

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

Doktori tézisek

Krähling Tünde

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Andrikovics Hajnalka, Ph.D.

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

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Apáti Ágota, Ph.D., tudományos
főmunkatárs

Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

1. Bevezetés

A myeloproliferatív neoplázia (MPN) a hematopoetikus őssejt klonális zavara következtében kialakuló betegségcsoport, amelyre különböző érett myeloid sejtek proliferációja jellemző. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization: WHO) 2016. évi besorolása szerint a myeloproliferatív neoplázián belül több kórkép különíthető el. A *BCR-ABL1* (breakpoint cluster region – Abelson1 fúziós gén) vagy másnéven Philadelphia-kromoszóma negatív, klasszikus MPN kórképek közé az esszenciális thrombocythaemia (ET), a polycythaemia vera (PV) és a primer myelofibrosis (PMF) tartozik. ET-ben elsősorban a megakaryocytá, PV-ben az erythrocyta, PMF-ben pedig a megakaryocytá és a granulocytá sejtvonal érintett.

A *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN genetikai hátterében a 2. típusú Janus kináz (*JAK2*), a calreticulin (*CALR*) és a thrombopoetin receptor (*MPL*) gének mutációit azonosították, amelyek mindegyike a JAK/STAT (STAT: jelátviteli és transzkripciót aktiváló fehérje) jelátviteli útvonalat aktiválja. Elsőként a *JAK2* gén 14. exonjában a 617. valin aminosav fenilalanin cseréjét (V617F) eredményező szerzett pontmutációt ismerték fel. Később az *MPL* gén 10. exonjának mutációit V617F negatív ET-ben és PMF-ben, a *JAK2* gén 12. exon mutációit pedig V617F negatív PV-ben írták le. A leggyakoribb

szerzett *MPL* mutációk a receptor transzmembrán doménjében található, az 505. szerin és az 515. triptofán aminosavakat érintik. A *JAK2* 12. exon mutációk pedig a *JAK2* fehérje 533-547. aminosavjait kódoló régióban található: lehetnek szubsztitúciók, deléciók (del), inszerciók (ins) és duplikációk. A *CALR* gén 9. exonját érintő genetikai eltérések *JAK2* és *MPL* negatív ET-ben és PMF-ben fordulnak elő. A *CALR* gén olvasási keret eltolódásával járó deléciós és inszerciók mutációi közül a leggyakoribb az 52 bázispáros delécióval járó 1. típusú (c.1092_1143del), és az 5 bázispáros inszercióval járó 2. típusú (c.1154_1155insTTGTC) mutáció. A *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk MPN specifikusak, kölcsönösen kizárják egymást, és más hematológiai betegségben ritkán fordulnak elő. Mivel klasszikus MPN-ben a betegek 85-90%-ában e három gén valamelyike érintett, a mutációk vizsgálata diagnosztikus jelentőségű. Az ET és PMF esetek 10-15%-ában a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk egyike sem mutatható ki, ezek a betegek képezik a tripla negatív MPN csoportot.

Az MPN betegek többségében az onkogén mutációk mellett egyéb társuló génmutációk is azonosíthatók, amelyek leggyakrabban epigenetikai módosításért felelős, illetve tumor szupresszor géneket érintenek. Ezek önmagukban nem vezetnek az MPN-re jellemző klinikai eltérések kialakuláshoz, és gyakran más myeloid malignitásokban is előfordulnak. Az érintett génektől, a mutációk

számától és keletkezési sorrendjétől függően az addicionális mutációk jelezhetik a betegség előrehaladottabb állapotát. Kimutatásuk MPN-ben prognosztikai jelentőségű.

Ugyanazon mutációk (*JAK2* V617F, *CALR*, *MPL*) jelenléte különböző MPN betegségekben felveti annak lehetőségét, hogy az MPN patomechanizmusában egyéb genetikai tényezők is szerepet játszhatnak. A szerzett mutációkon túl örökletes faktorok is befolyásolhatják a betegség kialakulására való hajlamot, a klinikai megjelenést és a lefolyást. A *JAK2* 46/1-es haplotípus mellett nemrégiben a telomeráz reverz transzkriptáz (*TERT*) gén második intronjában található rs2736100_C variánst hozták összefüggésbe MPN és szolid tumorok kialakulásának kockázatával. A *TERT* gén a telomeráz enzim katalitikus alegységét kódolja, amely elengedhetetlen a kromoszómák végén található ismétlődő nukleotid szekvenciák, a telomerek hosszának fenntartásához. Az rs2736100_C allél növelheti a *TERT* transzkripcióját, az emelkedett expressziós szint pedig hozzájárulhat az MPN kialakulásának kockázatához.

