenthet definitív megoldást, ám a szóba jövő családon belüli donorok előzetes genetikai szűrése elengedhetetlen. A tünetmentes mutáció hordozó egyének kérdésköre egy speciális probléma jelen esetben, mivel az irodalmi adatok alapján változatos valószínűséggel számíthatunk a malignus fenotípus megjelenésére. Javasolt a mutációt hordozó, klinikailag tünetmentes egyéneknél is a csontvelő biopszia elvégzése (30). Latger-Cannard és munkatársai megfigyelései alapján már ezen egyéneknél is megfigyelhetők finom diszplasztikus eltérések a megakariocita vonalon (58). A hordozók szoros hematológiai kontrollja és vérkép eltérések esetén a csontvelő biopszia ismétlése javasolt.

II.5.3.2. AML/MDS az ANKRD26 gén mutációjával

Az *ANKRD26* mutációit 2011-ben azonosították, a 2.-es típusú autoszomális domináns öröklődésű familiáris trombocitopénia (THC2) háttérében (13). Az *ANKRD26* által kódolt fehérje egy ankyrin repeat domént tartalmaz, mely géncsalád tagjai fehérje-fehérje interakciókban játszanak szerepet. Az *ANKRD26* fehérje a RUNX1 és FLI1 („friend leukemia integration 1 transcription factor”) transzkripciós faktorokat képes kötni, melyek szabályozzák a megakariocita formációt. A Pipucci és munkacsoportja által felfedezett 5' UTR régióba eső mutációk eredményeképpen a fehérje elveszíti a képességét a RUNX1 és FLI1 fehérjék megkötésére, mely a megakariopoézis károsodásához vezet (6. ábra). A gén fokozott expressziója továbbá fokozott thrombopoetin receptor (TPO-MPL) aktivációhoz vezet, mely a vérlemezkék kialakulását gátolja (60).



6. ábra: ANKRD26 fehérje vázlatos szerkezete és a nem transzlálódó régióba eső mutációk elhelyezkedése. UTR: nem transzlálódó génrégió, az eddig leírt mutációk nem a gén kódoló régiójában, hanem a valószínűsíthetően szabályozó szerepet betöltő nem transzlálódó régióban helyezkednek el. Ankyrin-repeat: ismétlődő szerkezetű domén, mely a szupercsaládra jellemző. Coiled-Coil: alfa hélixek által létrehozott strukturális motívum a fehérjében.

A 2-es típusú familiáris trombocitopénia csökkent vérlemezke számmal, megtartott vérlemezke térfogattal és emelkedett TPO szinttel, megnyúlt riztacetin idővel járó kórkép. A csontvelői mintavétel során általában diszplasztikus vonások figyelhetők meg a megakariocita vonalon (61). A klinikai tüneteket a változatos súlyosságú vérszavar dominálja. A kórkép megjelenésének indoka a 2016-os WHO klasszifikációban az, hogy ezen tüneteken és jellemzőkön felül a betegekben fokozott AML rizikó áll fenn, habár kisebb pentranciával mint FPD-AML-ben (62). A THC2-ben szenvedő betegek hematológiai követése és gondozása fokozottan indokolt, a

vérzékenységen túl a vérkép monitorozásán át, várva egy esetleges malignitás megjelenésére.

II.5.3.3. AML/MDS az *ETV6* gén mutációjával.

A familiáris vérlemezke funkciózavar talaján kialakuló hematológiai daganatok csoportjának harmadik, legfrissebben felfedezett tagja az ETS szupercsaládba tartozó transzkripciós faktor *ETV6*. A gén terméke két funkcionális alegysége a fehérje-fehérje interakcióért felelős PNT domén és a C-terminális DNS kötő domén (7. ábra) (63). A transzkripciós faktor működésének szerepe van a hemopoézisben és a prenatális vaszkulogenezisben. A felnőtt csontvelőben a megakariocita sejtvonal érésében játszik szerepet, egyéb sejtvonalakon funkciója még ismeretlen (64). 2015-ben több munkacsoport is azonosította csírvonali mutációit olyan családokban, ahol halmozottan jelent meg vérlemezkeszám-eltérés, funkciózavar, változatos fokú vérzékenység és különféle malignus tumorok, közöttük jellemzően leukémiák és szolid tumorok (14, 65). További munkacsoportok azonosították a gén mutációit akut limfoid leukémia (ALL) és változatos vérzékenységi zavarok családi halmozódásának hátterében (66, 67) is. Moriyama és munkatársai vizsgálták az *ETV6* mutáció előfordulását egy kiterjesztett 4406 beteget tartalmazó ALL betegcsoporton, és 35 betegben találták meg ennek csírvonali formáját (66). Mindezek alapján az *ETV6* csírvonali mutációja változatos klinikumú vérzékenységet hoz létre és változatos hematológiai és nem hematológiai malignitásra hajlamosít.



7. ábra: Az *ETV6* fehérje vázlatos szerkezete és az eddig megismert mutációk elhelyezkedése. PNT: N-terminal pointed domén: fehérje-fehérje interakciókban résztvevő alegység. ETS: DNS felismerő és megkötő alegység.

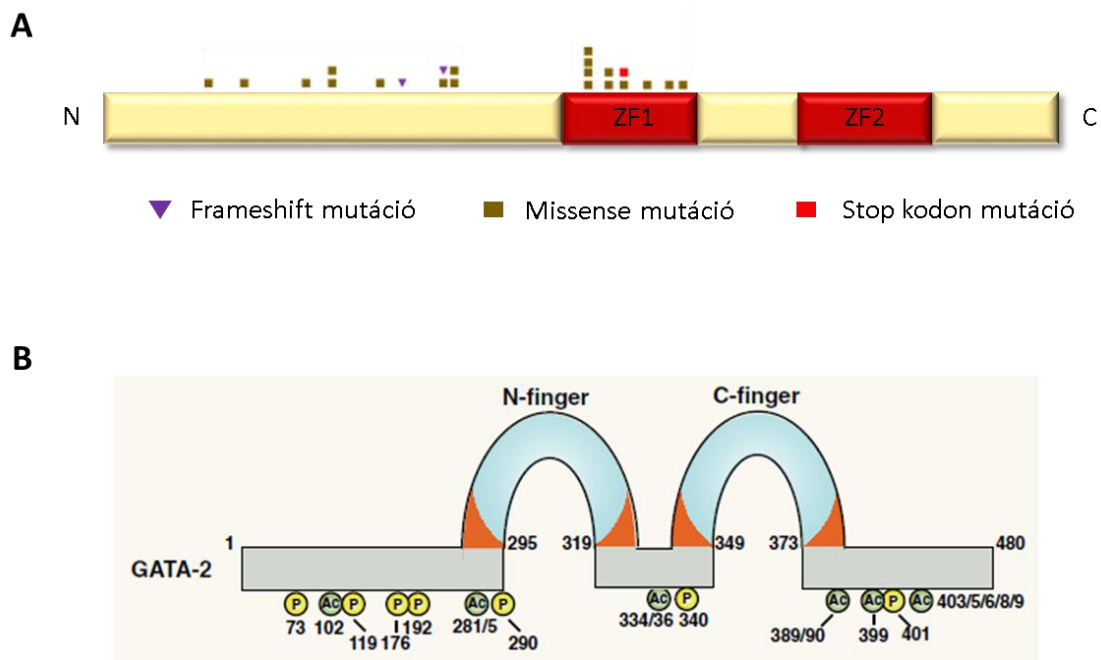
II.5.4. Myeloid tumorok citopéniával/csontvelő kimerüléssel

II.5.4.1. AML/MDS a GATA2 gén mutációjával

A myeloid daganatok új WHO klasszifikációjának egyik legszínesebb kórkép „csoportja” a *GATA2* csíravonali mutációval jellemezhető familiáris MDS/AML. A gén mutációinak felfedezése szimultán történt meg több, részben immunológiai, részben hematológiai kórképben. A gyermek/fiatalfelnőtt korban kialakuló familiáris MDS/AML, a monoMAC-szindróma, DCML-deficiencia és az Emberger-szindróma ritka, autoszomális domináns öröklődésű kórképek, melyek háttérében a *GATA2* gén csíravonali mutációja áll (68-71). A monoMAC-szindróma (monocytózis, *Mycobacterium avium* fertőzéssel), és a DCML-deficiencia (dendritikus sejt, monocita, limfocita hiány) színes immunológiai kórképek, melyekben az adott sejtfeleségek hiánya, rekuráló atípusos infekciók, visszatérő anogenitális szemölcsök, *Mycobacterium* fertőzések, illetve az Emberger-szindrómában generalizált limfödéma jellemző. Ezen különleges tünetek és szindrómák fokozott MDS/AML rizikóval társulnak (72). A malignus fenotípus megjelenhet azonban olyan formában is, melyet nem előz meg jellegzetes immunológiai tünetegyüttes (ún. „tisza” familiáris AML a *GATA2* gén mutációjával) (73, 74). A közelmúltban írták le továbbá a *GATA2* gén csíravonali mutációját kongenitális neutropénia és aplasztikus anémia egyes eseteinek háttérében, tovább bővítve a színes és változatos kórcsoportot (75, 76).

A *GATA2* gén egy cinkujjas DNS kötő motívumot tartalmazó transzkripció faktor, mely a hemopoézis több szakaszában is szerepet játszik a sejtekérésében, valamint a nyirokérhálózat kialakulásában (77). A hemopoetikus őssejt szintjén, a felnőtt csontvelőben is, szerepet játszik a folyamatos önmegújító képesség fenntartásában, az érett sejtekben pedig fokozott expressziója figyelhető meg a megakariocitákban és a monocitákban (72). Az eddig leírt csíravonali nonszenz és frameshift mutációk főként a cinkujj domént kódoló génrégiót érintik (8. ábra) (69). Spinner és munkacsoportja 57 *GATA2* mutációt hordozó beteg klinikumát tekintette át, 32%-ban találtak rekuráló vírus fertőzéseket, 28%-ban atípusos *Mycobacterium* fertőzést, MDS/AML pedig 21%-ban fordult elő, döntően az első két életévben. A betegek többségében a tüneteket megelőzően kimutatható volt monocitopénia, T és NK

limfocitopénia. A malignus fenotípus megjelenésének valószínűsége gyermek illetve fiatal felnőttkorban 70% (78). A csírvonali *GATA2* mutációt hordozó betegekben kialakuló csontvelői eltérések a malignitás megjelenésekor a hipocelluláris vérképzés, illetve a megakariocita sejtvonalat érintő diszplasztikus vonások. A progresszióhoz társuló leggyakoribb szekunder genetikai eltérés a 7-es kromoszóma monoszómiája, illetve az *ASXL1* gén mutációja voltak (73, 75, 78).



8. ábra: **A:** A *GATA2* fehérje vázlatos szerkezete és az eddig megismert mutációk leggyakoribb elhelyezkedése. ZF: cinkujj domén. **B:** A cinkujj domének térbeli elrendeződése a fehérjében, valamint a leggyakoribb posztranzlációs foszforilációs és acetilációs pontok melyek a fehérje működését módosítják (Forrás: Katsumura et al, Blood 2017).

A fenti tanulmányokat megerősítve Wlodarski és munkacsoportja 456 MDS-ben szenvedő gyermek retrospektíven összegyűjtött mintáiból vizsgálta a *GATA2* mutációk előfordulását, amit az összes eset 7%-ban találtak meg. Az esetek többségében nem találtak familiáris halmozódást, ellenben az esetek felében monoMAC-szindróma vagy DCML-deficiencia előfordult az anamnézisben. A *GATA2* mutációt hordozó MDS-ben 70%-ban volt jelen a tumorsejtekben a 7-es kromoszóma monoszómiája (15). A munkacsoport adatai alapján a *GATA2* mutációt hordozó gyermekkori MDS-ben magasabb progressziós ráta, és kedvezőtlenebb a kórlefolyás mint a sporadikus

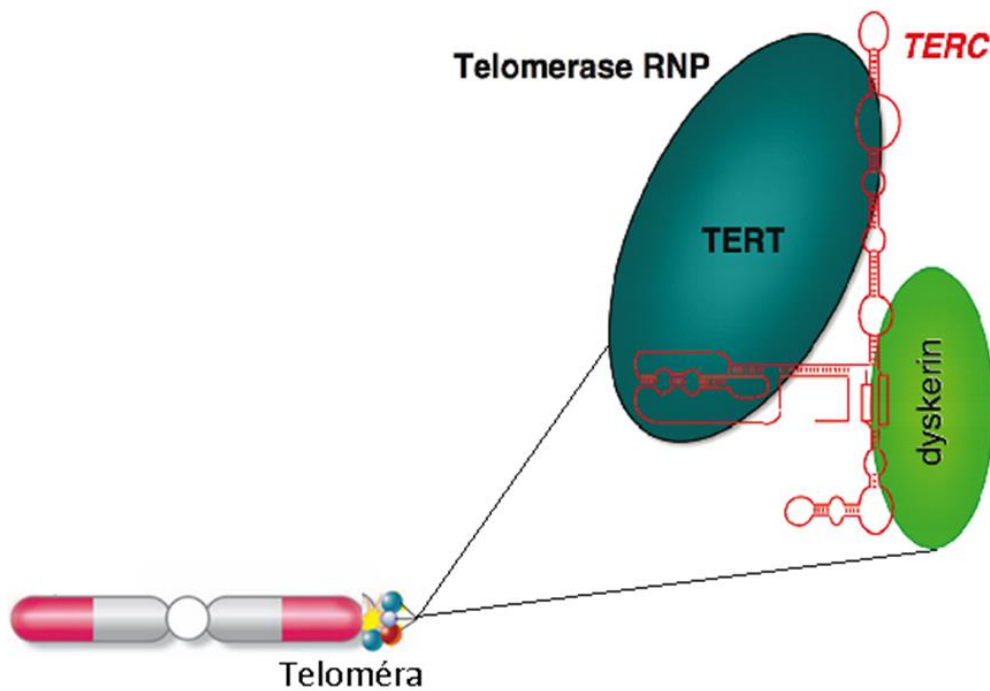
esetekben. Ezek alapján, mivel a gyermekkori csontvelő-transzplantáció kimenetele - köszönhetően a korszerű szupportációs eljárásoknak - világszerte egyre kedvezőbb, a minél korábbi autológ őssejt-átültetés javasolt a családon belüli szóba jövő donorok előzetes szűrését követően (15).

II.5.4.2. AML/MDS csontvelő kimerüléssel (*TERT/TERC* gének mutációja)

A telomer régiók a kromoszómák végein elhelyezkedő DNS-fehérje komplexek, melyek a DNS specifikus TTAGGG ismétlődéseikhez kapcsolódó fehérjékből állnak (9. ábra). A DNS átíródáskor a telomérák egyre rövidülnek, majd egy kritikus hosszt elérve aktiválják a p53 függő apoptózis jelátvitelt, mely a sejt programozott halálához vezet. A telomeráz fehérjekomplex a TERT, TERC, Dyskerin, GAR1, NHP2, NOP10 fehérjékből álló egység, mely egy RNS templátot használva „visszaírja” a telomér végeket, így fenntartva a folyamatos sejtosztódás lehetőségét (16). A hemopoetikus sejtekben és a legtöbb daganatféleségben a telomeráz komplex konstitutívan aktív (79). A telomeráz komplex tagjainak mutációi jellegzetes örökletes kórképeket hoznak létre, mint például a dyskeratosis kongenita (DC), melynek autoszomális domináns, recesszív és X-hez kötött formája is létezik a telomeráz biológiát érintő különböző mutációi által létrehozva (a felsorolástól jelen tanulmányban eltekintünk) (16, 80). A komplex tagjainak leggyakrabban érintett génjei a *TERC* (RNS templát) és *TERT* (reverz transzkriptáz) gének, melyek a klasszikus DC fenotípustól eltérően (fiatal korban megjelenő bőrtünetek, nyálkahártya léziók, körömdisztrófia, pánцитopénia, tüdőfibrózis jellemzően a *DKC1* és *TINF2* gének mutációjával) eltérően létrehozhatnak későbbi életkorban jelentkező aplasztikus anémiát és „tisztá” familiáris MDS/AML-t is, heterozigóta érintettség esetén (81, 82).

A *TERC* vagy *TERT* mutációt hordozó betegek változatos életkorban és penetranciával lehetnek érintettek. A patológiai jellemzők a változatos súlyosságú citopénia, leggyakrabban anémia ill. trombocitopénia, makrocitózis, hipocelluláris vérképzés, vagy aplasztikus csontvelő. Érdekes klinikai megfigyelés, hogy az érintett családokban a betegség lefolyása generációnként egyre súlyosabb, ami a telomerhossz progresszív csökkenésével magyarázható (83). Ezen betegségcsoport különleges klinikai

figyelmet igényel, hiszen a betegség biológiájából fakadóan gyakoribbak azok a mellékhatások, melyek az őssejt-transzplantációnak súlyos szövődményei lehetnek (tüdőfibrózis, venoocclusiv betegség) (84).



9. ábra: A TERT és TERC fehérjék működése: a dyskerin komplexszel együttesen védik a DNS végén elhelyezkedő telomérákat, melyek a DNS osztódása kapcsán rövidülnek. A telomeráz komplex mutáció kapcsán történő károsodása a replikáció során a teloméra végek rövidüléséhez és a programozott sejthalál beindulásához vezet (Források: Bessler et al, *Haematologica* 2007, valamint Armanios et al, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2009).

II.6. Familiáris myeloproliferatív kórképek

A myeloproliferatív kórképek mára (MPN) egy genetikailag teljesen megismert és jól kategorizálható betegségecsoporttá váltak. Klasszikusan Philadelphia kromoszóma (Ph) pozitív és negatív kórképekre oszthatjuk fel a betegségecsoportot (5. táblázat).

5. Táblázat: Myeloproliferatív kórképek

Altípus	Genetikai eltérés
Krónikus myeloid leukémia (CML)	BCR-ABL
Policitémia vera (PV)	JAK2
Primer myelofibrózis (PMF)	JAK2, CALR, MPL
Esszenciális thrombocitémia (ET)	JAK2, CALR, MPL
Masztocitózis	KIT
MPN nem klasszifikálható (MPN-NOS)	-

A Ph negatív kórképekben leggyakrabban előforduló mutációk a *JAK2*, *CALR* és *MPL* gének mutációi, melyek a JAK-STAT jelátvitel fokozott aktivációján keresztül a myeloid sejtvonal túlbujánzását eredményezik (6). Ezen kórképek mintegy 10%-ában megfigyelhető a familiáris halmozódás a fenti gének csíravonali mutációi nélkül (85). A familiárisan halmozódó myeloproliferatív neoplazmákban ugyanazon szomatikus mutációk fordulnak elő, mint a sporadikus formákban, autoszomális öröklésmentet mutatnak, alacsony penetranciával, a csíravonali hajlamosító tényező azonban nem ismert (85). Felvetődött ezen esetek háttérében az ún. *JAK2* 46/1 haplotípus elnevezésű SNP („single nucleotide polymorphism”) összetétel, mely a feltételezések szerint hajlamosít a *JAK2* V617F mutáció kialakulására. A *JAK2* génben elhelyezkedő 4 db SNP-ből (single nucleotide polymorphism) álló ún. GGCC kombináció (rs3780367, rs10974944, rs12343867, rs1159782) jelenléte ugyanis fokozott rizikóval jár a *JAK2* V617F mutáció megjelenésére és az MPN kialakulására (86). Megfigyelték továbbá a *TERT* gén egy polimorfizmusának gyakori társulását MPN kialakulásával, bár ezen polimorfizmusok nem magyarázzák az összes familiáris halmozódást (87). A JAK-STAT jelátvitelben szerepet játszó egyéb fehérjék génjeinek mutációi is ismertek az MPN irodalmában. Három munkacsoport egymástól függetlenül fedezte fel és írta le a *JAK2* jelátvitel egyik

negatív regulátorának, az *SH2B3* (*LNK*-ként is ismert) génnek mutációit Ph negatív, *JAK2* V617F mutációt nem hordozó MPN-ben, mely az esetek mintegy 6%-ban fordulhat elő (88-90). Koren-Michowitz és munkacsoportja kimutatta, hogy a mutációk funkcióvesztést eredményeznek és a JAK-STAT jelátvitel túlaktiválódásához vezetnek (91).

