

FAMILIÁRIS MYELOID KÓRKÉPEK GENETIKAI ANALÍZISE

Doktori tézisek

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. Hussain Alizadeh, 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

I. Bevezetés

A hematológiai malignitások családi halmozódásának ismerete immáron több évtizedre nyúlik vissza, de a genetikai megismerésük az elmúlt évtizedben indult csak meg. 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. Az első szindróma, melynek háttérében sikerült genetikai eltérést azonosítani, a familiáris vérlemezke funkciózavar talaján kialakuló myelodiszplázia (MDS)/akut myeloid leukémia (AML) – rövidítve: FPD-AML. A betegség háttérében azonosították a *RUNX1* gén mutációit. Ezt követte időben a *CEBPA*, majd a *GATA2* transzkripció faktorok felismerése, az igen változatos familiáris hematológiai kórképek háttérében. Napjainkra már számos kórkép háttérében derült fény csíravonali hajlamosító tényezőre, mely kórképeket a klinikai/patológiai viselkedés alapján klasszifikálták. A megelőző klinikai tünetek nélkül kialakuló „de novo” familiáris AML háttérében írták le a *CEBPA* nevű, már fent említett transzkripció faktorban, illetve a *DDX41* RNS helikáz fehérjét kódoló gén mutációit. Az FPD-AML háttérében később sikerült kimutatni az *ANKRD26* és az *ETV6*

hajlamosító szerepét. A megelőző csontvelő kimerüléssel, vagy változatos súlyosságú citopéniákkal társuló kórképek hátterében ismertük meg a *GATA2*, illetve a *TERC* és *TERT* gének mutációit. A familiáris aplasztikus anémia hátterében az *SRP72* gén mutációját sikerült már bizonyítani, a myeloproliferatív neoplazmák családi halmozódása mögött pedig az *ATG2B* és *GSKIP* géneket érintő kromoszómális tandem duplikációt. A limfoid kórképek családi halmozódása is ismert tény az irodalomban, ám ilyen genetikai összefüggéseket az eseteikben még nem sikerült kimutatni. Kivételt képeznek a familiáris B-sejtes akut leukémiában (B-ALL) kimutatott *PAX5* transzkripciós faktor, illetve krónikus limfoid leukémiában (CLL) a Shelterin génkomplex mutációi.

Az FPD-AML egyik karakterisztikus jellemzője, hogy szemben a többi, a malignus fenotípust igen nagy penetranciával létrehozó kórképpel, az eseteknek mintegy 40%-ban jelenik meg MDS/AML. A malignitást eredményező, szekunder genetikai eltérésekről napjainkban ez idáig még kevés adat áll rendelkezésünkre.

Hazánkban a familiáris hematológiai kórképek felismerése és genetikai jellemzése napjainkig még nem történt meg. Munkacsoportunk ezért célul tűzte ki myeloid hematológiai daganatok halmozódását mutató családok

dokumentálását és részletes genetikai jellemzését, valamint e területtel kapcsolatos ismeretek és genetikai vizsgálatok meghonosítását Magyarországon.

II. 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.

III. Anyagok és módszerek

Munkánk során négy családot azonosítottunk Magyarországon, akiknél familiáris mintázatot mutató öröklésmenettel jelent meg MDS/AML.

A családok esetében az érintett betegek csontvelői vagy perifériás vérből kiindulva DNS-t izoláltunk. PCR amplifikációt követően kétirányú Sanger szekvenálással vizsgáltuk az idáig megismert a *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *TERC* és *TERT* gének teljes kódoló régióit, valamint az *SRP72* és *ANKRD26* gének mutációs forrópontjait.

Egy család esetében ahol mind a 4 gyermek érintett volt vérlemezke funkciózavarral, illetve MDS-AML-el, a betegség heterogenitásának hátterében álló eltérések azonosítására teljes exom szekvenálást végeztünk (WES). Az általunk azonosított valamennyi eltérést Sanger szekvenálással validáltunk, illetve két gén (*JAK2* és *SH2B3*) esetében ultra mély szekvenálást (10.000 x) végeztünk új generációs szekvenálás alkalmazásával.

A *RUNX1* p.R201* mutáció transzkripció szintű vizsgálatára allél specifikus digitális PCR-t végeztünk, a

mutáns illetve a vad allélokra tervezett specifikus próbákkal. Eredményeinket bioinformatikai analízisnek vetettük alá.

IV. Eredmények

Négy családot vizsgáltunk ahol myeloid malignitás jelent meg familiáris öröklésmenetet mutatva, mindösszesen 13 érintett családtagban.

Az első család esetében két gyermek volt érintett vérlemezke szám eltérések talaján kialakuló MDS-el. Az esetükben a *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *TERC/TERT SRP72* és *ANKRD26* gének vad típusúnak bizonyultak.