2. Célkitűzések

Munkánk célja szerzett és örökletes genetikai tényezők és azok hatásának tanulmányozása volt klasszikus MPN betegek körében.

- 1) Módszerek beállítása a szerzett onkogén mutációk (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) meghatározásához, kombinált molekuláris genetikai módszeregyüttes alkalmazása.
- 2) A szerzett mutációk azonosítása és gyakoriságuk meghatározása. A mutációk klinikai paramétereit, kimenetelt befolyásoló hatásának és prognosztikai szerepének tanulmányozása.
- 3) A *JAK2* V617F vagy a *CALR* mutációk relatív mennyiségének összehasonlítása, klinikai paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- 4) A *TERT* rs2736100 és a *JAK2* rs12343867 polimorfizmusok allélfrekvenciájának meghatározása, és a variánsok MPN-re hajlamosító szerepének, együttes hatásának vizsgálata.
- 5) A *TERT* polimorfizmus fenotípusra, komplikációk gyakoriságára és a betegek túlélési esélyeire gyakorolt hatásának tanulmányozása.

3. Módszerek

3.1 Vizsgált személyek

Tanulmányunkban 1974 és 2013 között diagnosztizált, *BCR-ABL1* negatív, klasszikus MPN-ben szenvedő betegeknél vizsgáltuk a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk előfordulását. A 949 főből álló betegcsoportunkból 353 beteg PV-ben, 469 ET-ben és 127 PMF-ben szenvedett. A betegek diagnózisa a 2008. évi WHO kritériumoknak megfelelően történt. A laboratóriumi paramétereket és a klinikai adatokat retrospektíven gyűjtöttük, nyomon követtük a myelofibrotikus vagy leukémiás transzformációkat, valamint rögzítettük a koagulációs komplikációk előfordulását.

3.2 A *JAK2* V617F mutáció kimutatása

A *JAK2* V617F pontmutáció jelenlétét allélspecifikus polimeráz lánreakcióval (AS-PCR) vizsgáltuk minden MPN betegnél. A V617F allél mennyiségi meghatározását egy szűkebb betegcsoport (n=484) és 30 egészséges csontvelő donor esetén végeztük el fluoreszcens TaqMan szondát alkalmazó valós idejű PCR-rel, LightCycler 480 (LC 480) készüléken.

3.3 A *JAK2* 12. exon mutációk kimutatása

A *JAK2* 12. exon mutációkat *JAK2* V617F negatív PV betegeknél vizsgáltuk fragmens analízissel. Pozitív eredmény esetén a DNS

fragmentumok nukleotid sorrendjét Sanger szekvenálással határoztuk meg.

3.4 A *CALR* 9. exon mutációk kimutatása

A *JAK2* V617F negatív ET (n=181) és PMF (n=53) betegeknél a *CALR* mutációk jelenlétét fragmens analízissel vizsgáltuk. A mutáns allél mennyiségét a mutáns és vad típushoz tartozó csúcsmagasságok arányából számoltuk, és az összes *CALR* allél százalékában fejeztük ki. A pozitív eseteknél a mutáció pontos típusát szekvenálással határoztuk meg.

3.5 Az *MPL* 10. exon mutációk kimutatása

A *JAK2* V617F és *CALR* negatív ET (n=63) és PMF (n=23) betegeknél az *MPL* mutációk jelenlétét három különböző laboratóriumi módszerrel: nagy felbontású olvadási görbe analízissel (HRM), szekvenálással és AS-PCR-rel vizsgáltuk.

3.6 SNP vizsgálatok

A *TERT* rs2736100_C és a *JAK2* rs12343867_C polimorfizmusokat 584 *BCR-ABL1* negatív MPN betegnél és 400 egészséges személynél határoztuk meg valós idejű PCR-t követő olvadási görbe analízissel, LC 480 készüléken.