Saliba és munkacsoportja 2015-ben azonosította az első olyan csíravonali eltérést, mely az általuk vizsgált családok esetében a familiárisan halmozódó különböző MPN típusok hátterében állt. A szerzők 4 családot azonosítottak, ahol nagy penetranciával jelent meg az ET fenotípusa, illetve szekunder AML. A vizsgált betegek tumormintáiban különböző szomatikus mutációkat azonosítottak (*JAK2*, *CALR* etc.) azonban a vizsgált betegekben, valamennyi esetben a 14q32.2 kromoszóma régió mintegy 700 bázispárt érintő tandem duplikációját figyelték meg. A régióban elhelyezkedő gének közül kettő, a *GSKIP* illetve az *ATG2B* expresszált myeloid tumorokban. Sejt kísérletekben kimutatták, hogy fokozott TPO receptor szenzitivitással jár együtt és a *JAK2*, *CALR*, *MPL* mutációt hordozó sejtek klonális dominanciájával társul (92).

II.7. Familiáris aplasztikus anémia az *SRP72* gén mutációjával.

Familiárisan halmozódó aplasztikus anémia (AA) és MDS hátterében 2012-ben fedezték fel az *SRP72* gén mutációját. A gén által kódolt fehérje egy protein transzportban résztvevő komplex része, mely a fehérjék endoplazmás retikulumba történő transzportálásában vesz részt. A kórkép irodalma ma még kevésbé ismert, ez idáig mindössze két család esetében sikerült igazolni csíravonali mutációját familiáris AA/MDS hátterében (20).

II.8. Szekunder genetikai eltérések megismerésének története FPD-AML-ben

Jelen dolgozat egyik fő témája a korábban részletezett FPD-AML háttérben álló új, kooperáló mechanizmusok leírása egy modell család segítségével. Mint ismeretes a *RUNX1* gén csíravonali mutációjával jellemezhető FPD-AML-ben a malignus fenotípus igen változatos (~40%) penetranciával jelenik meg. Míg egyes egyéneknél szubklinikai vérelemzke funkciózavart okoz, addig más esetekben nagy penetranciával AML megjelenését okozza, előzetes tünetek nélkül (58). Ezen jelentős klinikai heterogenitás már régóta felvetette a lehetőségét, hogy a betegség kialakításában szerepe van az eltérő *RUNX1* mutáció típusoknak, illetve különböző kooperáló genetikai mechanizmusoknak. Ezen hipotézist látszik alátámasztani az a felfedezés, mely szerint a mutáns *RUNX1* fehérje egyes esetekben csak funkciókiesés miatt károsodott, addig más esetekben domináns negatív hatást tud kifejteni a vad allélról átíródó fehérjére (58, 59).

Az FPD-AML-ben kooperáló mutációk és mechanizmusok irodalma is szerteágazó és a betegség biológiájának egyre részletesebb képe bontakozik ki előttünk, de a szekunder eltérésekről még kevés információ áll rendelkezésre. Preudhomme és munkacsoportja kimutatta, hogy a progresszió háttérben álló leggyakoribb eltérés a vad típusú *RUNX1* allél érintettsége, bár ez nem minden esetben található meg a háttérben (57). Antony-Debre és munkacsoportja 15 családot vizsgált, ahol 10 betegben alakult ki AML melyekben minden esetben érintett volt a vad *RUNX1* allél is, vagy a 21-es triszómia kapcsán a mutáns *RUNX1* allél duplikációja volt megfigyelhető (93).

Habár a kooperáló mechanizmusok megismerése még korántsem teljes, így is kezd kibontakozni egy igen érdekes biológiai viselkedésű betegségcsoport. A mechanizmusok megismerése nem csak ennek az immáron a WHO klasszifikációban is megjelenő betegségnek a megértéséhez, hanem a sporadikus leukémia patomechanizmusainak tisztázásához is elvezethet.

Hazánkban a familiáris hematólógiai kórképek felismerése és genetikai jellemzése napjainkig még nem történt meg. Munkacsoportunk ezért célul tűzte ki myeloid hematólógiai daganatok halmozódását mutató családok dokumentálását és részletes genetikai jellemzését, valamint e területtel kapcsolatos ismeretek és genetikai vizsgálatok meghonosítását Magyarországon.

III. Célkitűzések

- Munkacsoportunk célul tűzte ki a familiáris myeloid hematológiai daganatok előfordulásának vizsgálatát Magyarországon,
- Az újonnan azonosított esetek háttérében feltehetően álló öröklődő genetikai eltérések vizsgálatát,
- Valamint, egy modellként használt FPD-AML családban azonosítani kívántuk a nagy penetranciával megjelenő malignus fenotípus háttérében álló szekunder, kooperáló genetikai eltéréseket.

IV. Módszer

IV.1. Azonosított familiáris myeloid esetek

Munkánk során négy olyan családot azonosítottunk, ahol több mint egy elsőfokú rokonban fordult elő myeloid malignitás. Ezen családok genetikai hátterét vizsgáltuk az ismert öröklődő variánsok vonatkozásában.

I. család: Az első általunk azonosított és vizsgált család (**I.**) két gyermekét követték vérlemezkeszám-csökkenés miatt. Szimultán észlelték mindkettőjükben myelodiszpláziás szindróma (MDS) kialakulását, 14 valamint 10 éves korban. Jelenleg szoros megfigyelés alatt állnak.

II. család: Az általunk azonosított és vizsgált második családnál (**II.**) három testvér érintett MDS által. Az első gyermeket 18 éves korában páncitopénia, anémia miatt vizsgálták. Csontvelő biopsziája hypocelluláris csontvelőt igazol, megaloblasztoid vörösvértest-képzéssel. Idegen donoros őssejt transzplantáción esett át, betegsége jelenleg követés alatt áll. A leánygyermek 24 éves testvérét donorkeresés közben vizsgálták. Klinikailag tünetmentes volt, vérsejtszámai normál tartományban voltak, de a csontvelő vizsgálata finom diszplasztikus eltéréseket mutatott. A család legfiatalabb, 15 éves gyermeke nyirokcsomó-megnagyobbodás miatt került klinikailag figyelembe, a terhelt családi anamnézis miatt, bár vérképeltérése nem volt, csontvelő-biopsziát végeztek és esetében is korai diszplasztikus eltéréseket figyeltek meg.

III. család: A harmadik vizsgált családban (**III.**) akut myeloid leukémia (AML) halmozódása figyelhető meg több generáción keresztül. A klinikai figyelembe került beteget 82 éves korában diagnosztizálták AML-lel, mely citogenetikai eltéréseket nem hordozott, szövettanilag FAB M6 kategóriába volt sorolható. Idősebb férfitestvérét 53 éves korában, fiatalabb nőtestvérét pedig 57 éves korában diagnosztizálták AML-lel. Édesanyjuk 64 éves korában szintén AML-ben szenvedett.

IV. család: A negyedik vizsgált családban (**IV.**) 4 gyermekben alakult ki MDS vagy AML. A gyermekek közül egy dizigóta ikerpár mindkét tagja igen heveny lefolyású MDS-ből transzformált AML-ben hunyt el 5 éves korukban. Tíz év elteltével testvérüknél, a család legfiatalabb gyermekénél, akit trombocitopénia miatt követtek szintén heveny lefolyású AML jelentkezett (5 éves korában), idegendonoros őssejt-

transzplantáción esett át, majd betegsége relabált, ezután köldökzsínórvér őssejt transzplantáción esett át. Jelenleg remisszióban van. Nővére, a család harmadik gyermeke (jelenleg 17 éves) a donorszűrés közben esett át csontvelőbiopszián, mintáiban diszplastikus eltérések voltak láthatóak, jelenleg szorosan monitorozzák.

IV.2. Familiáris AML/MDS háttérben álló mutációk analízise

IV.2.1. DNS izolálás

Kiindulási lépésként az érintett betegek perifériás véréből, vagy csontvelői mintáiból DNS-t izoláltunk. A DNS izolálásához teljes perifériás vér- vagy csontvelői mintákból indultunk ki, nem szeparáltunk sejtfrakciókat. Az izoláláshoz a High Pure PCR Template Preparation Kit-et (Roche, Basel, Switzerland) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az elúciós térfogat 25-50 µl volt, a kiindulási sejttömegetől függően. A DNS mintákat a további felhasználásig + 4 °C hőmérsékleten tároltuk.

IV.2.2. Familiáris MDS/AML gének PCR amplifikációja

A familiáris MDS/AML-re hajlamosító mutációk szűrése kétirányú Sanger szekvenálással történt. A PCR amplifikációhoz a primereket a Primer 3 Plus program segítségével terveztük (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). A *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *DDX41*, *TERT* és *TERC* gének teljes kódoló régiójára terveztünk primereket, az *SRP72* és *ANKRD26* esetében mutációs „forró pontokra” terveztük az oligonukleotidokat. A primerek listája és szekvenciája a 6. táblázatban látható.

6. táblázat: a mutációk szűréséhez használt primerek listája

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')
CEBPA	E 1F	TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC	TERT	E 12F	GGCAGGAGGCTCTTTGGAGC
CEBPA	E 1R	AGCTGCTTGGCTTCATCCTCCT	TERT	E 12R	CTGCAAATCCAGAAACAGGCTGT
CEBPA	E 2F	GCTGGTGAATCAAGCAGGAGC	TERT	E 13F	GTTCTCTTTCTTGTTCATCTG
CEBPA	E 2R	CCGCCACTCGCGCGGAGTCCG	TERT	E 13R	GGGTACAGAGGTGAGCAGAGC
CEBPA	E 3F	GGCAGCGCGCTCAAGGGGCTG	TERT	E 14F	GCCCATGCCACACCCACGA
CEBPA	E 3R	CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT	TERT	E 14R	TTCACTCAGTCTCCTGACACAC
RUNX1	E 1F	GGAAAGGGGAACAGTTAAATTT	TERT	E 15F	GAGGGGAGCTGGGCTGGGC
RUNX1	E 1R	TTGGCTGTGGGTGGTGAT	TERT	E 15R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 3F	GCCTGTCTCCACCACCCTCTC	TERT	E 16F	CTAGGAGGGTGGAGGATGC
RUNX1	E 3R	AGCTGCTGTCTGAAGATCCG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 4F	GTGGGTTTGTGCCATGAAACG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 4R	CATCCCTGATGTCTGCATTTGTCC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 5F	CCCAAGGAATCTGAGACATGGTCC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 5R	TGTTCAAGCCACCAACCTCATTC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 6F	GGGGGCCATTCTGCTGAGAGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 6R	GAGCATCAAGGGGAAACCC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 7F	AATCCACCCCACTTTACAT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 7R	CTCAGCTGCAAAGAATGTGT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 8F	TCCGCTCCGTTCTCTTGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
RUNX1	E 8R	GCTTGTCCGCAACAGGAG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E1F	GGGAGAGGAAAGGAAAGTGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 1R	AACAGAGCAACTGCAACAGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 2F	CCATTCCAAGCTTTCATTGTG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 2R	AAAACCACCTCAGAGCTTGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 3F	TTCCAGTGTCTAACTGACAAGA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 3R	GGGGTGTAAAGACCAACCA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 4F	TCCCTTTCCTTTTCTTTCCA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 4R	CACGAAGAAGACCAGCTTATCA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 5F	GTCCTTCCCTCTGCTCCACA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 5R	GATCAGAGGGTGCATGATGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 6F	GCAGAAGCAGTGTGCTGGATT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 6R	GGGCAGACGTAAAAAGCAGA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 7F	GCAGTGCCTTTCTGAGGTT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 7R	GGGTATCCGATAGGCAGGTA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 8F	TGGAATCTTTAAGCTCCTCCA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
ETV6	E 8R	CCTTTTCCACTCTCCTCAGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 1F	TTCTTTCCGCGGCC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 1R	CGAAGGCCAGCAGTTC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/1F	GTGCTCTGCTGAAGGAGCTG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/1R	CGGATGGGTGGGAGTGGCGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/2F	GCGCTGCCACTCAGGCCCGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/2R	GAGGGGCACTGCCTGCTGTTT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/3F	GTTTCTGGAGCTGCTTGGGA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 2/3R	AGCCCTACTGCATTCAGCT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 3F	GGGTGGCTGTGTTCCGGCC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 3R	TGGAGACAGGCATGCTGA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 4F	CTTGTGGCTTCCCGTGAAGCT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 4R	CCCTTCATCTAAGCTGATACCA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 5F	TATGGTGGGTGGGCACTTGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 5R	CTTGACAAAGTACAGCTCAGCG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 6F	TGAGGGCAGAGGTGATGTCTG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 6R	AGACACGACTGCATTCTAGACAC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 7F	CAGGTCCACACGCTCTGATCG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 7R	ATGAGCCAGTGTGATGCCAG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 8F	GAGGGTCTTGGCCACGTGGT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 8R	GCAGGAGAGAGGTGAGCAGAAG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 9F	GTCTACGTCCAGTGCCAGGG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 9R	TCTTCAAGACAGAGCAGTCAAG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 10F	GTTTGACATTCAGTCCCTCGTAG	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 10R	GCAGGACACGGGGGCTCAA	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 11F	AGCATTTAAAGGGTGTCAAGT	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC
TERT	E 11R	GCAGAGGTGGACGCAACGGC	TERT	E 16R	AGGGTGTGGGTGTCTGCTCTC

A PCR amplifikáció az AmpliTaqGold™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) master mixszel történt, 25 µl végtérfogatban. A PCR mix összetétele a 7. táblázatban látható. A PCR amplifikáció valamennyi esetben egy univerzális protokoll alapján 58 °C annellálási hőmérsékleten, 35 cikluson keresztül történt, a 8. táblázatban látható kondíciók szerint. A PCR termékek kimutatása 2% agaróz gélelektroforézissel történt (2,6g agaróz, 125 ml 1x TAE puffer), GelRed (Biotium, Inc. Fremont, CA) fluoreszcens festék felhasználásával. A PCR termékekből emésztéses tisztítással (exonukleáz és alkalikus foszfataz) távolítottuk el a nem inkorporálódott nukleotidokat és primereket az ExoSAP PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, California, U.S) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően (15 perc 37 fok emésztés, 80 fok 15 perc emésztőenzimek inaktiválása).

7. táblázat: a PCR mix összetétele

Komponens	Bemérés
AmpliTaqGold™	12,5 µl
Forward primer (10µl)	1 µl
Reverz primer (10µl)	1 µl
Steril víz	25 µl-ig
DNS-templát	100 ng

8. táblázat: PCR kondíciók

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	95 °C	5 min
Denaturáció	95 °C	30 s
Anelláció	58 °C	30 s
Extenzió	72 °C	30 s
Végső extenzió	72 °C	5 min

35 ciklus

IV.2.3. Familiáris MDS/AML gének Sanger szekvenálása

A PCR termékek szekvenciájának meghatározása kétirányú Sanger szekvenálással történt. A szekvenáláshoz BigDye Terminator Kit 3.1-et használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). A reakció során a didezoxi-nukleotidok (ddNTP) és a dezoxi-nukleotidok (dNTP) versengenek a láncba történő beépülésért. A ddNTP beépülése esetén a reakció terminálódik, a felépült lánc hossza, és a végén elhelyezkedő fluoreszcens festékkel jelzett ddNTP alapján leolvasható a lánc teljes nukleotidszekvenciája. A szekvenálási reakció mix összetétele és a szekvenálás kondíciói a 9.-es és 10.-es táblázatokban láthatóak.

9. táblázat: A szekvenáló reakció összetétele

Komponens	Bemérés
BigDyeT M Terminator v3.1	0,25 µl
BigDyeT M 5X Sequencing Buffer	1,875 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Steril víz	10 µl-ig
Tisztított PCR termék	1 µl

10. táblázat: A szekvenáló reakció hőprofilja

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	95 °C	2 min
Denaturáció	95 °C	30 s
Anelláció	51 °C	15 s
Extenzió	60 °C	4 min

A szekvenálási reakció termékeinek tisztítása, a nem inkorporálódott fluoreszcensen jelölt ddNTP-k eltávolítása a Performa™ DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio, San Jose, CA, USA) oszlop alapú tisztító kit segítségével történt, 10µl desztillált vízzel hígítva, a gyártó utasítása szerint. A tisztított termékhez 20µl Hi-Di Formamide™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) reagenst adtunk, mindösszesen 40µl végtérfogatot eredményezve. A tisztított termékek 95 °C-on történő denaturációját a kapilláris elektroforézis követte az ABI 3500 Genetic Analyzer

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) készülék segítségével. A szekvenogramok manuális elemzését a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) programmal végeztük. A mutációk jelenlétét valamennyi esetben a forward és reverz szárlól történő kimutatással erősítettük meg.

IV.3. A *JAK2* V617F mutáció, az *SH2B3* és a *RUNX1* gének mutációk vizsgálata sporadikus AML-ben

Munkánk során 59 sporadikus, visszatérő citogenetikai eltérést nem hordozó AML-ben szenvedő betegben vizsgáltuk meg a *JAK2* V617F, az *SH2B3* és a *RUNX1* gének mutációinak együttes előfordulását. A vizsgálathoz csontvelői mintából izolált DNS-t használtunk fel, a VI.2.1-es fejezetben leírtak szerint. A PCR amplifikáció, a terméketektálás, a Sanger szekvenálás és a szekvencia analízis a VI.2.2 és VI.2.3-as fejezetekben ismertett módszerekkel történt, a 11.-es táblázatban látható primerek felhasználásával.

A *JAK2* V617F mutáció kimutatása allélspecifikus PCR módszerrel történt, ahol a klasszikus forward és reverz primerek mellett egy, a mutációra specifikus belső primert is alkalmaztunk, amely csak akkor kötődik be, ha a V617F mutáció jelen van. Ebben az esetben két különböző hosszúságú PCR termék keletkezik melynek detektálása gélelektroforézissel lehetséges.

11. táblázat: a mutációk szűréséhez használt primerek listája

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')
JAK2	RevJak	CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA
JAK2	ForSpecJak	AGCATTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT
JAK2	ForIntJak	ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG
SH2B3	E 2/1 F	GGTGTGTAATGGGGCCTACA
SH2B3	E 2/1 R	CCTGTGTCCCGGTAGTCG
SH2B3	E 2/2 F	CTGCAGTTCACCGACCTCTT
SH2B3	E 2/2 R	GAAAGTGCTGGAAGGAGCAG
SH2B3	E 2/3 F	CCTGCTCCTTCCAGCACTT
SH2B3	E 2/3 R	CAGGCTGTAGCGCAGCAC
SH2B3	E 2/4 F	CGGAGAGGCTGCTGAGAC
SH2B3	E 2/4 R	GCGGGCAGGGCTTACTTAC
SH2B3	E 3 F	CAAGCCTTGAGTACCCCAAC
SH2B3	E 3 R	GCAGGGAGGAAGGGAACAG
SH2B3	E 4 F	CCCTGGGGCAATACAAATAC
SH2B3	E 4 R	GTGGTAGCAGCAAAGGTGGT
SH2B3	E 5 F	ACCACCTTTGCTGCTACCAC
SH2B3	E 5 R	GGCCTAGCTATTGGTTTACCC
SH2B3	E 6 F	TGGGTAAACCAATAGCTAGGC
SH2B3	E 6 R	TGTCCCTCTAGGACCCTGAA
SH2B3	E 7 F	TTCAGGGTCCTAGAGGGACA
SH2B3	E 7 R	GGTCTGCAGCAAAGCCTCTAC
SH2B3	E 8 F	TCTGTGTCCTGTGCTGCTGCTG
SH2B3	E 8 R	ACACTTCTGCCTGTGCTCCT

IV.4. Teljes exom szekvenálás (WES) a IV. családban

A négy érintett egyént is magába foglaló IV. családban – a családot egyfajta modellként használva – a nagyfokú klinikai heterogenitás háttérében álló szekunder genetikai eltérések kimutatása céljából teljes exom szekvenálást (WES) végeztünk. A WES-hez a betegségben szenvedő gyermekek csontvelői mintáiból és a szülők perifériás vérmintáiból izolált DNS-t használtuk fel. Az összes kódoló génrégió dúsítására a SureSelect All Exon V5 kit-et használtunk (Agilent, Santa Clara, CA, United States). A könyvtárakat átlagosan 96x-os mélységgel szekvenáltuk a HiSeq 2000 (Illumina San Diego, CA, United States) új generációs szekvenáló készüléken.