A második család esetében három testvérben jelent meg MDS, egyikük betegsége csontvelő transzplantációra szorult, a másik két gyermeket jelenleg követik. Az esetükben is valamennyi fent említett gén esetében negatív mutációs analízist kaptunk.

A harmadik család esetében három testvérben jelent meg az AML fenotípusa, jellemzően idősebb korban és édesanyjuk is a betegségben szenvedett. Habár esetükben kifejezetten vártuk a *CEBPA* vagy a *DDX41* gének mutációját, a jellegzetes klinikai megjelenés miatt, valamennyi ismert génre itt is negatív eredményt kaptunk.

A negyedik család esetében, ahol FPD-AML jelent meg, négy gyermek közül mindenki érintett volt MDS/AML-el. A család dizigóta iker gyermekei szimultán betegedtek meg 5 éves korukban és a terápiás erőfeszítések ellenére elhunytak. A család negyedik gyermeke 10 évvel később, szintén 5 éves korában lett érintett AML-el, őt ezt megelőzően thrombocytopénia és MDS miatt követték. Testvére, a család harmadik gyermeke a transzplantációs donor keresés kapcsán került szűrésre és esetében MDS korai jelei voltak láthatóak. A *RUNX1* p.R201* stop kodont azonosítottuk a négy gyermek és a klinikailag tünetmentes édesanya esetében. Az apa vad típusúnak bizonyult a *RUNX1* génre nézve. A klinikai heterogenitás hátterében álló szekunder genetikai eltérések feltérképezésére teljes exom szekvenálást (WES) végeztünk. A WES feltárta a JAK-STAT jelpálya komponenseit (*JAK2* és *SH2B3*) érintő mutációk konvergens evolúcióját, melyek megjelenése agresszív betegség lefolyást eredményezett.

Munkánk során az elvégzett genetikai vizsgálatok alapján egy diagnosztikus panelt is beállítottunk, melynek segítségével a megfelelő klinikai gyanú esetén vizsgálható a familiáris MDS/AML-ben megismert valamennyi patogén mutáció.

V. 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 hátterében feltehetően még nem azonosított germline eltérés állhat.
- Az FPD-AML-ben szenvedő család (IV) esetében a *RUNX1* gén p.R201* csíravonali mutációját azonosítottuk.

- A IV. családnál látható nagyfokú heterogenitás hátterében 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 hátterében álló valamennyi ismert genetikai eltérés rutinszerű diagnosztikus vizsgálata Magyarországon.

VI. Saját publikációk jegyzéke

VI.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**

VI.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.
2. Fesus V, Marosvari D, Kajtar B, **Király PA**, Demeter J, Gurbity Palfi T, Egyed M, Plander M, Farkas P, Matrai Z, Matolcsy A, Bödör C. (2017). A TP53-mutáció-analízis jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában. [TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukaemia]. *Orvosi hetilap*, 158(6), 220-8. doi: 10.1556/650.2017.30656.
3. Kiss R, **Király PA**, Gaal-Weisinger J, Marosvari D, Gango PA, Demeter J, Bödör C. (2017). A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. [Molecular monitoring of myeloid leukemia]. *Magyar onkologia*, 61(1), 57-66.
4. Marosvari D, Alpar D, **Király PA**, Rajnai H, Reiniger L, Bödör C. (2016). A krónikus limfocitás leukémia genetikai háttere az újgenerációs szekvenálás korszakában. [The genetic landscape of chronic lymphocytic leukemia]. *Magyar onkologia*, 60(2), 118-25.

5. Nagy N, Hajdu M, Mark A, **Király PA**, Toth M, Danko T, Csoka M, Sebestyen A. (2016). Growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13695-704. doi: 10.1007/s13277-016-5272-y. **IF: 2.926**
6. Posfai E, Marton I, **Király PA**, Kotosz B, Kiss-Laszlo Z, Szell M, Borbenyi Z. (2015). JAK2 V617F, MPL, and CALR mutations in essential thrombocythaemia and major thrombotic complications: a single-institute retrospective analysis. *Pathology oncology research : POR*, 21(3), 751-8. doi: 10.1007/s12253-014-9885-4. **IF: IF: 1.940.**
7. Rajnai H, **Király PA**. (2017) Az akut mieloid leukémia genetikai és patológiai sajátosságai. [Pathogenesis and genetic landscape of acute myeloid leukemia]. *Magyar onkologia*, 61(1), 21-8.
8. Rajnics P, Kellner A, Karadi E, Moizs M, Bödör C, **Király PA**, Marosvari D, Andrikovics H, Egyed M. (2016). Increased Lipocalin 2 level may have important role in thrombotic events in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia research*, 48101-6. doi: 10.1016/j.leukres.2016.04.016. **IF: 2.606.**