4. Eredmények

4.1 A laboratóriumi módszerek beállítása

A *JAK2* V617F pontmutációt 2014-től kezdve a megfelelően érzékeny valós idejű mennyiségi PCR-rel vizsgáljuk. A *JAK2* gén 12. exonját és a *CALR* gén 9. exonját érintő mutációk kimutatására fragmens analízist vezettünk be, a pozitív eseteknél a mutációk típusát szekvenálással határozzuk meg. A végpont PCR-t követő fragmens analízis a *CALR* mutációk mennyiségi meghatározására is alkalmas szemi-kvantitatív eljárás. Az *MPL* gén 10. exonjában található mutációk szűrését a ritka eltérések kimutatására is alkalmas HRM analízissel végezzük. Pozitív szűrési eredmény esetén, a konkrét aminosav cserét eredményező nukleinsav cseréket szekvenálással határozzuk meg. A szekvenálás során negatív eredményt adó mintákat mutációként (S505, W515) külön AS-PCR-rel vizsgáljuk tovább. A *JAK2* rs12343867 és *TERT* rs2736100 polimorfizmusok vizsgálatára alléldiszkriminációs, hibridizációs szondákat alkalmazó módszert vezettünk be.

4.2 Onkogén mutációk klasszikus MPN-ben

A kombinált molekuláris genetikai módszereket alkalmazva 353 PV-ben, 469 ET-ben és 127 PMF-ben szenvedő betegnél kerestük az MPN hátterében álló onkogén mutációt. A *JAK2*, *CALR* és *MPL* mutációk kölcsönösen kizárják egymást, együttes előfordulásuk

irodalmi ritkaságnak számít, ezért a mutációk kimutatását szekvenciálisan végeztük. PV gyanúja esetén elsőként a *JAK2* V617F mutációt szűrtük, ennek hiányában a *JAK2* gén 12. exon mutációit vizsgálatuk. ET és PMF gyanújakor a vizsgálatok szintén a *JAK2* V617F mutációval kezdődtek, és a negatív esetekben az irodalomban leírt gyakoriságok alapján először a *CALR*, majd az *MPL* mutációk szűrésével folytatódtak. PV-ben a betegek 98,6%-ában *JAK2* V617F, 1,4%-ában *JAK2* 12. exon mutációkat találtunk. ET-ben és PMF-ben a mutációk gyakorisága hasonlóan alakult: 61-58%-ban *JAK2* V617F, 25-24%-ban *CALR* és 2-6%-ban *MPL* mutációkat azonosítottunk. Az esetek maradék 11-12%-ban a *JAK2*, *CALR* és *MPL* mutációk egyikét sem tudtuk kimutatni.

Tanulmányoztuk továbbá az egyes onkogén mutációk jelenléte és a klinikai jellemzők közötti összefüggéseket. A *CALR*^{poz} és a *JAK2* V617F^{poz} ET betegek klinikai és laboratóriumi adatait összevetve a következőket találtuk: a *CALR*^{poz} ET betegek csoportjában több a férfi, alacsonyabb az életkor diagnóziskor, alacsonyabb a hemoglobinszint és a fehérvérsejtszám, valamint magasabb a vérlemezkeszám. A koagulációs komplikációk a *JAK2*^{poz} ET betegek körében voltak gyakoribbak, míg myelofibrotikus transzformáció a *CALR*^{poz} csoportban fordult elő gyakrabban. PMF-ben szenvedők között is összehasonlítottuk a klinikai paramétereket: a *CALR*^{poz} betegek a diagnóziskor fiatalabbak voltak, a vérlemezkeszámuk magasabb volt,

valamint kevesebbszer fordult elő lépmegnagyobbodás, mint a *JAK2^{poz}* csoportban. A többi változó nem mutatott szignifikáns különbséget.

A betegségek kimenetelét Kaplan-Meier megközelítést alkalmazva vizsgáltuk meg az ET és a PMF betegek körében. A túlélési adatok nem voltak elérhetőek minden esetben, így a túlélési elemzést egy szűkített betegcsoporton végeztük el. Az ET csoporttal ellentétben, a PMF-ben szenvedők között az összesített túlélés eltérőnek mutatkozott a különböző genetikai háttérű alcsoportokban. Az összesített túlélés a *CALR^{poz}* csoportban bizonyult a legjobbnak, míg a tripla negatív csoportban a legrosszabbnak. Ezt a megállapítást a páronkénti elemzés is megerősítette. Az eltérés szignifikáns volt mind a *CALR* és *JAK2* csoportok ($p=0,04$), mind a *CALR* és tripla negatív csoportok összehasonlításában ($p=0,01$).