A WES-ből nyert adatokat a humán genom hg19 verziójához illesztettük, a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 0.6.21 verziójával (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). A SAM > BAM konverziót (Sequence Alignment Map, Binary format of Sequence Alignment Map), a PCR duplikátumok eltávolítását a Picard szoftver segítségével végeztük (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). A szülők génállományát csíravonali referenciának felhasználva a beteg gyermekek génállományában pontmutációk azonosítására a MuTect algoritmust, in/del típusú mutációk azonosítására a GATK algoritmust használtuk. A szomatikus SNV-k („single nucleotide variant”) szűrésére a szülői génállomány ellenében történt minden gyermek esetében, az annotáció az SNP nexus tool segítségével történt a dbSNP adatbázisában annotált SNP-k eltávolításával. A kópiaszám eltérések azonosítása logR korrekciót követően, a Copynumber R, gamma büntető algoritmuson alapuló programot használtuk. A klonális evolúció vizsgálatára a tumorsejt frakciót („cancer cell fraction”: CCF) határoztuk meg, a variáns allélfrekvencia (VAF) segítségével (mutációt hordozó ún. read-ek vs. összes read aránya).

A szekvenáláskor nyert adatokat a mutációk annotációjának céljából a következő referencia szekvenciákhoz illesztettük: *RUNX1*: ENSG00000159216 / ENST00000300305; *JAK2* ENSG0000009696 / ENST00000381652; *SH2B3*: ENSG00000111252 / ENST00000341259; *CDC27*: ENSG00000004897 / ENST00000531206; *RBBP8*: ENSG00000101773 / ENST00000327155; *U2AF2*: ENSG00000063244/ENST00000308924; *CHD4*: ENSG00000111642 / ENST00000309577.

A WES során azonosított legfontosabb eltéréseket kétirányú Sanger szekvenálással validáltuk. Az amplifikáció, szekvenálás és szekvencia analízis a VI.2.2 és VI.2.3 fejezetekben leírtak alapján történt a 12. táblázatban szereplő primerek alkalmazásával.

12. táblázat: teljes exom szekvenálással azonosított mutációk validálásához használt primerek listája

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')	Validált mutáció
JAK2	14F	TGGCAGAGAGAATTTTCTGAACT	c.2343 g>t, p.V617F
JAK2	14R	TGTTTGGGCATTGTAACCTTC	
RABGAP1	11F	TCAGAAAGTGATTGCAGTGAGC	c.1618 g>c, p.R495P
RABGAP1	11R	TGCCGTATCACATTATCAATCC	
U2AF2	5F	TTCTGCTGAGGAGGGGAAC	c.1494 c>g, p.Q147E
U2AF2	5R	CAACTCCATCGGTCCGTCT	
II.3-CDC27	12F	GAAGCAGACTAGTTTATTGCGTTTT	c1481 t>c, p.I493V
II.3-CDC27	12R	CCTTCTTAAGCATGGGCATT	
II.2- CDC27	14F	TGTTTGGTTTTTTGTTCCCAT	c.1905 a>g, p.I634T
II.2- CDC27	14R	TTGACCAGTATGTACCATCCCTAA	
II.2- RBBP8	11F	TCCTCTGCTTTTCCCCTTCT	c.1295 a>g, p.E320G
II.2- RBBP8	11R	TTTCCCAGGCTGTAAAAGAGA	
SH2B3	6F	GTACGCTGGAACCCAGACTC	c.1532 g>a, p.R392Q
SH2B3	6R	TGTCCTCTAGGACCCTGAA	
CDC27	7 F	TGAAAAC TACAAAGAATGATCTGAA	c.1481 t>c, p.I493V
CDC27	7 R	TTTCCACAGTGATTTAGAAGTTGC	
MAP3K10	3 F	GCAGGGCTGGGTATAGGTG	c.1199 g>a, p.R304H
MAP3K10	3 F	GGTGTGAAGGGGAAAGGTCT	

IV.5. *JAK2* és *SH2B3* gének mutációinak nagy érzékenységű analízise

Annak eldöntésére, hogy a **IV.** családnál tapasztalt, agresszív lefolyású betegséget létrehozó, *JAK2* jelátviteli útvonalat érintő mutációk szubklonálisan jelen vannak-e a klinikai tüneteket nem mutató személyekben (I.1 és II.3), az érintett mintákból nagy mélységű/érzékenységű („ultra deep sequencing”: UDS) szekvenálást végeztünk.

A *JAK2* gén 14-es exonjának és az *SH2B3* gén teljes kódoló régiójának mély szintű (>10.000) szekvenálását Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) platformon végeztük. Az célszekvenciák dúsítását az Ion Ampliseq Designer™ (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) segítségével tervezett primerekkel végeztük el. Az amplifikációt követően létrehozott könyvtárakat az Ion Torrent PGM készüléken szekvenáltuk, majd a szekvencia eredményeket az Ion Reporter (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>) program segítségével analizáltuk.

IV.6. Allélspecifikus *RUNX1* expresszió vizsgálata digitális PCR-rel.

A *RUNX1* gén allélspecifikus expresszióját digitális PCR-rel (dPCR) vizsgáltuk az AML-ben szenvedő (IV.4) és a mutációt hordozó, de egészséges (IV.1) családtag rendelkezésre álló RNS mintáiból. A tünetmentesség háttérében álló esetleges mechanizmusként felmerült, hogy a vad *RUNX1* allélról átíródó ép fehérje nagyobb mennyiségű expressziója mintegy „kivédi” a mutáns allélról átíródó trunkált géntermék károsító hatását. Az eddigi irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a trunkálódást okozó mutációk nem fejtenek ki domináns negatív hatást a vad allél géntermékére.

A reakció kivitelezéséhez először reverz transzkripciót végeztünk a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, 1µg mennyiségben. Az RNS-cDNS átírás a 13. táblázatban látható mix összetételben és a 14. táblázatban látható kondíciók szerint történt.

13. táblázat: 1 ug RNS átírása RT kit segítségével

Komponens	Bemérés
Rev. Trans. Buffer (10x)	5 µl
dNTP mix (25x)	2 µl
Random primers (10x)	5 µl
MultiScribe Rev. Transcriptase	2,5 µl
Steril víz	10,5 µl

14. táblázat: reverse transzkripció kondíciók

Lépés	Hőmérséklet	Idő
Kezdeti inkubáció	25 C°	10 min.
Reverse transzkripció	37 C°	120 min.

Tárolás felhasználásig -20 C°

Az allélspecifikus vizsgálathoz a *RUNXI* pR201* stop kodont eredményező mutációra specifikus assay-t terveztünk. A mutáció specifikus assay-t a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay tervező szoftver segítségével készítettük (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/genotyping/>).

A dPCR reakciót a QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2- segítségével futtattuk, (Thermo Fisher Scientific), a reakció termékeket a QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2 segítségével szélesztettük a chipekre, és a QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument (Thermo Fisher Scientific) segítségével olvastuk le, valamennyi esetben a gyártó utasításait követve.

A reakció során külön festékmolekulával (jelen esetben FAM™ és VIC™) jelölt próbák kötődnek be a vad, illetve a mutáns allélhoz is. A reakció ~20.000 különálló reakcióterben (ún. „well”) fut, random eloszlásban, ami lehetővé teszi, hogy egymástól szeparált térben fussanak a különböző jelet adó reakciók, így végül a *RUNXI* mutáns allélról átíródó géntermék mennyiségét megkapjuk az összes *RUNXI* transzkriptum szintjéhez viszonyítva. A *RUNXI* p.R201* mutáció környezetét és az erre specifikus assay-ek sematikus ábrázolása a 10.ábrán látható.

RUNX1 p.R201*
GTGGATGGGCCC[C/T]GAGAACCTCGAA

VIC GTGGATGGGCCCCGAGAACCTCGAA

FAM GTGGATGGGCCC**T**GAGAACCTCGAA

10. ábra: Az ábrán látható a RUNX1 p.R201* mutáció és szekvencia környezete, valamint az erre specifikus, eltérő riporter molekulával jelölt próbák szerkezete. FAM jelölt a mutáns allélra specifikus assay és VIC a vad típusúra.

Az éles futások előtt három különböző hígítási formával teszteltük le a rendszert (tömény, 10x, 100x hígítás a II.1 mintából) a konverziós faktor meghatározásához és az optimális cDNS mennyiség (ún. „sweet spot”) meghatározásához. A dPCR mix összetétele a 15. táblázatban, a reakció kondíciói a 16. táblázatban láthatóak.

15. táblázat: A dPCR mix összetétele

Komponens	Bemérés
Digital PCR Master Mix v2	8 µl
Custom TaqMan® SNP Genotyping	0,4 µl
cDNS	2 µl
Steril víz	5,6 µl
Hígítási faktor minden mintánál	2/16 (0,125)

16. táblázat: dPCR kondíciók

Lépés	Hőmérséklet / Idő	
Kezdeti denaturáció	96 °C	10 min
Denaturáció	60 °C	2 min
Anelláció	98 °C	30 s
Végső extenzió	60 °C	2 min

39 ciklus

IV.7. A JAK2 46/1 haplotípus vizsgálata

A 46/1 haplotípus meghatározására a kapcsoltsági öröklődés (linkage disequilibrium) alapján együtt öröklődő ún. „flag” SNP szekvenálásával (rs12340895) került sor. Az amplifikáció és a szekvenálás az alábbi primerekkel történt, a VI.2.2 és VI.2.3-s fejezetekben leírtak alapján az alábbi primerek felhasználásával Forward: TGGTAGTCTAAAACCAAACCTGGTAA, Reverz: CCAAACCACTGCTTTTGAGA.

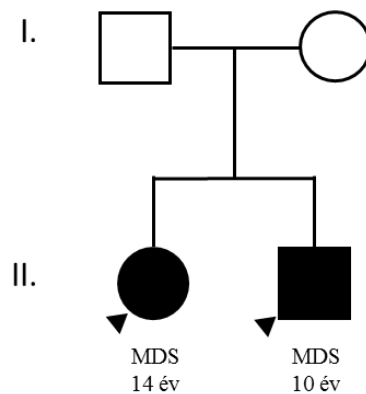
V. Eredmények

V.1 Az I.-IV. családok részletes klinikai és genetikai ismertetése

Munkánk során négy családot azonosítottunk, hazánkban elsőként, akikben familiáris, autoszomális domináns öröklésmentet mutató myeloid daganat (MDS/AML) jelent meg. Az azonosított családokban elvégeztük a fent részletesen bemutatott, örökletes kórképek háttérében álló gének mutációinak vizsgálatát.

Az első általunk vizsgált család (I.) két gyermekét követték vérlemezke szám csökkenés miatt. A kiindulási vérképükben enyhe fokú pánцитopénia és vérlemezke szám csökkenés látszódott (II.1: WBC 2,76 G/L; HGB 111 g/L; PLT 55 G/L, II.2: WBC 3,63 G/L; HGB 108 g/L; PLT 93 G/L). Mindkét betegben szimultán észlelték az MDS kialakulását. A diagnóziskori csontvelő mintában mindkét gyermeknél majdnem teljesen apláziás csontvelőrészeket láttak, mely hypocellularis gyermekkori myelodiszpláziának felelhet meg. Jelenleg szoros megfigyelés alatt állnak.

A két érintett gyermek és a szülők esetében megvizsgáltuk a *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *DDX41*, *TERT* és *TERC* gének teljes kódoló régióját, valamint az *SRP72* és *ANKRD26* gének ismert mutációs forrópontjait és valamennyi esetben negatív eredményt kaptunk (11. ábra).



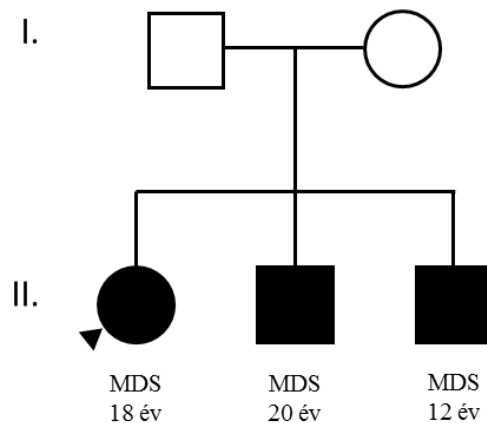
Vad típusú: *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*,
ANKRD26, *ETV6*, *DDX41*, *TERC*, *TERT* és *SRP72*

11. ábra: Az ábrán látható családban a II. generációban látható gyermekekben jelent meg trombocitopénia és MDS. Az ismert és vizsgált gének vad típusúnak bizonyultak.

A második vizsgált család **(II.) esetében** három, MDS-ben szenvedő testvér érintett. Az első gyermeket 18 éves korában pánцитopénia, anémia miatt vizsgálták. Csontvelő-biopsziája ipocelluláris csontvelőt igazol, megaloblasztoid vörösvértestképzéssel. Idegen donoros őssejt-transzplantáción esett át, betegsége jelenleg követés alatt áll.

A leánygyermek testvérét donorkeresés közben vizsgálták. Klinikailag tünetmentes volt, vérszámjai normál tartományban voltak, de a csontvelő vizsgálata finom diszplastikus eltéréseket mutatott. A család legfiatalabb gyermeke nyirokcsomó-megnagyobbodás miatt került klinikailag figyelembe, bár vérképeltérése nem volt, a terhelt családi anamnézis miatt, csontvelő-biopsziát végeztek és az ő esetében is korai diszplastikus eltéréseket figyeltek meg.

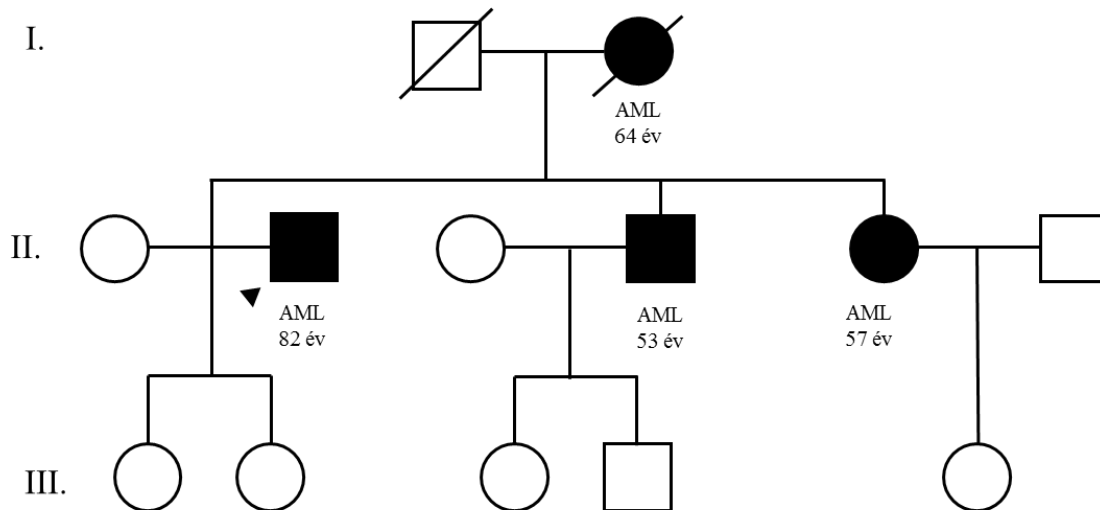
Jelen család esetében is a *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *DDX41*, *TERT* és *TERC* gének teljes kódoló régióját, valamint az *SRP72* és *ANKRD26* gének ismert mutációs forrópontjait szekvenáltuk és valamennyi esetben negatív vad típusú géneket azonosítottunk. Jelenleg mind a három érintett szoros klinikai követés alatt áll. A családfa a 12. ábrán látható.



Vad típusú: *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *DDX41*, *TERC*, *TERT* és *SRP72*

12. ábra: Az ábrán látható család második generációjában (II.) mindhárom gyermekben MDS fenotípusa jelent meg. A vizsgált gének a család esetében vad típusúnak bizonyultak.

A harmadik általunk vizsgált családban **(III.)** AML halmozódása volt megfigyelhető több generáción keresztül. A klinikai figyelembe került beteget 82 éves korában diagnosztizálták AML-lel, mely citogenetikai eltéréseket nem hordozott, szövettanilag FAB M6 kategóriába volt sorolható. Idősebb férfitestvérét 53 éves korában, fiatalabb nőtestvérét pedig 57 éves korában diagnosztizálták AML-lel. Édesanyjuk 64 éves korában szintén AML-ben szenvedett. Az általunk ismert familiáris AML-re hajlamosító gének, *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *DDX41*, *TERT* és *TERC* gének teljes kódoló régióját, valamint az *SRP72* és *ANKRD26* mutációs forrópontjait vizsgáltuk az ábrán nyíllal jelölt beteg mintáján. Valamennyi vizsgált gén esetében vad típusú szekvenciákat azonosítottunk. A családfát a 13. ábrán mutatjuk be részletesen.



Vad típusú: *CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *DDX41*, *TERC*, *TERT* és *SRP72*

13. ábra: Az ábrán látható családban az AML fenotípusa jelent meg két generáción keresztül. Az általunk vizsgált familiáris MDS/AML gének negatívnak bizonyultak a vizsgált személy esetében.

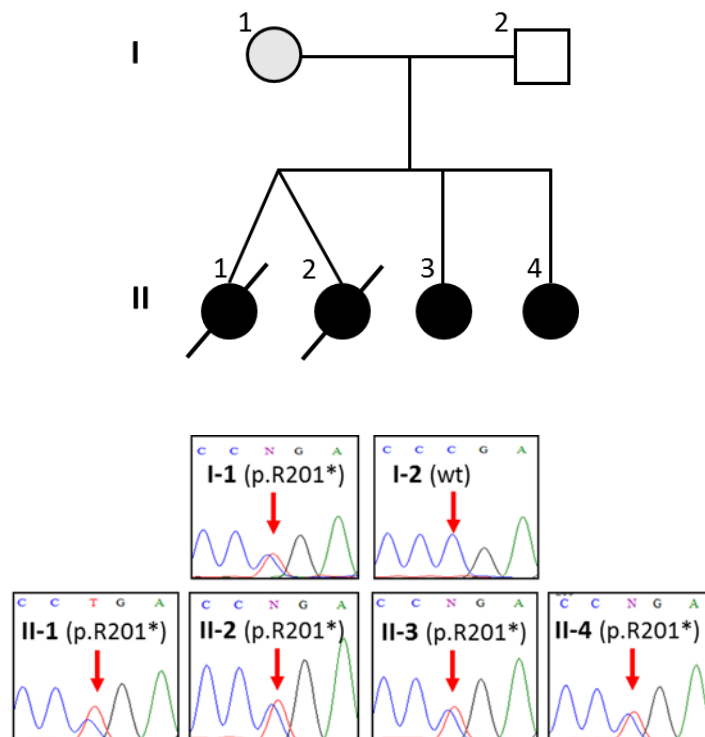
A negyedik vizsgált családban (IV.) négy gyermekben jelent meg MDS/AML fenotípusa. A gyermekek közül egy dizigóta ikerpár mindkét tagja igen heveny lefolyású betegségben hunyt el. A dizigóta ikerpár (II.1-2) betegsége 2002-ben egy időben került felfedezésre, mindkettejük esetében láz, testszerte jelentkező bőrvérzések és lép-máj megnagyobbodás volt a vezető tünet. Induló labor értékeikből súlyos anémia, trombocitopénia és magas tumorsejt szám emelhető ki (II.1: Fvs: 7,3 G/l, Thr: 23 G/l, Hgb: 48 g/l, Ht:16%, LDH:630 U/l, Húgysav:260 umol/l; II.2: Fvs: 27, 2 G/l, Thr: 122 G/l, Hgb: 51 g/l, Ht:18%, LDH:11806 U/l, Húgysav: 604 umol/l). A II.1 iker esetében RAEB II-tAML diagnózisa született meg, 30%-os perifériás monocitózissal, 47, XX, del (2q33), +21 komplex citogenetikai eltérésekkel. A gyermeket AML BFM 96 protokoll szerint kezdték kezelni és idegdonoros őssejt-transzplantáció volt tervezett. Az alapbetegség recidivált és a második vonalban történő kezelés kapcsán szövődményként fellépő gombafertőzésben életét veszítette. A II.2 iker esetében MDS-tAML diagnózisa született meg, citogenetikai vizsgálatok alapján időrendi sorrendben: 45XX -7, 45XX -7 del 9q22 és 47XX del2,+ iso 9 alapján triklonális betegség állt fenn. Kezelését szintén AML BFM 96 protokoll szerint kezdték meg, ám szövődményesen fellépő gasztrointesztinális vérzés, szepszis és kardiogén sokk következtében elhunyt.

Tíz év elteltével (2012-ben), testvérüknél (II.4), a család legfiatalabb gyermekénél, akit trombocitopénia miatt követtek születésétől kezdve, szintén heveny lefolyású AML jelentkezett. Egy évvel a diagnózist megelőzően perifériás citopénia miatt csontvelő vizsgálatot végeztek, ekkor enyhe diszplasztikus vonások voltak láthatóak. Egy év múlva, 6 éves korában monocitózis miatt ismét csontvelő vizsgálat történt, ekkor M4 altípusú AML igazolódott, 25%-os blasztszaporulattal, citogenetikai eltérések nélkül. Kezelését AML BFM 98 protokoll szerint kezdték meg, csontvelő-transzplantációt terveztek, de a terhelt családi anamnézisre való tekintettel, donorforrásként felmerülő testvérénél (II.3) előzetesen csontvelő vizsgálatot végeztek, melyen szintén finom diszplasztikus eltérések voltak láthatóak. Mivel súlyos, elhúzódó citopénia állt fenn, sürgősen idegen donoros transzplantációt végeztek az II.4-es gyermek esetében, ami sikeresnek bizonyult, a beültetés utáni 280. napon enyhe graft versus host reakció lépett fel, de klinikailag uralható volt. Sajnálatosan azonban két év elteltével betegsége relabált, ekkor ismételen előzetes kondicionáló kezelést követően HLA 10/10-es egyezésű idegdonoros vérképző őssejttel transzplantálták. Szövődmény és komplikáció a

transzplantációt követően nem lépett fel, jelenleg teljes csontvelői donor kimérizmus mellett komplett remisszióban van. Testvére (II.3) jelenleg figyelés és várakozás stratégia mellett klinikailag teljesen tünet- és panaszmentes.

A család esetében az erős klinikai gyanú miatt (vérlemezkeszám-eltérések, MDS, ennek talaján AML kialakulása) elvégeztük a *RUNXI* gén teljes kódoló régiójának szekvenálását melynek során a p.R201* stop kodont eredményező mutációt találtuk meg az érintett gyermekek esetében, és az ekkor 40. életévét betöltött, klinikailag teljesen tünetmentes édesanya esetében, csírvonali, heterozigóta formában (14. ábra).

Jelen család az eddig közölt, legtöbb elsőfokú rokont tartalmazó FPD-AML család, ahol a *RUNXI* csírvonali mutációját sikerült bizonyítani.



14. ábra: Az ábrán látható családban az FPD-AML fenotípusa jelent meg. A család esetében a *RUNXI* gén p.R201* stop kodont eredményező mutációját azonosítottuk mind a négy beteg gyermek és a tünetmentes édesanya esetében. Az édesanya nem hordozta a *RUNXI* p.R201* mutációt.

V.2. WES eredményei a **IV.** családban

Az **IV.** családnál látható nagyfokú klinikai heterogenitás háttérében álló másodlagos genetikai eltérések tisztázására teljes exomszekvenálást végeztünk (WES). A szekvenálás során, átlagosan 96x mélységet sikerült elérni és minden személynél átlagosan 11 mutációt azonosítottunk, melyek 97%-ban SNV-nek bizonyultak („single nucleotide variant” egy nukleotidot érintő eltérés). A talált SNV-eket a 17. táblázatban tüntettük fel, a szekvenálási műtermékeket a WES adatok manuális áttekintése során távolítottuk el.

A talált eltéréseket, a szülők genomjával hasonlítottuk össze, kizárva így az örökletes polimorfizmusokat, illetve további csírvonali hajlamosító gének mutációinak előfordulását beteg gyermekekben.

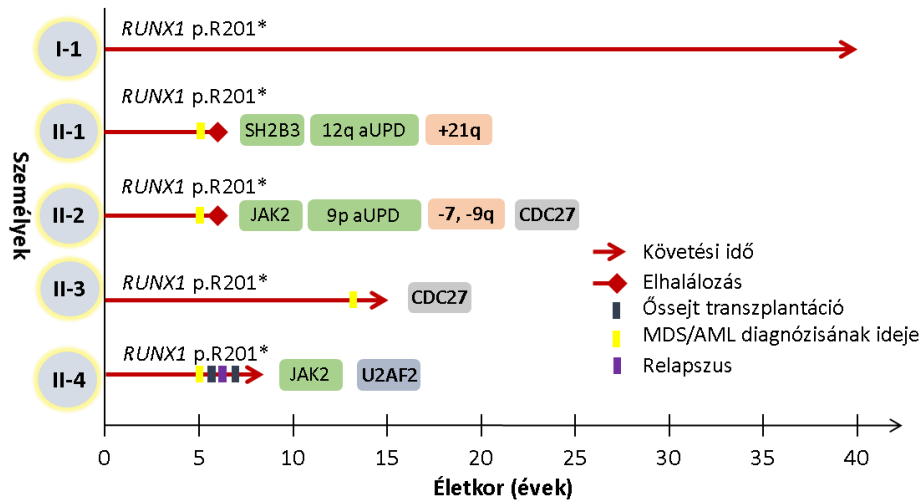
17. táblázat: a WES eredményeinek listája

Beteg	Ensembl gén azonosító	Ensembl transzkriptum azonosító	Gén	Kromoszóma	Genomikus pozíció	Nukleotid csere (ref/variant)	CDNS pozíció	aminosav pozíció	aminosav csere	Mutáció típusa	VAF
II.1	ENSG0000011252	ENST00000341259	SH2B3	chr12	111885287	G/A	1332	392	R>Q	missense- non-syn	0,672
II.1	ENSG00000182704	ENST00000333090	TSKU	chr11	76507435	C/G	949	259	L>V	missense- non-syn	0,523
II.1	ENSG00000198911	ENST00000361204	SREBF2	chr22	42300883	C/A	3276	1037	A>D	missense- non-syn	0,422
II.1	ENSG00000179044	ENST00000314586	EXOC3L1	chr16	67218676	A/G	2184	648	L>P	missense- non-syn	0,389
II.1	ENSG00000168959	ENST00000305432	GRAM5	chr11	88337977	G/A	1453	435	R>W	missense- non-syn	0,364
II.1	ENSG0000006283	ENST00000359106	CACNA1G	chr17	48697116	G/A	5854	1952	E>K	missense- non-syn	0,354
II.1	ENSG00000241935	ENST00000370646	HOGA1	chr10	99371366	G/A	1295	312	A>T	missense- non-syn	0,352
II.1	ENSG00000177689	ENST00000356790	MAGB10	chrX	27839737	G/T	559	105	S>I	missense- non-syn	0,331
II.1	ENSG00000134222	ENST00000369903	PSRC1	chr1	109824633	G/C	267	43	R>G	missense- non-syn	0,200
II.1	ENSG0000011642	ENST00000309577	CHD4	chr12	6697051	C/T	3694	1177	R>H	missense- non-syn	0,056
II.2	ENSG00000096968	ENST00000381652	JAK2	chr9	5073770	G/T	2343	617	V>F	missense- non-syn	0,682
II.2	ENSG0000015475	ENST00000342111	BID	chr22	18222879	A/C/A	377	96	S>V/S	frameshift	0,375
II.2	ENSG0000007171	ENST00000313735	NOS2	chr17	26093566	G/T	2450	739	S>Y	missense- non-syn	0,336
II.2	ENSG00000143889	ENST00000410076	HNRPL	chr2	38809018	C/A	886	275	C>F	missense- non-syn	0,333
II.2	ENSG00000101773	ENST00000327155	RBBP8	chr18	20572749	A/G	1295	320	E>G	missense- non-syn	0,323
II.2	ENSG00000151012	ENST00000280612	SLC7A11	chr4	139104402	G/A	1253	325	L>F	missense- non-syn	0,288
II.2	ENSG0000005884	ENST00000320031	ITGA3	chr17	48165611	G/A	3398	1023	R>H	missense- non-syn	0,244
II.2	ENSG0000004897	ENST00000531206	CDC27	chr17	45214548	A/G	1905	634	I>T	missense- non-syn	0,167
II.2	ENSG00000197689	ENST00000329040	TBC1D29	chr17	28890301	G/A	460	104	S>N	missense- non-syn	0,093
II.2	ENSG00000103365	ENST00000309859	GGA2	chr16	23481460	C/A	1560	493	D>Y	missense- non-syn	0,081
II.3	ENSG00000132196	ENST00000254521	HSD17B7	chr1	162762514	C/T	156	34	A>V	missense- non-syn	0,495
II.3	ENSG00000253873	ENST00000398587	PCDHGA11	chr5	140801000	C/T	239	69	S>F	missense- non-syn	0,477
II.3	ENSG00000222036	ENST00000409832	POTEG	chr14	19574214	G/C	1323	424	S>T	missense- non-syn	0,200
II.3	ENSG00000244482	ENST00000245621	LILRA6	chr19	54745550	G/T	697	187	T>N	missense- non-syn	0,103
II.3	ENSG0000004897	ENST00000531206	CDC27	chr17	45219311	T/C	1481	493	I>V	missense- non-syn	0,075
II.3	ENSG00000072736	ENST00000329524	NFATC3	chr16	68156512	C/A	750	242	C>*	nonsense	0,049
II.3	ENSG00000079432	ENST00000160740	C1C	chr19	42796978	C/A	3476	1146	P>T	missense- non-syn	0,048
II.3	ENSG00000124103	ENST00000371328	C20orf106	chr20	55100084	C/A	543	74	Q>K	missense- non-syn	0,045
II.3	ENSG00000138823	ENST00000511045	MTRP	chr4	100532602	G/A	2075	688	G>S	missense- non-syn	0,042
II.4	ENSG00000169783	ENST00000355300	LINGO1	chr15	77906780	T/C	1521	490	Q>R	missense- non-syn	0,535
II.4	ENSG00000063244	ENST00000308924	UZAF2	chr19	56172508	C/G	1494	147	Q>E	missense- non-syn	0,412
II.4	ENSG00000236669	ENST00000444154	AC006372.1	chr7	157318686	G/A	210	47	R>H	missense- non-syn	0,358
II.4	ENSG00000105655	ENST00000338128	ISYNA1	chr19	18547585	C/T	736	173	R>Q	missense- non-syn	0,349
II.4	ENSG00000130758	ENST00000253055	MAP3K10	chr19	40710439	G/A	1199	304	R>H	missense- non-syn	0,286
II.4	ENSG00000173040	ENST00000344408	EV2	chr4	5682988	G/A	923	290	T>M	missense- non-syn	0,241
II.4	ENSG00000101343	ENST00000377340	CRNKL1	chr20	20024164	C/T	1459	476	R>Q	missense- non-syn	0,210
II.4	ENSG00000096968	ENST00000381652	JAK2	chr9	5073770	G/T	2343	617	V>F	missense- non-syn	0,200
II.4	ENSG00000028203	ENST00000397796	VEZT	chr12	95668655	C/T	986	329	P>L	missense- non-syn	0,193
II.4	ENSG00000011454	ENST00000373647	RABGAP1	chr9	125772742	G/C	1618	495	R>P	missense- non-syn	0,136
II.4	ENSG00000124103	ENST00000371328	C20orf106	chr20	55100084	C/A	543	74	Q>K	missense- non-syn	0,102

*A szekvenálási műtermékeket a WES analízise során eltávolítottuk

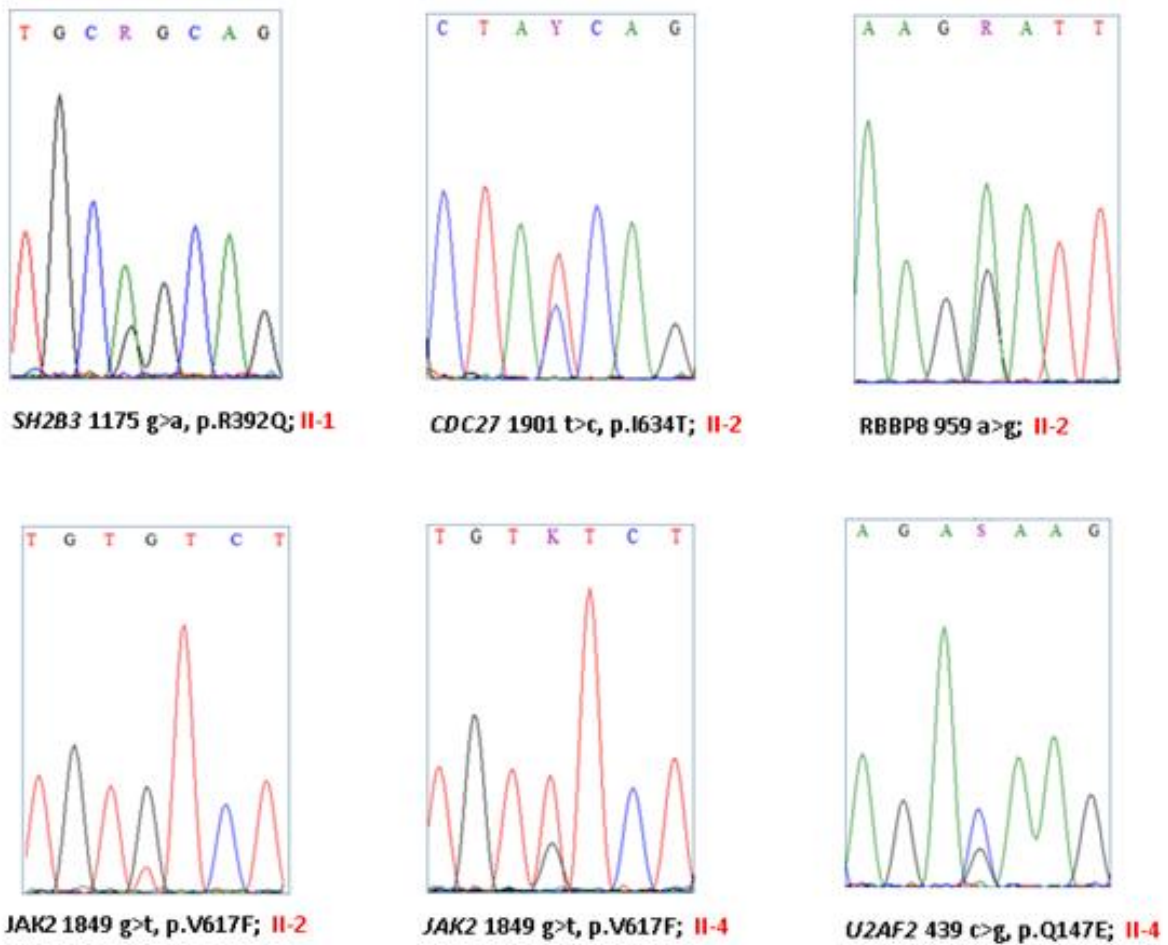
Az érintett, heveny lefolyású betegséget mutató gyermekek esetében sikerült azonosítanunk a JAK2 jelátvitelt érintő mutációk konvergens evolúcióját. A II.2-es ikergyermek és a II.4-es gyermek mintájában a *JAK2* V617F mutációt azonosítottuk, mely mutáció a II.2-es gyermek esetében a 9-es kromoszóma rövid karjának, mitotikus rekombináció kapcsán kialakult szerzett uniparentális diszómiaja (aUPD) miatt homozigóta jellegűvé vált (VAF érték 68%-ra emelkedett, a belső kontroll a *RUNX1* p.R201* mutáció VAF értéke 67%). A II.1-es ikergyermek esetében az *SH2B3* R392Q mutációját azonosítottuk, mely aUPD következtében szintén homozigóta jellegűvé vált (az allél tömeg 67%-ra emelkedett) (15. ábra). A bevezetőben részletesen ismertetésre került, az *SH2B3* (vagy LNK) a JAK-STAT jelátvitel negatív szabályozója, gátló mutációja konstitutív JAK-STAT jelátviteli aktivitást okoz. További kooperáló mutációkat azonosítottunk a II.2-es gyermekben a sejtciklus szabályozásában résztvevő *CDC27* génben (I634T, VAF 16.7%) és a klinikailag tünetmentes II.3.-as gyermekben is (I493V, VAF 7.5%). Az *RBBP8* (DNA double strand break repair, E320G, VAF 32.3%) és a *CHD4* (nucleosome remodelling and histone deacetylase complex, R1177H, VAF 5.6%) mutációit a II.2-es ikergyermekben, valamint az *U2AF2* (spliceosome component, Q147E, VAF 41.2%) mutációját a II.4-es gyermekben azonosítottuk. Utóbbi esetben a relapszuskori mintában is lehetőségünk volt a WES elvégzésére, ahol azt láttuk, hogy a korábban domináns *U2AF2* mutációt hordozó klón a relapszuskor háttérbe szorult, és a betegség ismételt megjelenését már egy új, a *JAK2* V617F mutációt hordozó klón triggerelte.

A mutációk megjelenésének vizuális ábrázolása látható az 15. ábrán. Az ábrán a klinikai eseményeket is feltüntettük.



15. ábra: Az ábrán láthatóak *RUNX1* csírvonalai mutációt hordozó FPD-AML családban a beteg gyermekek esetén megjelenő másodlagos mutációk, melyek a betegség kialakulása során jelentek meg. A függőleges tengelyen a személyek, a vízszintes tengelyen az idő (években) került ábrázolásra.

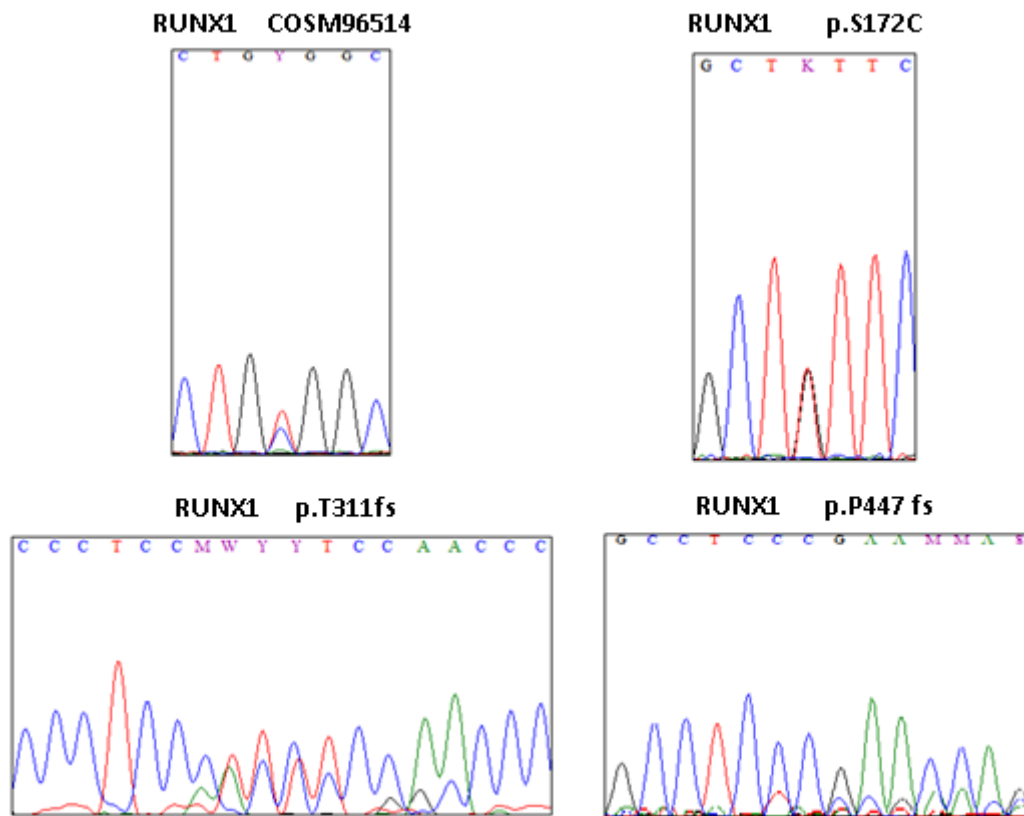
Az NGS során talált eltéréseket kétirányú Sanger szekvenálással is validáltuk, melynek eredményei az 16. ábrán láthatóak. Az alábbi variánsokat validáltuk sikeresen: II.1: *SH2B3* (p.R392Q, VAF: 67%), II.2: *JAK2* (p.V617F, VAF: 68%), *CDC27* (p.I634T, VAF 16.7%), *RBBP8* (p.E320G, VAF 32.3%), II.3: *CDC27* (p.I493V, VAF 7.5%), II.4: *JAK2* (p.V617F, VAF: 20%), *U2AF2* (Q147E, VAF 41.2%).