A mutáns allél mennyiségi meghatározását *JAK2* V617F és *CALR* mutáció esetén is elvégeztük. A *JAK2* V617F allélra vonatkozóan PV-ben 215, ET-ben 154, míg PMF-ben 56 esetben volt elérhető mennyiségi adat. A *CALR* mutációt tekintve ET-ben 96, PMF-ben pedig 25 beteg mennyiségi adata állt rendelkezésre. Az alcsoportok összehasonlításakor elkülönítettük a diagnóziskori, illetve a későbbi minták mennyiségi értékeit. Páronkénti összehasonlításokat végezve megfigyeltük, hogy (i) a *JAK2* V617F^{poz} vagy a *CALR^{poz}* ET betegeknél nem volt jelentős különbség, míg PV-ben emelkedő

tendenciát találtunk a diagnóziskori és a későbbi mintavételek mutáns allél mennyiségeit illetően. (ii) A *JAK2* V617F allél mennyisége fokozatosan emelkedett párhuzamosan az egyre előrehaladottabb betegségek megjelenésével (ET<PV<post-PV MF). Ez a tendencia a mutáns *CALR* allél mennyisége esetén is megfigyelhető volt (ET<post-ET MF). (iii) A *CALR* mutáns allél mennyisége azonban csak ritkán haladta meg az 50%-ot, ellentétben a *JAK2* V617F esetekkel. (iv) Az ET-ben szenvedők között a mutáns *CALR* allél mennyisége jelentősen magasabb volt, mint a mutáns *JAK2* V617F allélé.

Megvizsgáltuk a különböző típusú *CALR* mutációk eloszlását az ET (n=96) és PMF (n=25) betegcsoportjaink között. ET-ben szenvedőknél 50%-ban 1. típusú, 32%-ban 2. típusú, míg 18%-ban egyéb *CALR* mutációkat; PMF-ben szenvedőknél 64%-ban 1. típusú, 12%-ban 2. típusú, 24%-ban pedig egyéb *CALR* mutációkat azonosítottunk. ET-ben a 2. típusú mutáció a többi *CALR* mutációkhoz képest gyakrabban fordult elő (32%), mint PMF-ben (12%). A mutáns *CALR* allél mennyiségi értékeit 31 egy éven belül diagnosztizált ET betegnél vizsgáltuk és elsőként közöltük, hogy ET betegek esetében a *CALR* mutáns allél mennyisége befolyásolhatja a hematológiai laboratóriumi paramétereket: a hemoglobin szintet, a fehérvérsejt- és vérlemezkeshámot. Az alacsony *CALR* allélmennyiség (<38% mutáns *CALR* arány esetén) alacsonyabb fehérvérsejt- (9 vs. 11

G/L, $p=0,025$) és vérlemezkeszámmal (848 vs. 1406 G/L, $p=0,04$), valamint magasabb hemoglobin szinttel (138 vs. 122 g/dL, $p=0,04$) társult.

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

Az örökletes faktorok közül a *TERT* és a *JAK2* polimorfizmusok MPN-re hajlamosító szerepét vizsgáltuk meg. Mind a *TERT*, mind a *JAK2* variánsok allélfrekvenciája emelkedett volt a kontroll csoporthoz viszonyítva (*TERT* rs2736100_C: 62,7% vs. 48,8%; *JAK2* rs12343867_C: 45,7% vs. 29,8%). A *TERT* variánst hordozók mind a *JAK2* V617F^{poz}, mind a *CALR*^{poz} MPN-re egyforma mértékben hajlamosítanak, míg a *JAK2* rs12343867_C allél hajlamosító hatása hangsúlyosabb volt a *JAK2* V617F^{poz} MPN betegek körében.