16. ábra: A WES során azonosított mutációk kétirányú Sanger szekvenálással kapott elektroferogramjai. Az ábrán feltüntettük az adott gén elnevezését, a mutációknak az illesztéskor használt referenciaszekvencián lévő helyét, pirossal pedig az érintett családtagot, akinek mintájából a validáció történt. Érdekes megfigyelés, hogy a *JAK2* V617F mutáció mely a II.2-es betegben homozigótává vált az aUPD-t követően az elektroferogramon is azonosítható, a mutáns allélt reprezentáló fekete csúcs magasabb, mint a vad típusúnak megfelelő piros.

V.3. A *RUNX1* és *JAK2/SH2B3* gének mutációinak együttes előfordulása sporadikus AML-ben.

Munkánk során 59 sporadikus AML-ben szenvedő beteg csontvelői mintáin vizsgáltuk a *JAK2* V617F mutáció, illetve a teljes *RUNX1* és *SH2B3* gének mutációinak előfordulását kétirányú Sanger szekvenálással. Hét esetben találtuk meg a *RUNX1* gén mutációját, egy esetben az *SH2B3* gén mutációját, és mindössze egy esetben a *RUNX1* mutációjának és a *JAK2* V617F mutációjának társulását. A *RUNX1* gén következő mutációit azonosítottuk (az annotált esetekben a COSMIC ID-t is feltüntetve): p.T311fs: COSM24756, p.I342fs (ins. C), p.L56S: COSM24756/rs111527738, p.S167N, p.S172C, p.R232W: COSM96514, p.R107C: COSM24736, p.V388L, p.P447*. A talált mutációk elektroferogramjai közül néhányat a 17. ábrán szemléltetünk.



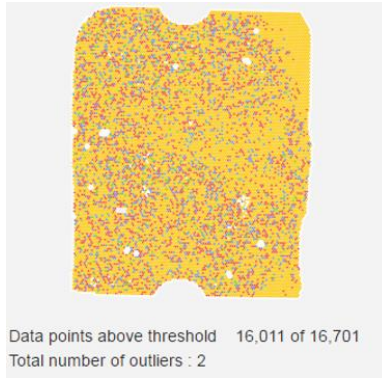
17. ábra: Szemléltető elektroferogramok az általunk talált sporadikus *RUNX1* mutációkról. Vizsgálataink során 7 esetben találtunk *RUNX1* mutáns AML-t és mindössze egyetlen esetben láttuk a *JAK2* V617F és a *RUNX1* mutáció együttes előfordulását.

V.4. Allélspecifikus *RUNX1* expresszió vizsgálata digitális PCR-rel

A IV. családban látható jelentős klinikai heterogenitás háttérében álló okok közül felmerült, hogy a tünetmentes hordozó anyagában (*I.1*) a *RUNX1* vad allélról történő expressziója mintegy védelmet biztosít a hemopoetikus sejtekben, míg az agresszív lefolyású esetekben ez a mechanizmus nem érvényesül és eredményezheti a kezdő lépését a daganatos transzformációnak. Ennek eldöntésére allélspecifikus digitális PCR-t (dPCR) vizsgálatot végeztünk. Ennek során először teszteltük a minták minőségét, az optimális hígítás megtalálása érdekében. A reakció sikerességét, és a minta random eloszlását a mintegy 20.000 well-t tartalmazó chip-en a 18. ábra szemlélteti. A 19. ábrán a *II.4*-es beteg mintájából történt chip futás eredményét lehet látni, szemléltetve a FAM illetve VIC fluorokrómokkal jelölt allélok random eloszlását a chipen.

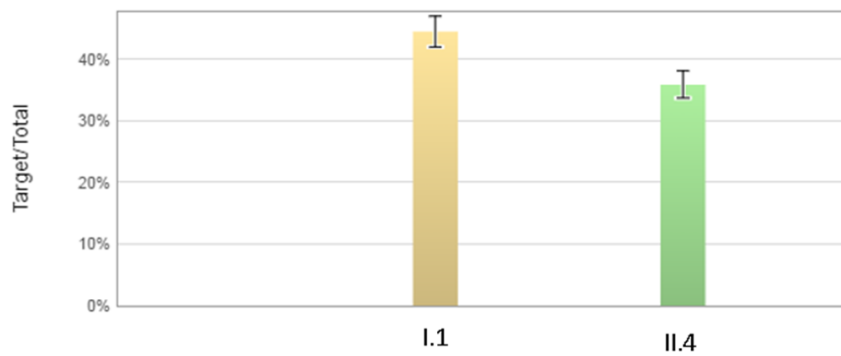


18. ábra: A chipék feltöltésének sikerességét jelző molekulával kapott kép. A dPCR master mixhez kevert jelző molekula a reakció sikerességétől függetlenül oszlik meg és a chipék feltöltésének technikai sikerességét jelzi.



19. ábra: A FAM illetve VIC jelzőmolekulák random eloszlását mutató chip térkép. Az assay sikeres reakció alapján mutat színváltozást, mely alapján a reakció sikeressége ellenőrizhető.

Összehasonlítottuk a tünetmentes I.1 személyben és a II.4-es beteg gyermekben a FAM illetve VIC jelölt expressziót, (FAM-mutáns/VIC-vad típusú). Az I.1-es személy mintájában a mutáns/összes transzkriptum aránya 44.36%-nak bizonyult, míg a II.4-es beteg gyermek esetében, akinél rendelkezésre állt RNS, a vizsgálathoz 35.82% volt a mutáns/összes transzkriptum expressziós aránya. A 20. ábrán látható, hogy a klinikailag tünetmentes, mutáció hordozó személyben érdekes módon magasabb a *RUNX1* p.R201* mutációt hordozó allélról történő expresszió.

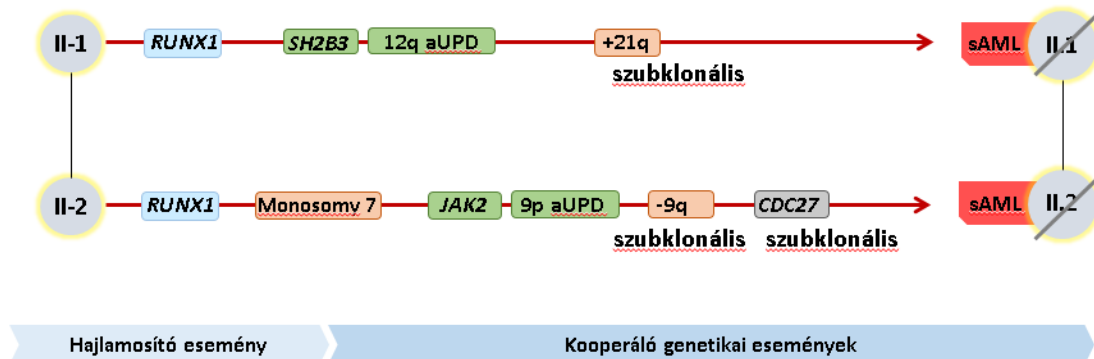


I.1		II.4	
Vizsgált allél	RUNX1 p.R201*/RUNX1 vad típus	Vizsgált allél	RUNX1 p.R201*/RUNX1 vad típus
FAM	3152.6 kópia/mikroliter	FAM	1288 kópia/mikroliter
VIC	3957 kópia/mikroliter	VIC	2309 kópia/mikroliter
Arány (target/total)	44,36%	Arány (target/total)	35,82%

20. ábra: A FAM illetve VIC szignálokból kapott expressziós adatok alapján a targetre (*RUNX1* p.R201*mutáns allél) nézve (FAM jel) kapott expressziós százalékok oszlop diagram szerinti ábrázolása. Az egészséges hordozó I.1-es személyben 44,36% a mutáns/összes expressziós arány, míg a II.4-es beteg gyermekben ez 35,82%-nak adódott.

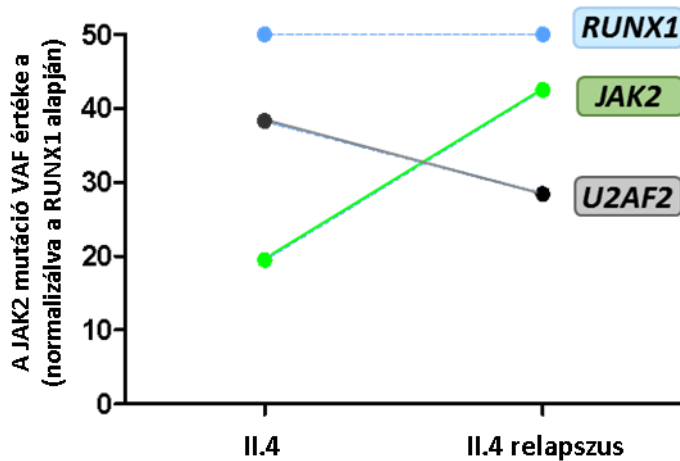
V.5. Klonális evolúció vizsgálata a **IV.** családban

A variáns allélfrekvencia adatok (VAF) felhasználásával lehetőségünk volt következtetni, hogy a mutációk milyen időrendben jelentek meg az érintett egyéneknél. Ezek alapján a dizigóta ikergyermekekben a csíravonali eltérésen túl az első patogenetikai lépés a II.1-es gyermek esetén az *SH2B3* mutáció megjelenése volt, majd a mutáció aUPD következtében homozigóta jellegűvé vált. A II.2-es gyermek esetében 7-es kromoszóma monoszómia alakult ki, majd a *JAK2* V617F mutáció jelent meg. Itt is a következő lépés a mitotikus rekombináció következtében létrejövő vad *JAK2* allélvesztés volt, így homozigóta V617F mutációt eredményezve. A többi SNV, illetve kromoszomális eltérés melyet azonosítottunk (II.2: *CDC27* [p.I634T, VAF 16.7%], *RBBP8* [p.E320G, VAF 32.3%], II.3: *CDC27* [p.I493V, VAF 7.5%], II.4: *U2AF2* [Q147E, VAF 41.2%]), alacsony VAF értékkel bíró szubklonális eltérések voltak, csak később a tumorsejtek kis százalékában jelentek meg. A mutációk időrendi kialakulását szemlélteti a 21. ábra.



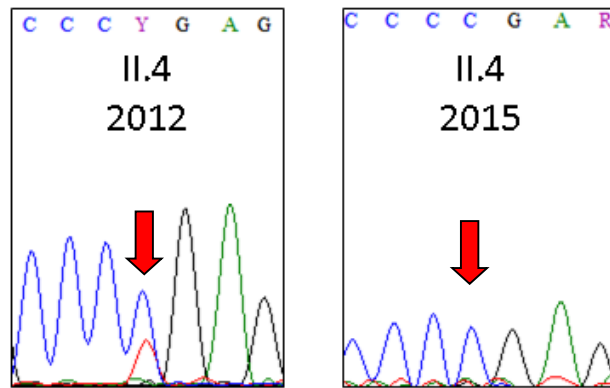
21. ábra: A mutációk megjelenésének sorrendje, a tumorsejt frakció és a VAF adatok alapján a dizigóta ikerpárban (II.1-2). A *RUNX1* csíravonali mutáció volt mindkét gyermek esetében a predisponáló tényező. A II.1.-es beteg esetében az *SH2B3* mutációja jelent meg, ami aUPD következtében homozigótává vált, ezt követte a mutáns *RUNX1* allél nyerésével társuló kromoszóma eltérés. A II.2.-es gyermek esetében a 7-es monoszómiát követően jelent meg a *JAK2* V617F mutációja, mely aUPD-t követően szintén homozigóta jellegűvé vált. Ezt követte a szubklonális mutációk megjelenése.

A II.4-es gyermek esetében lehetőségünk volt a diagnóziskori és a relapszuskori mintából kapott VAF adatok összevetésére, mely alapján látható volt, hogy a diagnóziskor kis százalékban jelen lévő *JAK2* V617F mutáns klón triggerelte a betegség relapszusát. A 22. ábrán látható szemléletesen a relapszust triggerelő klón. A WES adataiból látható volt, hogy a csírvonali *RUNX1* mutáció szintje végig stabil heterozigóta formájú maradt, a korábban magasabb domináns *U2AF2* mutáció (VAF: 40%) a relapszuskori mintában csökkent (VAF: 29%) míg a korábban alacsonyabb *JAK2* V617F mutációt hordozó klón emelkedett (VAF 19-42%), a relapszuskor látott képet létrehozva.



22. ábra: A relapszuskor a kezdetben domináns *U2AF2* mutáns klón tömege csökkent, a relapszust a *JAK2* V617F mutáns klón triggerelte.

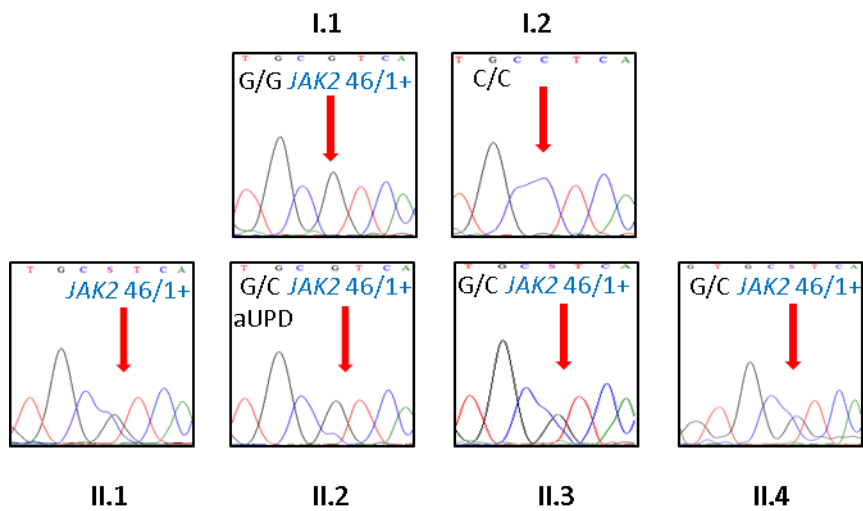
Ahogy a fenti klinikai adatok részletezésében írtuk, tanulmányunk kezdete óta a II.4-es gyermek átesett a relapszust követő második csontvelő-transzplantáción és komplett remisszióban van. A Munkacsoportunk által szekvenált követési mintákban jól látható, hogy a csontvelő-transzplantáció hatására a mutáns allél eliminálódott a csontvelőből (23. ábra).



23. ábra: A II.4-es gyermek transzplantáció előtti és azt követő mintájának vizsgálata alapján jól látható, hogy a RUNX1 stop kodont eredményező mutációja eliminálódott a gyermek csontvelői sejtjeiből.

V.6. A *JAK2* 46/1 haplotípus vizsgálata az FPD-AML családban

A *JAK2* 46/1 - V617F mutációra hajlamosító - fenotípus vizsgálatához a 46/1 haplotípus kombinációval (lásd feljebb) együtt öröklődő ún. zászló SNP (rs12340895) szekvenálását használtuk fel. Eredményeinket részletesen lásd a 24. ábrán. Az édesanya homozigótának bizonyult a 46/1 haplotípusra, míg az édesapa a non-46/1 haplotípusra. A gyermekekben heterozigóta formában jelent meg a V617F mutációra hajlamosító 46/1 haplotípus.



24. ábra: A 46/1 haplotípussal együtt öröklődő rs12340895 ún. zászló SNP szekvenálásának eredményei. A szülők közül az I.1-es homozigóta a 46/1 haplotípusra, míg az I.2 a non-46/1 haplotípusra. A gyermekek közül valamennyien heterozigóták a 46/1 haplotípusra nézve. A II.2-es gyermek esetében a non-46/1 allél elvesztése is jól látható az elektroferogramon (a C nukleotidot jelképező csúcs jelentősen alacsonyabb).

VI. Megbeszélés

Jelen munkánk során célul tűztük ki a familiáris myeloid daganatos megbetegedések kialakulásának és progressziójának háttérben álló genetikai eltérések vizsgálatát Magyarországon. E betegségcsoport családi halmozódása régóta ismert, azonban, genetikai háttérük feltérképezése és klasszifikációjuk csak napjainkban kezdődött el és hazánkban mindezig nem zajlottak ilyen irányú vizsgálatok.

Az örökletes hematológiai daganatos megbetegedéseket, ma egy gyűjtő csoportba sorolva ismerhetjük meg a 2016-os WHO klasszifikációban, ahol mint familiáris MDS/AML predispozíciós szindrómák szerepelnek (6). A csoport tagjai klinikai és genetikai alapon vannak felosztva, azonban az ismeretek dinamikus változása miatt ez még bővülő klasszifikáció. Az eddig megismert gének és mutációk ugyanis a familiáris eseteknek valószínűleg csak egy bizonyos hányadát, egyes szerzők szerint 40-50%-át magyarázzák (10). Ez a tény kiemeli a fontosságát a genetikai vizsgálatok beépítésének a diagnosztikai algoritmusokba, illetve a családi halmozódást mutató, de az eddig megismert mutációkra negatív esetekben az újabb gének keresését teljes exom-szintű vizsgálatok alkalmazásával.

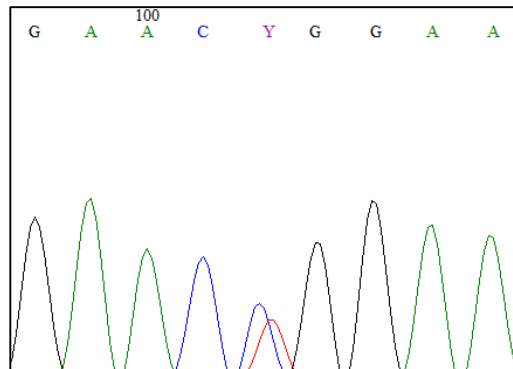
A kórcsoport megismerésének történetében az első mérföldövet a *RUNX1* mutációinak felfedezése jelentette az első olyan jól dokumentált családokban, ahol myeloid malignitások és vérzékenység halmozódott (11). Ezt követte a *CEBPA* és a *GATA2* gének mutációinak felfedezése familiáris MDS/AML háttérben, melyek közül a *CEBPA* gén mutációja előzetes klinikai tünetek nélküli AML megjelenését okozza, szinte 100% penetranciával, míg a *GATA2* mutációi változatos immunológiai kórképeket, fokozott MDS/AML hajlammal. A *CEBPA* gén mutációi sporadikus AML-ben is ismertek mintegy 10%-ban a CN-AML csoportban. Az ún. „double”-*CEBPA* mutáns AML önálló entitás a 2016-os WHO klasszifikációban. Egyes munkacsoportok eredményei alapján a biállélikus *CEBPA* mutáns esetek mintegy 11%-a csíravonali N-terminális és szerzett C-terminális mutációt hordoz, mely felveti a csoportba eső valamennyi beteg genetikai szűrésének lehetőségét (12, 94). Munkacsoportunk 2013 óta végez *CEBPA* mutációanalízist valamennyi, az Intézetünkbe érkező AML diagnosztikus csontvelő minta esetén, melyek közül eddig összesen 4 esetben találtunk mindkét allélt érintő *CEBPA* mutációt, melyről egy esetben igazolni tudtuk az N-terminális csíravonali

eredetet. A jelen dolgozatban bemutatott III. számú családban, halmozódó ún. „de-novo” AML-t figyeltünk meg. Az első publikáció, melyben a familiáris AML háttérében a gén mutációját leírták hasonló esetet dolgoz fel, fiatalabb életkorban megjelenő betegséggel (12). Habár az általunk bemutatott családban jellemzően idősebb életkorban jelent meg a malignus fenotípus, a de novo jelleggel megjelenő AML miatt felmerült a csíravonali *CEBPA* mutáció, mint patogenetikai ok. A másik gén, mely célkeresztbe került e család vizsgálata során, a *DDX41* volt. A *DDX41* az egyik legfrissebben felfedezett gén a familiáris MDS/AML háttérében. Bár kezdetben a közlemények alapján időskorban megjelenő családi halmozódást mutató MDS-ben írták le a szerepét, a későbbi közleményekben fiatalabb életkor és egyéb hematológiai malignitás is megjelent (17, 41). A fenti család esetében e két génben vártuk a mutációk megjelenését, azonban mindkét esetben vad típusú géneket azonosítottunk. A többi ismert hajlamosító génmutáció analízisét is elvégeztük, minden esetben negatív eredménnyel. Valószínűsíthetően a családi halmozódás háttérében itt egy eddig még ismeretlen genetikai tényező állhat.

Hasonló a helyzet az általunk bemutatott II-es számú családban is, ahol három, fiatal gyermekben jelent meg az MDS fenotípusa. Valamennyi ismert hajlamosító génre elvégeztük esetükben is a vizsgálatot, negatív eredménnyel. Az eddigi irodalmi ismereteink és a látott klinikai kép alapján ebben a családban is a *DDX41* mutációját várhattuk volna, azonban a teljes kódoló génrégió vad típusúnak bizonyult. Ez a felfedezés is tovább erősíti azt a tényt, hogy vannak még további azonosításra váró hajlamosító genetikai tényezők, akár egymásra nagyon hasonlító kórképekben is, eltérő csíravonali hajlamosító komponenssel.

A *GATA2* csíravonali mutációt hordozó esetekben, színes klinikai képpel találkozunk. Az Emberger-szindróma, MONO-Mac-szindróma, DCML-deficiencia fentebb részletezett, változatos immunológiai kórképek, melyeknél változatos súlyosságú citopénia, nyiroködéma jellemző (72). A kórképek közül némelyiknél megfigyelték a magas (70-80%) hajlamot MDS/AML kialakulására. A közös ezekben a kórképekben, hogy valamennyi a *GATA2* gén csíravonali mutációjának következtében alakul ki. Munkacsoportunk genetikai vizsgálómódszert állított be a *GATA2* gén mutációinak analízisére a teljes kódoló régióban és vizsgálataink óta egy esetben azonosítottunk *GATA2* mutációt egy típusos MONOMac szindróma klinikai képét mutató 40 éves nőbetegben, aki azóta szoros klinikai monitorozás alatt áll. Felvetődik, hogy egy olyan

klínikai marker esetében, mint a *GATA2* csírvonali mutáció, mely az irodalmi adatok alapján nagy penetranciával hoz létre malignus fenotípust, megoldás lehet-e a hordozók még egészséges stádiumban történő transzplantációja (15, 76, 78). Az általunk azonosított *GATA2* mutáció képe látható a 25.-ös ábrán.



25. ábra: A munkacsoportunk által azonosított első magyarországi MonoMAC szindrómában szenvedő gyermekben talált bizonyítottan patogenetikusan c.1192 C>T (p. R398W) pontmutáció.

Az irodalomban legrégebben ismert familiáris hematólógiai kórkép a vérlemezke funkciózavar, mely fokozott malignitási rizikóval jár együtt (42). Az elmúlt évtizedekben egyre több ilyen betegséget hordozó családot sikerült megismerni, a legszélesebb irodalmi leírással rendelkező familiáris myeloid kórkép lett, illetve sikerült feltárni a betegség hátterében álló genetikai eltérésként a *RUNX1* gén mutációját (11, 46, 49, 51, 52, 58). A kórkép érdekessége, hogy míg egyes egyéneknél csupán enyhe, vagy szubklinikai vérzészavart hoz létre, addig az esetek ~40%-ban MDS/AML megjelenését okozhatja. A kórkép kialakulásához feltehetően egyéb genetikai mechanizmusok, addicionális hatások is hozzájárulnak. Az elsőként feltételezett ilyen szekunder eltérés a második, vad típusú *RUNX1* allél elvesztése, vagy mutációja az onkogenezis során. Preudhomme és munkacsoportja az általuk vizsgált betegcsoportban az egyik leggyakoribb szekunder eltérésként írta le (57). Szintén a klínikai heterogenitás hátterében álló érdekes megfigyelés a különböző típusú *RUNX1* mutációk különböző

klínikai viselkedést eredményező betegséget kiváltó hatása. Antony-Debré és munkacsoportja írta le, hogy az ún. domináns negatív (DN) hatással bíró *RUNX1* mutációk magasabb rizikót jelentenek a malignitás megjelenésére, mint a funkcióvesztéses (LOF) típusú mutációk (93). A közelmúltban került felfedezésre egy újabb szekunder genetikai komponens, melyet Yoshimi és munkacsoportja azonosított, a *CDC25* gént érintő mutációkat. A *CDC25* egy tirozin foszfatáz, mely a sejtciklus szabályozásában vesz részt. Munkájuk során FPD-AML-ben a daganat kialakulásának stádiumában, domináns, korai klónban megjelenő mutációként találták meg, amihez további addicionális mutációk is társultak kisebb klóntömeeggel, mint például érdekességképpen a *GATA2* gén mutációi (95). Mindazonáltal, ezt a japán FPD-AML családokban tett felfedezést további európai és amerikai tanulmányokban sem sikerült megerősíteni, ami akár etnikai különbségek meglétére is utalhat a különböző esetek között.

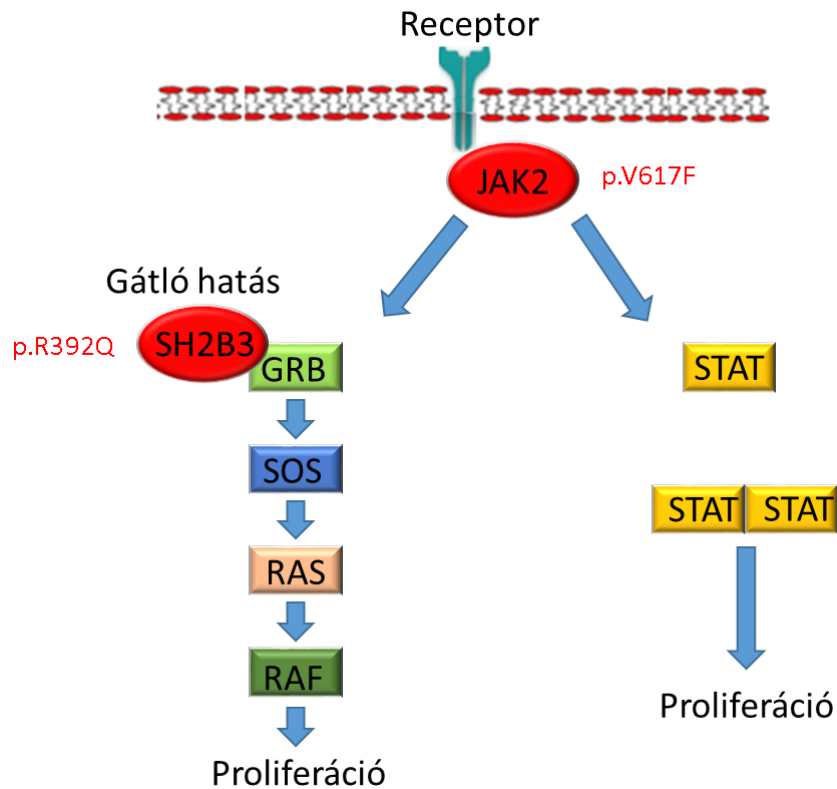
Az általunk azonosított, rendkívül érdekes klínikai történettel bíró, FPD-AML családban (IV.) heterogén klínikai kép volt látható, de az AML fenotípusával érintett egyéneknél igen nagy penetranciával jelent meg a malignitás. A családban elsőként a dizigóta ikergyermekek (II.1-2) váltak érintetté, szinte egy időben, 5 éves korukban kerültek diagnózisra MDS talaján kialakult sAML-lel. Kezelésük sajnálatosan sikertelennek bizonyult és mindketten betegségük szövődésében elhunytak. 10 év elteltével a család negyedik gyermeke (II.4) születésétől kezdve hematológiai követés alatt állt trombocitopénia miatt. Hasonlóan 5 éves korában vált érintetté, AML M4 alakult ki nála, az egy évvel korábbi csontvelői vizsgálatában ezt megelőzően már diszplasztikus eltérések voltak azonosíthatóak. Az ikergyermekek esetén komplex citogenetikai elérések voltak láthatóak, a II.1-es gyermek esetében a +21q a *RUNX1* mutáns allél amplifikációjához járult hozzá. A II.2-es gyermekben a citogenetikai vizsgálatok alapján, három klón is jelen volt a diagnóziskor (7 del, 12 del és + iso 9). A II.4-es gyermek nem hordozott citogenetikai eltérést. A családnál a *RUNX1* p.R201* mutációját azonosítottuk, amely ismert patogenetikus, trunkáló, LOH jellegű mutáció. A LOH jellegű mutációk általában trunkáló jellegűek, míg a Runt domént érintő pontmutációk DN hatásúak, az ép allélról átíródó géntermékre (59).

A családban megfigyelt nagyfokú klínikai heterogenitás okainak feltárására végzett teljes exom szekvenálás (WES) során átlagosan 11 szomatikus eltérést (SNV)

azonosítottunk egyénenként. A szülői genomokhoz hasonlítva ki tudtuk zárni ezek örökletességét, illetve a WES segítségével az egyéb ismert patognomikus gének mutációit.

E családban egy új, korábban, FPD-AML-ben még nem azonosított kooperáló mutációs mechanizmust azonosítottunk. A három, agresszív fenotípust mutató, AML-ben szenvedő gyermekben minden esetben a JAK-STAT jelátvitel érintettségét láthattuk. A II.2-es és 4-es gyermekben a *JAK2* V617F mutációját azonosítottuk. A II.1-es gyermekben az *SH2B3* gén p.R392Q mutációját találtuk meg. A II.2-es gyermekben a *JAK2* mutáció homozigótává vált a 9-es kromoszóma rövid karját érintő aUPD miatt (V617F VAF 68%), míg a II.1-es gyermekben a 12-es kromoszóma hosszú karját érintő aUPD miatt az *SH2B3* mutáció vált homozigóta jellegűvé (R392Q VAF 68%), így növelve a mutáns allél tömeget, hozzájárulva a mutáció erőteljesebb fenotípusbeli megnyilvánulásához.

Az *SH2B3* gén szerepe már régóta ismert volt a *JAK2* negatív myeloproliferatív neoplazmákban, bár a gén mutációinak előfordulása a *JAK2* mutációkhoz viszonyítva lényegesen ritkább (96, 97). A 26. ábrán látható a JAK-STAT jelátvitel sémás ábrázolása, feltüntetve az *SH2B3* részvétele is, mely számos citokin jelátvitelt szabályozni képes, továbbá a JAK-STAT jelátvitelben gátló hatást tölt be. A gén mutációi a közelmúltban leírásra kerültek továbbá még ALL-ben és JMML-ban, túlaktiválódó RAS jelátvitelt és agresszív betegség lefolyást eredményezve (98, 99). Ismerve az *SH2B3* élettani szerepét és a klinikai képet látva eredményeink azt mutatják, hogy az *SH2B3* mutációja, szintén a JAK-STAT jelátvitel túlaktiválódásán keresztül vezetett a malignus fenotípus megjelenéséhez, a homozigótává válás pedig fokozta a mutáció károsító hatását az érintett beteg gyermekben.



26. ábra: A JAK-STAT jelátvitel, az általunk azonosított családban talált érintett *JAK2* és *SH2B3* gének pirossal jelölve. Az általunk bemutatott FPD-AML családban a II.1-es gyermekben mutációt találtunk az *SH2B3* génben, míg a II.2-es és II.4-es gyermekben a *JAK2* génben. A mutációk piros színnel feltüntetve.

A *JAK2* és *SH2B3* gének mutációinak előfordulása sporadikus AML-ben meglehetősen ritka (<5%, <1%), jelen családban látható halmozódásuk és együttes előfordulásuk felveti valamilyen JAK-STAT jelátvitelt vulnerabilissá tévő tényezőnek az esetleges szerepét (100). Felvetődött az ismert *JAK2* 46/1 haplotípus esetleges hajlamosító szerepe is. A 46/1 haplotípus egy 4 nukleotidból álló SNP kombináció a *JAK2* gén intronikus régióiban, mely együttesen előfordulva (GGCC) homo- és heterozigóta formában is hajlamosít az adott allélon a V617F mutáció megjelenésére. A 46/1 haplotípussal a kapcsoltsági öröklődés szabályai alapján együtt öröklődő rs12340895 ún. zászló SNP szűrésével, könnyen vizsgálható az SNP kombináció előfordulása az egyénben (101). Vizsgálataink során a klinikailag tünetmentes édesanya (I.1) homozigóta típusúnak bizonyult a 46/1 haplotípusra nézve, míg az édesapa

homozigóta non-46/1 haplotípust hordozott. A gyermekekben heterozigóta formában fordult elő a haplotípus. A V617F mutáció mindkét gyermekben a haplotípust hordozó allélon fordult elő, továbbá a II.2-es gyermek esetében a 9-es kromoszóma rövid karját érintő aUPD a rs12340895 zászló SNP homozigótává válását is eredményezte, egybevégyva az irodalmi adatokkal (102).

A fent részletezett kulcsfontosságú konvergens evolúciót mutató genetikai eltéréseken felül, azonosítottunk további mutációkat is az érintett családtagokban. A *CDC27* pontmutációját találtuk meg a II.2-es (I634T, VAF 16.7%) és II.3-as (I493V, VAF 7.5%) gyermekekben. A II.2-es gyermekben megtaláltuk az *RBBP8* gén mutációját (E320G, VAF 32.3%), mely gén a retinoblasztóma fehérje kötőfehérjéjét kódolja, így a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet. A II.4-es gyermekben továbbá az *U2AF2* mutációját azonosítottuk (Q147E, VAF 41.2%), melynek mutációi kis százalékban (<5%) ismertek sporadikus MDS-ben (103). A *CDC27* a fent említett *CDC25c* egyik „testvér” génje, mely az anafázis promótáló komplex (APC) egyik tagja, mely a cyclin-B ubiquitin mediálta lebomlásáért felelős, elősegítve a sejtciklus stabilitását. Mivel a *CDC25c* szomatikus mutációja FPD-tAML-ben eddig csak ázsiai betegpopulációban került leírásra, ez érdekes etnikai különbségre hívhatja fel a figyelmet az onkogenezis kapcsán.

Fenti eredményeink validálásán túl arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a fent látott JAK-STAT illetve *RUNX1* konstelláció milyen gyakran fordul elő sporadikus AML-ben. 59 AML-ben szenvedő beteg csontvelői mintáiban szűrtük a *JAK2* V617F mutációt, az *SH2B3* valamint a *RUNX1* teljes kódoló régióját. Hét esetben találtunk *RUNX1* sporadikus mutációt, ebből egy esetben társult a *RUNX1* mutáció a *JAK2* V617F mutációval, ellenben a vizsgált eseteink közt egyszer sem fordult elő együttesen az *SH2B3* gén mutációjával. Ebből arra következtethetünk, hogy az általunk azonosított kooperáló mechanizmus nem jellemző a sporadikus AML-re.

A *JAK2* és *RUNX1* gének mutációinak együttes előfordulása az MPN-ek irodalmában szintén ismert. A *JAK2* V617F mutációt hordozó MPN, sAML-be történő transzformációja során ismert a *RUNX1* mutáció megjelenése, mint szekunder genetikai eltérés, ám az általunk megfigyelt esetben ez időben fordított sorrendben történt (104). Annak eldöntésére, hogy a jelen családnál látott nagy malignitású betegség megjelenését valóban a JAK-STAT jelátvitel okozza, a tünetmentes hordozó I.1-es és II.3-as személyek mintájából a *JAK2* exon 14 és *SH2B3* teljes kódoló régiójának ultra mély szekvenálását

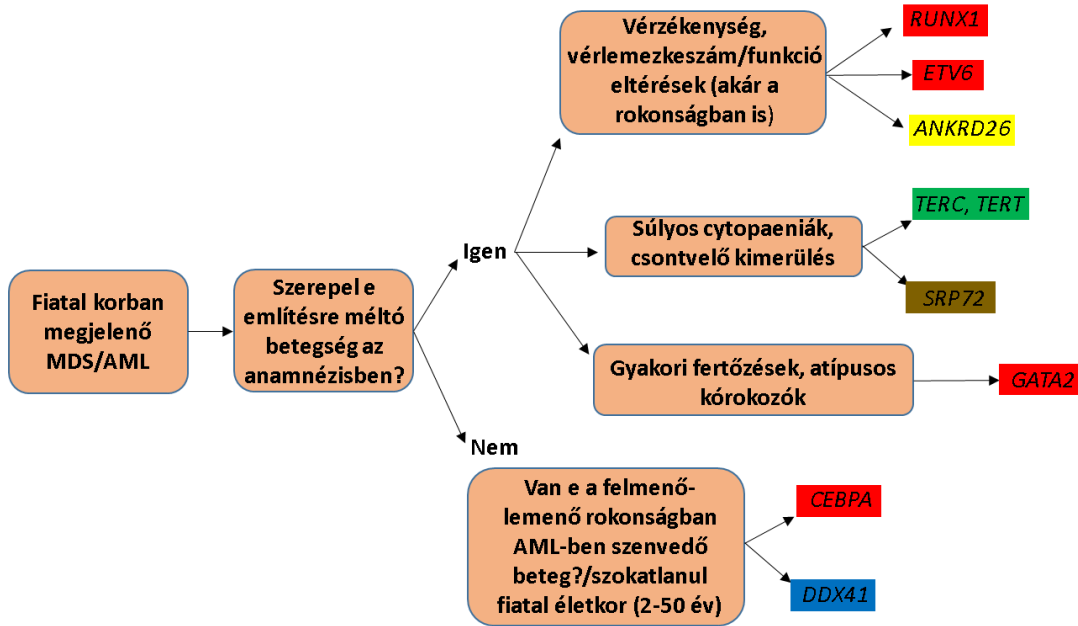
végeztük el. (10.000 x-es mélységgel) Az agresszív megjelenésű betegséget eredményező JAK-STAT jelátvitelt érintő mutációk az esetükben nem voltak jelen, ez által igazolni tudtuk, hogy megjelenésük valóban az agresszív lefolyású kórkép kialakulásának kulcslépése.

Az általunk azonosított *RUNX1* p.R201* mutáció funkcióvesztéses mutáció (LOF) mely a vad allélról átíródó géntermék funkcióját nem befolyásolja. A jelen dolgozatban bemutatott családban az egyik legérdekesebb jelenség, hogy az I.1-es személy, a mutációt hordozó édesanya 40 éve teljesen tünetmentes mutáció hordozó. Az esetében látott jelenség hátterében megvizsgáltuk, hogy lehet-e védő szerepe a vad allélról átíródó *RUNX1* fehérjének, mely mintegy „pufferelő” hatást fejt ki és ellensúlyozza a mutáns allérről átíródó trunkált fehérje káros hatását a hemopoézisre. A vizsgálat alapfelvetését az adta, hogy valós idejű PCR expressziót követően az I.1-es anyánál magasabb össz-*RUNX1* expressziót kaptunk, mint a II.4-es gyermeknél. Ennek eldöntésére, hogy a magasabb expressziót melyik kópia adja digitális PCR-t végeztünk (dPCR). Érdekes módon az alapfelvetéssel teljesen ellentétes eredményt kaptunk. Meglepő módon ugyan is az I.1.-es anya mintájából kiindulva magasabb mutáns *RUNX1* expressziót tapasztaltunk, mint a II.4.-es beteg gyermek esetében.

A fentiekben túl meg kívántuk még határozni a WES-ből nyert VAF értékek alapján a tumorsejt frakciót (CCF) melynek segítségével következtethetünk a mutációk kialakulásának időrendi sorrendjére az érintett betegekben. A 0. lépés minden esetben a *RUNX1* csíravonali mutáció volt, ez indította el a patogenetikai folyamatokat, melyek a betegség megjelenéséhez vezettek. A II.1-es ikergyermek esetében az első lépés volt az *SH2B3* mutáció megjelenése, mely a JAK-STAT jelátvitel túlaktiválódását indította el feltételezésünk szerint. A mutáns allél káros hatását tovább emelte, hogy a 12-es kromoszóma rövid karját érintő aUPD miatt a mutáció homozigótává vált, emelve így a mutáns fehérje mennyiségét a sejtekben. Ezt követte a 21-es kromoszóma nyereség, mellyel a mutáns *RUNX1* fehérje mennyisége növekedett meg a sejtekben. A II.2-es ikergyermek esetében a fentiekhez hasonlóan az első lépés a JAK-STAT jelátvitelt patológiásan túlaktiváló V617F mutáció megjelenése, majd homozigótává válása (aUPD a 9-es kromoszóma hosszú karján) követte, fokozva a mutáns fehérje károsító hatását. A *CDC27* és az *RBBP8* mutációk szubklonálisak voltak, csak a tumorsejtek kis százalékában jelentek meg. A mutációk kronológiáját a 21. ábra szemlélteti. Visszaulva a fentebb

említett *RUNX1-JAK2* kooperációra MPN-sAML esetében, jelen család példáján is sikerült bizonyítani a kooperáló mechanizmus jelentőségét, a mutáció megjelenésének sorrendiségét tekintve azonban fordított sorrendben.

Jelen dolgozat témáját a fenti családok bemutatásán túl, a magyarországi familiáris hematológiai betegek azonosítása és egy diagnosztikus mutációanalízist magába foglaló algoritmus bevezetése is adja. Familiáris vérlemezke-funkciózavar és ennek talaján kialakult MDS miatt került a látótérbe a fentebb bemutatott I-es számú család is ahol azonban nem sikerült azonosítani az eddig ismert familiáris hajlamosító gének közül egyik esetben sem a mutáció jelenlétét. Különösen a *RUNX1*, az *ETV6*, illetve az *ANKRD26* gének esetében vártunk volna genetikai eltérést, de jelen példa is azt mutatja, hogy az FPD-AML genetikai feltérképezése még koránt sem teljes, várhatóak még újabb gének, melyek mutációi a háttérben állhatnak. Valamennyi eddig ismert familiáris hematológiai kórképre hajlamosító gén analízisére metodikát állítottunk be laborunkban és elkezdtük egybegyűjteni a hazánkban előforduló familiáris eseteket. Jelen dolgozatban az első négy dokumentált család került bemutatásra, de ezen túlmenően is azonosítottunk eseteket, ahol bár az örökletesség nem bizonyítható, a patognomikus mutációt sikerült kimutatni, pl. a fent említett MonoMac-szindrómánál, illetve egy esetben biallélikus *CEBPA* mutáció háttérében azonosítottunk csíravonali N-komponens mutációt. Az eddig említett *CEBPA*, *DDX41*, *GATA2*, *RUNX1*, *ETV6*, *ANKRD26* szűrésen kívül beállítottuk továbbá a *TERC/TERT* és az *SRP72* gének mutációinak, illetve mutációs forrópontjainak szűrési lehetőségét. Az Orvosi Hetilapban bemutattunk egy diagnosztikus algoritmust (2016, 157. évfolyam, 8. szám, 283–289.), melyet Babushok és munkacsoportjának ajánlásai alapján, módosítva alkottunk meg (105). Az algoritmus a 27. ábrán látható.



27. ábra: A Babushok és kollégái ajánlásai alapján módosított algoritmus, mely alapján laboratóriumunk létrehozta a familiáris hematológiai kórképek szűrésének lehetőségét Hazánkban, amely a klinikai adatok függvényében irányt mutat, mely gén mutációs státuszát érdemes megvizsgálni az érintett betegnél.

Különös aktualitását adja ennek a tény, hogy bár a 2016-os WHO klasszifikációba már beemelték a csíravonali prediszpozíciós tényezővel rendelkező familiáris hematológiai kórképeket, a diagnosztika és a szűrés eddig még nem volt része a rutin diagnosztikának. Az ELNET (European Leukemia Network) 2017-es ajánlásába is bekerült, hogy AML esetében amennyiben klinikai gyanú áll fenn, el kell végezni a csíravonali hajlamosító tényező szűrését is a rutin diagnosztika részeként (106). A betegségek biológiájának megértésén túl a mindennapi klinikai gyakorlatban is fontos jelentősége van a familiáris esetek felismerésének és elkülönítésének. Godley, Churpek és munkacsoportjaik már 2013-ban klinikai ajánlásokat fogalmaztak meg a familiáris esetek klinikai követésére és kezelésére (107). Ennek 2016-ban egy frissített verzióját is kiadták a szerzők, mely napjainkban irányadó a betegek klinikai gondozásában. Ebben felvetik, hogy minden olyan esetben kezdeményezni kell a csíravonali mutáció meghatározását ha: egy családon belül kettő vagy több esetben fordul elő MDS/AML, citopéniák, aplasztikus anémia, családokban ahol MDS/AML és egyéb szervi

manifesztációk, fejlődési rendellenességek halmozódva fordulnak elő, biallélikus *CEBPA* mutáció esetén és minden serdülő gyermekben előforduló MDS esetében, *GATA2* csírvonali mutáció irányába (30). A szerzők továbbá pontos követési, monitorozási algoritmusokat bocsájtanak rendelkezésünkre, ami a kórképek egyre bővülő ismeretét tekintve időszerű. Napjainkban a csontvelő-transzplantáció eredményei javulnak, a szupportációs technológiák fejlődésének köszönhetően. A familiáris hematológiai esetek azonban új helyzetet teremtenek a transzplantációt végző team-ek számára hiszen a transzplantáció időzítése, a donorforrás keresése és az egészséges mutáció hordozók követése mind speciális eljárást igényel a familiáris hematológiai kórképek esetén. A mutációt hordozó de egészséges egyéneknél is szükséges a csontvelő biopszia elvégzése és a szoros vérképkontroll. A betegek kezelése nem tér el a sporadikus esetekétől, egészen a csontvelő-transzplantáció pillanatáig, de a kondicionálás és a csontvelődonor kérdésében már különlegesen kell eljárni. A családon belüli összes donorforrást előzetesen szűrni kell a mutációhordozás szempontjából (30).

Munkacsoportunk hazánkban elkezdte a familiáris hematológiai kórképek összegyűjtését, továbbá diagnosztikus panelt hoztunk létre és ma már felmerülő klinikai gyanú esetén a mindennapi diagnosztika részeként, vizsgáljuk a betegeket valamennyi esetben az ismert hajlamosító gének tekintetében. A fent bemutatott FPD-AML család példáján keresztül a betegség biológiájának megértéséhez juthattunk közelebb és remélhetőleg újabb hajlamosító gének kimutatásával és kooperáló mechanizmusok feltárásával, egyre mélyebben megismerhetjük ezt az igen szerteágazó új betegcsoportot. Mindezek alapjául szolgálhatnak e ritka és különleges betegcsoport pontosabb diagnosztikájának és rizikóbecslésének, végeredményben a betegek pontosabb követését és sikeresebb kezelését eredményezhetik Magyarországon.

VII. Következtetések

A disszertáció főbb megállapításai az alábbi pontokban foglalhatóak össze:

- Munkánk során azonosítottuk az első négy, myeloid malignus hematológiai betegség-halmozódást mutató családot Magyarországon.
- A részletes genetikai vizsgálat eredményeképpen három család esetében az eddig ismert valamennyi hajlamosító tényező vizsgálata negatívnak bizonyult, utalva arra, hogy ezek háttérében feltehetően még nem azonosított germline eltérés állhat.
- Az FPD-AML-ben szenvedő család (IV) esetében a *RUNX1* gén p.R201* csírvonali mutációját azonosítottuk.
- A IV. családnál látható nagyfokú heterogenitás háttérében egy új kooperáló mechanizmust azonosítottunk, amely a *RUNX1* germline hajlamosító mutáció, valamint a JAK-STAT jelpálya komponenseinek (*JAK2* és *SH2B3*) konvergens evolúciója jellemez.
- Az általunk megvizsgált sporadikus AML esetekben ritkán fordulnak elő a *RUNX1* és a JAK-STAT jelpálya komponenseinek (*JAK2* és *SH2B3*) együttes mutációi.
- Jelen értekezés keretén belül elvégzett munka eredményeképpen immár rendelkezésre áll a familiáris myeloid daganatok háttérében álló valamennyi ismert genetikai eltérés rutinszerű diagnosztikus vizsgálata Magyarországon.

VIII. Összefoglalás

A hematológiai kórképek családi halmozódása régóta ismert jelenség, ám a kórképek genetikai hátterét csak az elmúlt egy évtizedben kezdtük el megismerni. Napjainkra egyre színesebb kép rajzolódik ki az érintett génekről és irányelvek is születtek a speciális klinikai helyzetet teremtő betegségek kezeléséről, azonban a rutin diagnosztikában még nem honosodott meg a genetikai szűrés. A 2016-os WHO klasszifikációnak megfelelően a *CEBPA*, a *RUNX1*, az *ANKRD26*, az *ETV6*, a *GATA2*, a *TERT/TERC* és az *SRP72* gének csírvonalbeli mutációi ismertek a familiáris myeloid daganatok hátterében. Hazánkban mindezidáig ezen kórképek előfordulásáról illetve genetikai jellemzőiről nem állt rendelkezésre adat.

Munkacsoportunk célul tűzte ki a familiáris myeloid hematológiai daganatok előfordulásának vizsgálatát Magyarországon, Az újonnan azonosított esetek hátterében feltételezhetően álló öröklődő genetikai eltérések vizsgálatát. Munkánk során sikerrel azonosítottunk négy családot, ahol myeloid malignitás családi halmozódását figyeltük meg. Az első magyarországi FPD-AML családban, ahol négy gyermek volt érintett MDS/AML-lel, azonosítottuk a *RUNX1* gén p.R201* stop kodont eredményező mutációját. A családot modellként használva, a klinikai heterogenitás hátterében teljes exomszekvenálás segítségével egy új kooperáló mechanizmust azonosítottunk, amit a *RUNX1* germline hajlamosító mutáció, valamint a JAK-STAT jelpálya komponenseinek (*JAK2* és *SH2B3*) konvergens evolúciója jellemez, és melynek megjelenése agresszív betegség lefolyást eredményezett. A többi család esetében az eddig ismert genetikai hajlamosító tényezők mutációi nem jelentek meg, ami alátámasztja azt az elképzelést mely szerint a familiáris hematológiai kórképek hátterében álló gének listája még korántsem teljes.

A familiáris hematológiai kórképek megkülönböztetett figyelmet érdemelnek a sporadikus esetek közt, nem csupán azért mert kiváló biológiai modellként szolgálnak a betegség megismerésére, hanem mert különleges figyelmet érdemelnek mind a transzplantáció, mind az egészséges hordozók követésének tekintetében. A munkánk során beállított genetikai vizsgálómódszerek immár rendelkezésre állnak a magyarországi familiáris hematológiai kórképek vizsgálatára.

IX. Summary

Although genetic predisposition to haematological malignancies has long been known, genetic testing is not yet part of the routine diagnostics. In the last ten years, next generation sequencing based studies identified novel germline mutations in the background of familial aggregation of certain hematologic disorders including myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). The 2016 WHO classification of myeloid tumors includes a new category: the myeloid neoplasms with germ line predisposition. According to the new classification, the germline mutations of *CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*, *TERT/TERC*, *GATA2* or *SRP72* genes are characteristic features of the familial myeloid malignancies. The incidence and genetic background of familial haematological malignancies (FH) has not yet been studied in Hungary.

Our aim was to study the incidence of familial myeloid malignancies in Hungary and to perform analysis of the culprit predisposition genes in the newly identified families. We identified four families with apparent clustering of myeloid malignancies. The first Hungarian FPD-AML family with four affected siblings was characterized by germ line p.R201* mutation of the *RUNX1* gene. Using this novel *RUNX1*-mutated family as a model, we identified a novel co-operating molecular mechanism in the background of the observed clinical heterogeneity, characterized by concurrent *RUNX1* and JAK-STAT mutations and convergent evolution of these alterations. In case of the remaining three families we identified no mutations in the background of the autosomal dominant inheritance pattern. This finding supports the fact that additional genetic factors in the background of FH's remain to be identified.

FH's represent a peculiar group of disorders. They not only represent unique models to understand the biology and pathomechanism of leukaemias, but they also need a special clinical attention with respect of bone marrow donor selection and monitoring of healthy mutation carriers. The diagnostic assays developed as part of this work are now available for routine mutation screening of familial myeloid malignancies in Hungary.

X. Irodalomjegyzék

1. Birbrair A, Frenette PS. (2016) Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*;1370(1):82-96.
2. Avellino R, Delwel R. (2017) Expression and regulation of C/EBPalpha in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*;129(15):2083-91.
3. Katsumura KR, Bresnick EH. (2017) The GATA factor revolution in hematology. *Blood*;129(15):2092-102.
4. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. (2017) Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*;129(15):2070-82.
5. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*;373(12):1136-52.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*;127(20):2391-405.
7. Rajnai H, Kiraly AP. (2017) [Pathogenesis and genetic landscape of acute myeloid leukemia]. *Magyar onkologia*;61(1):21-8.
8. Anderson RC. (1951) Familial leukemia; a report of leukemia in five siblings, with a brief review of the genetic aspects of this disease. *AMA Am J Dis Child*;81(3):313-22.
9. Dowton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. (1985) Studies of a familial platelet disorder. *Blood*;65(3):557-63.
10. Duployez N, Lejeune S, Renneville A, Preudhomme C. (2016) Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with genetic predispositions: a new challenge for hematologists. *Expert Rev Hematol*;9(12):1189-202.
11. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM, Gilliland DG. (1999) Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*;23(2):166-75.
12. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. (2004) Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*;351(23):2403-7.
13. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro G, Pecci A, Gnan C, Punzo F, Marconi C, Gherardi S, Loffredo G, De Rocco D, Scianguetta S, Barozzi S, Magini P, Bozzi V, Dezzani L, Di Stazio M, Ferraro M, Perini G, Seri M, Balduini CL. (2011) Mutations

in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet*;88(1):115-20.

14. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, Gulsuner S, Pritchard CC, Sanchez-Bonilla M, Delrow JJ, Basom RS, Forouhar M, Gyurkocza B, Schwartz BS, Neistadt B, Marquez R, Mariani CJ, Coats SA, Hofmann I, Lindsley RC, Williams DA, Abkowitz JL, Horwitz MS, King MC, Godley LA, Shimamura A. (2015) Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*;47(2):180-5.

15. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Stary J, Hasle H, Masetti R, Dworzak M, Schmutz M, van den Heuvel-Eibrink M, Ussowicz M, De Moerloose B, Catala A, Smith OP, Sedlacek P, Lankester AC, Zecca M, Bordon V, Matthes-Martin S, Abrahamsson J, Kuhl JS, Sykora KW, Albert MH, Przychodzien B, Maciejewski JP, Schwarz S, Gohring G, Schlegelberger B, Cseh A, Noellke P, Yoshimi A, Locatelli F, Baumann I, Strahm B, Niemeyer CM. (2016) Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood*;127(11):1387-97; quiz 518.

16. Armanios M. (2009) Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet*;10:45-61.

17. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, Singh J, Padgett RA, Gu X, Phillips JG, Clemente M, Parker Y, Lindner D, Dienes B, Jankowsky E, Sauntharajah Y, Du Y, Oakley K, Nguyen N, Mukherjee S, Pabst C, Godley LA, Churpek JE, Pollyea DA, Krug U, Berdel WE, Klein HU, Dugas M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Yoshida K, Ogawa S, Muller-Tidow C, Maciejewski JP. (2015) Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*;27(5):658-70.

18. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, Ellison A, Lowe R, Tummala H, Rio-Machin A, Collopy L, Al Seraihi A, Wallis Y, Page P, Akiki S, Fitzgibbon J, Vulliamy T, Dokal I. (2016) Germline heterozygous DDX41 variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*;30(10):2083-6.

19. Li R, Sobreira N, Witmer PD, Pratz KW, Braunstein EM. (2016) Two novel germline DDX41 mutations in a family with inherited myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Haematologica*;101(6):e228-31.

20. Kirwan M, Walne AJ, Plagnol V, Velangi M, Ho A, Hossain U, Vulliamy T, Dokal I. (2012) Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *Am J Hum Genet*;90(5):888-92.

21. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, Pasquier F, Valle VD, Secardin L, Leroy G, Mahfoudhi E, Grosjean S, Droin N, Diop M, Dessen P, Charrier S, Palazzo A, Merlevede J, Meniane JC, Delaunay-Darivon C, Fuseau P, Isnard F, Casadevall N,

- Solary E, Debili N, Bernard OA, Raslova H, Najman A, Vainchenker W, Bellanne-Chantelot C, Plo I. (2015) Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet*;47(10):1131-40.
22. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, Feenstra JD, Cavalloni C, Roncoroni E, Casetti I, Bellini M, Milanesi C, Renna MC, Gotti M, Astori C, Kralovics R, Cazzola M. (2016) LNK mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*;128(1):144-5.
23. Harutyunyan AS, Giambruno R, Krendl C, Stukalov A, Klampfl T, Berg T, Chen D, Milosevic Feenstra JD, Jager R, Gisslinger B, Gisslinger H, Rumi E, Passamonti F, Pietra D, Muller AC, Parapatics K, Breitwieser FP, Herrmann R, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G, Cazzola M, Hammond E, Kralovics R. (2016) Germline RBBP6 mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*;127(3):362-5.
24. Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, Wechsler J, Yang J, Hayes J, Klein RJ, Zhang J, Wei L, Wu G, Rusch M, Nagahawatte P, Ma J, Chen SC, Song G, Cheng J, Meyers P, Bhojwani D, Jhanwar S, Maslak P, Fleisher M, Littman J, Offit L, Rau-Murthy R, Fleischut MH, Corines M, Murali R, Gao X, Manschreck C, Kitzing T, Murty VV, Raimondi SC, Kuiper RP, Simons A, Schiffman JD, Onel K, Plon SE, Wheeler DA, Ritter D, Ziegler DS, Tucker K, Sutton R, Chenevix-Trench G, Li J, Huntsman DG, Hansford S, Senz J, Walsh T, Lee M, Hahn CN, Roberts KG, King MC, Lo SM, Levine RL, Viale A, Socci ND, Nathanson KL, Scott HS, Daly M, Lipkin SM, Lowe SW, Downing JR, Altshuler D, Sandlund JT, Horwitz MS, Mullighan CG, Offit K. (2013) A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*;45(10):1226-31.
25. Neven B, Mamessier E, Bruneau J, Kaltenbach S, Kotlarz D, Suarez F, Masliah-Planchon J, Billot K, Canioni D, Frange P, Radford-Weiss I, Asnafi V, Murugan D, Bole C, Nitschke P, Goulet O, Casanova JL, Blanche S, Picard C, Hermine O, Rieux-Laucat F, Brousse N, Davi F, Baud V, Klein C, Nadel B, Ruemmele F, Fischer A. (2013) A Mendelian predisposition to B-cell lymphoma caused by IL-10R deficiency. *Blood*;122(23):3713-22.
26. Goldin LR, Pfeiffer RM, Gridley G, Gail MH, Li X, Mellekjaer L, Olsen JH, Hemminki K, Linet MS. (2004) Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer*;100(9):1902-8.
27. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. (2004) Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*;104(6):1850-4.
28. Ristolainen H, Kilpivaara O, Kamper P, Taskinen M, Saarinen S, Leppa S, d'Amore F, Aaltonen LA. (2015) Identification of homozygous deletion in ACAN and other candidate

variants in familial classical Hodgkin lymphoma by exome sequencing. *Br J Haematol*;170(3):428-31.

29. de Lange T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*;19(18):2100-10.

30. Churpek JE, Godley LA. (2016) How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*.

31. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. (1998) CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*;18(7):4301-14.

32. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. (2008) Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*;22(5):915-31.

33. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. (2001) Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*;27(3):263-70.

34. Debeljak M, Kitanovski L, Pajic T, Jazbec J. (2013) Concordant acute myeloblastic leukemia in monozygotic twins with germline and shared somatic mutations in the gene for CCAAT-enhancer-binding protein alpha with 13 years difference at onset. *Haematologica*;98(7):e73-4.

35. Nanri T, Uike N, Kawakita T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. (2010) A family harboring a germ-line N-terminal C/EBPalpha mutation and development of acute myeloid leukemia with an additional somatic C-terminal C/EBPalpha mutation. *Genes Chromosomes Cancer*;49(3):237-41.

36. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bodor C, Hills R, Loveday C, Savic A, Van Delft FW, Treleaven J, Georgiades P, Uglow E, Asou N, Uike N, Debeljak M, Jazbec J, Ancliff P, Gale R, Thomas X, Mialou V, Dohner K, Bullinger L, Mueller B, Pabst T, Stelljes M, Schlegelberger B, Wozniak E, Iqbal S, Okosun J, Araf S, Frank AK, Lauridsen FB, Porse B, Nerlov C, Owen C, Dokal I, Gribben J, Smith M, Preudhomme C, Chelala C, Cavenagh J, Fitzgibbon J. (2015) Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood*;126(10):1214-23.

37. Wen XM, Lin J, Yang J, Yao DM, Deng ZQ, Tang CY, Xiao GF, Yang L, Ma JC, Hu JB, Qian W, Qian J. (2014) Double CEBPA mutations are prognostically favorable in non-M3 acute myeloid leukemia patients with wild-type NPM1 and FLT3-ITD. *Int J Clin Exp Pathol*;7(10):6832-40.

38. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschuieren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. (2009) Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*;113(13):3088-91.
39. Godley LA. (2014) Inherited predisposition to acute myeloid leukemia. *Semin Hematol*;51(4):306-21.
40. Cordin O, Hahn D, Beggs JD. (2012) Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Curr Opin Cell Biol*;24(3):431-8.
41. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, Phung C, Rafidi G, Lee MK, Schreiber AW, Feng J, Babic M, Chong CE, Lee Y, Yong A, Suthers GK, Poplawski N, Altree M, Phillips K, Jaensch L, Fine M, D'Andrea RJ, Lewis ID, Medeiros BC, Pollyea DA, King MC, Walsh T, Keel S, Shimamura A, Godley LA, Hahn CN, Churpek JE, Scott HS. (2016) Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood*;127(8):1017-23.
42. Luddy RE, Champion LA, Schwartz AD. (1978) A fatal myeloproliferative syndrome in a family with thrombocytopenia and platelet dysfunction. *Cancer*;41(5):1959-63.
43. Ho CY, Otterud B, Legare RD, Varvil T, Saxena R, DeHart DB, Kohler SE, Aster JC, Dowton SB, Li FP, Leppert M, Gilliland DG. (1996) Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood*;87(12):5218-24.
44. Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, Goldfinger LE, Dhanasekaran DN, Rao AK. (2010) Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1 haplodeficiency. *Blood*;116(26):6037-45.
45. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*;364(26):2496-506.
46. Ganly P, Walker LC, Morris CM. (2004) Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*;45(1):1-10.
47. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, Cummings CL, Pirola CJ, Marta RF, Kornblihtt LI, Drachman JG, Molinas FC. (2005) Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood*;105(12):4664-70.
48. Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, Gregoire MJ, Bordigoni P, Lecompte T, Leheup B, Jonveaux P. (2008) Clinical phenotype of

germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet*;16(8):1014-8.

49. Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. (2008) A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*;93(1):155-6.

50. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, Jackson SC, Poon MC, Sinclair GD, Leber B, Johnson PR, Macheta A, Yin JA, Barnett MJ, Lister TA, Fitzgibbon J. (2008) Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*;112(12):4639-45.

51. Ripperger T, Steinemann D, Gohring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, Schlegelberger B. (2009) A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia*;23(7):1364-6.

52. Churpek JE, Garcia JS, Madzo J, Jackson SA, Onel K, Godley LA. (2010) Identification and molecular characterization of a novel mutation in RUNX1 in a family with familial platelet disorder. *Leuk Lymphoma*;51(10):1931-5.

53. Nishimoto N, Imai Y, Ueda K, Nakagawa M, Shinohara A, Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. (2010) T cell acute lymphoblastic leukemia arising from familial platelet disorder. *Int J Hematol*;92(1):194-7.

54. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, Antony-Debre I, James C, Debili N, Camara-Clayette V, Wagner-Ballon O, Cordette-Lagarde V, Robert T, Ripoche H, Gonin P, Swierczek S, Prchal J, Vainchenker W, Favier R, Raslova H. (2011) Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood*;118(24):6310-20.

55. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Sato-Otsubo A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. (2012) CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia (FPD/AML). *Blood*;119(11):2612-4.

56. Prebet T, Carbuccia N, Raslova H, Favier R, Rey J, Arnoulet C, Vey N, Vainchenker W, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. (2013) Concomitant germ-line RUNX1 and acquired ASXL1 mutations in a T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*;91(3):277-9.

57. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, Dhedin N, Andre JM, Cornillet-Lefebvre P, Baruchel A, Mozziconacci MJ, Sobol H. (2009) High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood*;113(22):5583-7.

58. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, Baccini V, Alessi MC, Ankri A, Bauters A, Bayart S, Cornillet-Lefebvre P, Daliphard S, Mozziconacci MJ, Renneville A, Ballerini P, Leverger G, Sobol H, Jonveaux P, Preudhomme C, Nurden P, Lecompte T, Favier R. (2016) Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis*;11:49.
59. Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, Shigesada K, Ito Y, Benson KF, Raskind WH, Rossier C, Antonarakis SE, Israels S, McNicol A, Weiss H, Horwitz M, Scott HS. (2002) In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*;99(4):1364-72.
60. Bluteau D, Balduini A, Balayn N, Currao M, Nurden P, Deswarte C, Leverger G, Noris P, Perrotta S, Solary E, Vainchenker W, Debili N, Favier R, Raslova H. (2014) Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J Clin Invest*;124(2):580-91.
61. Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer KY, Bussel JB, Podda GM, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnan C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Miller Imahiyerobo A, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL. (2013) ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood*;122(11):1987-9.
62. Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, Pujol-Moix N, Zecca M, Scognamiglio F, De Rocco D, Punzo F, Melazzini F, Scianguetta S, Casale M, Marconi C, Pippucci T, Amendola G, Notarangelo LD, Klersy C, Civaschi E, Balduini CL, Savoia A. (2011) Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*;117(24):6673-80.
63. Bohlander SK. (2005) ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*;15(3):162-74.
64. Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH. (2004) Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev*;18(19):2336-41.
65. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, Callaghan M, Noris P, Savoia A, Rajpurkar M, Jones K, Gowan K, Balduini CL, Pecci A, Gnan C, De Rocco D, Doubek M, Li L, Lu L, Leung R, Landolt-Marticorena C, Hunger S, Heller P, Gutierrez-Hartmann A, Xiayuan L, Pluthero FG, Rowley JW, Weyrich AS, Kahr WH, Porter CC, Di Paola J. (2015) Germline mutations in ETV6

are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*;47(5):535-8.

66. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, Nishii R, Qian M, Devidas M, Yang W, Cheng C, Cao X, Quinn E, Raimondi S, Gastier-Foster JM, Raetz E, Larsen E, Martin PL, Bowman WP, Winick N, Komada Y, Wang S, Edmonson M, Xu H, Mardis E, Fulton R, Pui CH, Mullighan C, Evans WE, Zhang J, Hunger SP, Relling MV, Nichols KE, Loh ML, Yang JJ. (2015) Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *Lancet Oncol*;16(16):1659-66.

67. Topka S, Vijai J, Walsh MF, Jacobs L, Maria A, Villano D, Gaddam P, Wu G, McGee RB, Quinn E, Inaba H, Hartford C, Pui CH, Pappo A, Edmonson M, Zhang MY, Stepensky P, Steinherz P, Schrader K, Lincoln A, Bussel J, Lipkin SM, Goldgur Y, Harit M, Stadler ZK, Mullighan C, Weintraub M, Shimamura A, Zhang J, Downing JR, Nichols KE, Offit K. (2015) Germline ETV6 Mutations Confer Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia and Thrombocytopenia. *PLoS Genet*;11(6):e1005262.

68. Ding LW, Ikezoe T, Tan KT, Mori M, Mayakonda A, Chien W, Lin DC, Jiang YY, Lill M, Yang H, Sun QY, Koeffler HP. (2016) Mutational profiling of a MonoMAC syndrome family with GATA2 deficiency. *Leukemia*.

69. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, Babic M, Lin M, Carmagnac A, Lee YK, Kok CH, Gagliardi L, Friend KL, Ekert PG, Butcher CM, Brown AL, Lewis ID, To LB, Timms AE, Storek J, Moore S, Aintree M, Escher R, Bardy PG, Suthers GK, D'Andrea RJ, Horwitz MS, Scott HS. (2011) Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*;43(10):1012-7.

70. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, Frucht DM, Vinh DC, Auth RD, Freeman AF, Olivier KN, Uzel G, Zerbe CS, Spalding C, Pittaluga S, Raffeld M, Kuhns DB, Ding L, Paulson ML, Marciano BE, Gea-Banacloche JC, Orange JS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Holland SM. (2011) Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*;118(10):2653-5.

71. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, Dafou D, Kilo T, Smithson S, Lunt P, Murday VA, Hodgson S, Keenan R, Pilz DT, Martinez-Corral I, Makinen T, Mortimer PS, Jeffery S, Trembath RC, Mansour S. (2011) Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet*;43(10):929-31.

72. Collin M, Dickinson R, Bigley V. (2015) Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*;169(2):173-87.

73. Bodor C, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, Cavenagh J, Barnett MJ, Kramarzova K, Krishnan B, Matolcsy A, Preudhomme C, Fitzgibbon J, Owen C. (2012) Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica*;97(6):890-4.
74. Holme H, Hossain U, Kirwan M, Walne A, Vulliamy T, Dokal I. (2012) Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*;158(2):242-8.
75. Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, Arthur DC, Zerbe CS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Rosenzweig SD, Braylan RC, Young NS, Holland SM, Calvo KR. (2015) GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. *Blood*;125(1):56-70.
76. Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, Petit A, Rohrllich P, Ferrand C, Van Den Neste E, Poirel HA, Lamy T, Ouachee-Chardin M, Mansat-De Mas V, Corre J, Recher C, Plat G, Bachelierie F, Donadieu J, Delabesse E. (2013) High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood*;121(5):822-9.
77. Kazenwadel J, Betterman KL, Chong CE, Stokes PH, Lee YK, Secker GA, Agalarov Y, Demir CS, Lawrence DM, Sutton DL, Tabruyn SP, Miura N, Salminen M, Petrova TV, Matthews JM, Hahn CN, Scott HS, Harvey NL. (2015) GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J Clin Invest*;125(8):2979-94.
78. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, Arthur DC, Gu W, Gould CM, Brewer CC, Cowen EW, Freeman AF, Olivier KN, Uzel G, Zelazny AM, Daub JR, Spalding CD, Claypool RJ, Giri NK, Alter BP, Mace EM, Orange JS, Cuellar-Rodriguez J, Hickstein DD, Holland SM. (2014) GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood*;123(6):809-21.
79. Shay JW, Bacchetti S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*;33(5):787-91.
80. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, Alter BP, Savage SA. (2013) Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet*;132(4):473-80.
81. Kirwan M, Vulliamy T, Marrone A, Walne AJ, Beswick R, Hillmen P, Kelly R, Stewart A, Bowen D, Schonland SO, Whittle AM, McVerry A, Gilleece M, Dokal I. (2009) Defining the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Hum Mutat*;30(11):1567-73.

82. Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, Baerlocher GM, Sloand E, Zeng WS, Read EJ, Lansdorp PM, Young NS. (2003) Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet*;362(9396):1628-30.
83. Savage SA, Bertuch AA. (2010) The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med*;12(12):753-64.
84. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. (2009) Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood*;113(26):6549-57.
85. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C, Cazzola M, Lazzarino M. (2007) Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol*;25(35):5630-5.
86. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*;41(4):450-4.
87. Jager R, Harutyunyan AS, Rumi E, Pietra D, Berg T, Olcaydu D, Houlston RS, Cazzola M, Kralovics R. (2014) Common germline variation at the TERT locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*;89(12):1107-10.
88. Ha JS, Jeon DS. (2011) Possible new LNK mutations in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*;86(10):866-8.
89. Lasho TL, Tefferi A, Finke C, Pardanani A. (2011) Clonal hierarchy and allelic mutation segregation in a myelofibrosis patient with two distinct LNK mutations. *Leukemia*;25(6):1056-8.
90. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., Merker JD, Zehnder JL, Nolan GP, Gotlib J. (2010) Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*;116(6):988-92.
91. Koren-Michowitz M, Gery S, Tabayashi T, Lin D, Alvarez R, Nagler A, Koeffler HP. (2013) SH2B3 (LNK) mutations from myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol*;161(6):811-20.
92. Plo I, Bellanne-Chantelot C, Vainchenker W. (2016) ATG2B and GSKIP: 2 new genes predisposing to myeloid malignancies. *Mol Cell Oncol*;3(2):e1094564.
93. Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, Bluteau D, Tomowiak C, Legrand C, Langlois T, Bawa O, Tosca L, Tachdjian G, Leheup B, Debili N, Plo I, Mills JA, French DL, Weiss MJ, Solary E, Favier R, Vainchenker W, Raslova H. (2015) Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*;125(6):930-40.

94. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. (2008) Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*;26(31):5088-93.
95. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M. (2014) Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun*;5:4770.
96. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. (2010) LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med*;363(12):1189-90.
97. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. (2010) LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*;24(10):1713-8.
98. Stieglitz E, Troup CB, Gelston LC, Haliburton J, Chow ED, Yu KB, Akutagawa J, Taylor-Weiner AN, Liu YL, Wang YD, Beckman K, Emanuel PD, Braun BS, Abate A, Gerbing RB, Alonzo TA, Loh ML. (2015) Subclonal mutations in SETBP1 confer a poor prognosis in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*;125(3):516-24.
99. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, Chen SC, Payne-Turner D, Churchman ML, Harvey RC, Chen X, Kasap C, Yan C, Becksfort J, Finney RP, Teachey DT, Maude SL, Tse K, Moore R, Jones S, Mungall K, Birol I, Edmonson MN, Hu Y, Buetow KE, Chen IM, Carroll WL, Wei L, Ma J, Kleppe M, Levine RL, Garcia-Manero G, Larsen E, Shah NP, Devidas M, Reaman G, Smith M, Paugh SW, Evans WE, Grupp SA, Jeha S, Pui CH, Gerhard DS, Downing JR, Willman CL, Loh M, Hunger SP, Marra MA, Mullighan CG. (2012) Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*;22(2):153-66.
100. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, Elena C, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Ubezio M, Bono E, Da Via MC, Brisci A, Bruno F, Cremonesi L, Ferrari M, Boveri E, Invernizzi R, Campbell PJ, Cazzola M. (2014) Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood*;124(9):1513-21.
101. Zhang X, Hu T, Wu Z, Kang Z, Liu W, Guan M. (2012) The JAK2 46/1 haplotype is a risk factor for myeloproliferative neoplasms in Chinese patients. *Int J Hematol*;96(5):611-6.
102. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. (2009) JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*;41(4):446-9.

103. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. (2011) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*;478(7367):64-9.
104. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagienski K, Olcaydu D, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Jager R, Pieri L, Guglielmelli P, Iacobucci I, Martinelli G, Cazzola M, Vannucchi AM, Gisslinger H, Kralovics R. (2011) Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*;118(1):167-76.
105. Babushok DV, Bessler M. (2015) Genetic predisposition syndromes: when should they be considered in the work-up of MDS? *Best Pract Res Clin Haematol*;28(1):55-68.
106. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Lowenberg B, Bloomfield CD. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*;129(4):424-47.
107. Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, Owen CJ, Bertuch AA, Godley LA. (2013) Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. *Leuk Lymphoma*;54(1):28-35.

XI. Saját Közlemények jegyzéke

XIII.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Király P**, Kállay K, Gángó A, Kellner Á, Egyed M, Szőke A, Kiss R, Vályi-Nagy I, Csomor J, Matolcsy A, Bödör C. (2017). Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary. *Pathology oncology research : POR*;10.1007/s12253-017-0216-4. doi: 10.1007/s12253-017-0216-4. **IF: 1.940**
2. Tawana K, Wang J, **Király P**, Kállay K, Benyó G, Zombori M, Csomor J, Al Seraihi A, Rio-Machin A, Matolcsy A, Chelala C, Cavenagh J, Fitzgibbon J, Bödör C (2017). Recurrent somatic JAK-STAT pathway variants within a runx1-mutated pedigree. *European Journal of Human Genetics*. doi:10.1038/ejhg.2017.80. **IF: 4.580**
3. **Király P**, Kállay K, Marosvári D, Benyó G, Szőke A, Csomor J, Bödör C. (2016). [Clinical and genetic background of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia] (Összefoglaló közlemény). *Orvosi hetilap*, 157(8), 283-9. **IF: 0.291**

XIII.2 Egyéb témában megjelent közlemények

1. **Király PA**, Alpar D, Fesus V, Marosvari D, Matolcsy A, Bödör C. Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai. [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology]. *Magyar onkologia*. 2016;60(2):88-98.

XII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenk előtt a családomnak, szüleimnek, akik nélkül nem juthattam volna el odáig, hogy ez a dolgozat megszülessen. Köszönöm, hogy megértő támogatásukkal és türelmükkel mindig biztosították az otthon kényelmes melegét.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek és barátomnak Dr. Bödör Csabának, aki a jelen dolgozat alapjául szolgáló témát és kutatásokat vezette és koordinálta és irodája mindig nyitva állt előttem, ha kérdéssel vagy nehézséggel fordultam hozzá.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy intézetébe, mint PhD hallgatót befogadott és lehetővé tette, hogy a hematopatológiai laborban elvégezhessem a munkámhoz szükséges kutatásokat.

Szeretnék köszönetet mondani a Patológia Tudományok Doktori Iskola vezetőjének, Prof. Dr. Kopper Lászlónak, valamint az Onkológia Program vezetőjének, Prof. Dr. Kovalszky Ilonának.

Külön köszönet illeti Dr. Rajnai Hajnalkát, aki házi bírálóként a dolgozat szakmai színvonalát jelentősen emelte és építő kérdéseivel további megfontolandó pontokra mutatott rá.

Szeretnék köszönetet mondani az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi dolgozójának, orvosainak és asszisztenseinek, különösen a hematopatológiai labor munkatársainak, akik segítsége és baráti támogatása nélkül a dolgozat nem születhetett volna meg.

Végül szeretném megköszönni Dr. Jun Wangnak és Dr. Kiran Tawanának a sikeres és eredményes kooperációt, külön kiemelve a bioinformatikai munkában kapott segítséget.

Schrimpel Éva emlékének.