A teljes MPN csoportunkat nézve a *TERT* heterozigótasághoz [Odds Ratio: OR=2,2 (1,5-3,1)] képest a *TERT* homozigótaság [OR=3,2 (2,2-4,7)] az MPN-re való hajlamot additívan megnövelte ($p=0,009$). Mivel egy *TERT* vagy *JAK2* allél jelenléte is megnövelte az MPN-re való hajlamot, megvizsgáltuk több allél együttes hatását. A heterozigóta genotípust egynek, a homozigótát kettő hajlamosító allélnak vettük. Két rizikó allél az MPN kialakulásának kockázatát 6-szorosára, míg a kombinált homozigótaság közel 10-szeresére növelte. Mindez arra enged következtetni, hogy a *TERT* és *JAK2* allélok MPN-re hajlamosító hatása mögött különböző patomechanizmus rejlik.

A továbbiakban megvizsgáltuk a *TERT* polimorfizmus lehetséges hatását az MPN megjelenésére. A *TERT* rs2736100_C variáns az emelkedett fehérvérsejtszám kivételével nem befolyásolta a vérképet, és a különböző hematológiai szövődmények gyakoriságát, PV-ben mégis eltérőnek bizonyult a különböző *TERT* genotípusú betegek hosszú távú összesített túlélése. Részletes kórtörténet 356 betegnél volt elérhető. A halálozási okokat megvizsgálva megállapítottuk, hogy a *TERT* CC homozigóták gyakrabban haltak meg az alap hematológiai megbetegedéstől független szolid tumorok következtében. Szolid tumorok a vad típusú (AA genotípus) betegek 8,2%-ában, a heterozigóták (AC genotípus) 16,2%-ában és a homozigóták (CC genotípus) 23,1%-ában jelentkeztek ($p=0,014$). Multivariancia elemzéssel igazoltuk, hogy a szolid tumorok kialakulásának szempontjából a *TERT* rs2736100_C genotípus a citoreduktív terápiától független kockázati tényező [$p=0,045$; OR=3,08 (1,03–9,26)].

5. Következtetések

- 1) Tanulmányunk során a beállított molekuláris genetikai módszeregyüttessel a PV, ET vagy PMF esetek több mint 90%-ában tudtuk azonosítani a szerzett genetikai eltérést. A *JAK2*, *CALR* és *MPL* mutációk kimutatásához a minőségi és mennyiségi AS-PCR, a fragmens analízis, a HRM és a Sanger szekvenálás kombinációit alkalmaztuk.
- 2) MPN betegcsoportunkban a talált mutációk előfordulási gyakorisága megfelel az irodalomban ismertetett adatoknak. A különböző és egymást kölcsönösen kizáró onkogén mutációk jelenléte eltérő klinikai jellemzőkkel társul. PMF betegcsoportunkban a *CALR*^{poz} betegek összesített túlélése (OS) kedvezőbb volt, mint a *JAK2*^{poz} ($p=0,04$) vagy a tripla negatív ($p\leq 0,01$) betegeké.
- 3) Egy alternatív szemikvantitatív PCR technikát alkalmazva elsőként vizsgáltuk a *CALR* mutációk mennyiségének hatását. Mi közöltük elsőként, hogy ET betegek esetében a *CALR* mutáns allél mennyisége közvetlenül befolyásolhatja a hematológiai laboratóriumi paramétereket: a hemoglobinszintet, a fehérvérsejt- és vérlemezkeszámot. Az eredményeink tanúsítják, hogy a *CALR* allél mennyiségének betegségre gyakorolt hatása hasonlít a *JAK2* V617F alléléhoz, ahol egyértelmű trend mutatkozik a mutáns allél

emelkedésével párhuzamosan az egyre súlyosabb MPN fenotípusok megjelenésére.

- 4) Az irodalomban leírtakkal megegyezően MPN esetén mind a *TERT* rs2736100_C, mind a *JAK2* rs12343867_C variánsok allélfrekvenciája emelkedett volt, nemcsak diagnózis szerint lebontva, de onkogén mutációk szerint csoportosítva is. A *TERT* variáns mind heterozigóta, mind homozigóta formája *BCR-ABL1* negatív MPN-re hajlamosít. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a *TERT* és a *JAK2* rizikó allélok egymástól függetlenül és egymás hatását erősítve hajlamosítanak MPN-re.
- 5) Megállapítottuk, hogy a *TERT* polimorfizmus az emelkedett fehérvérsejtszám kivételével nem befolyásolja a vérkép paramétereit, és a különböző hematológiai szövödmények gyakoriságát MPN-ben. Mégis az eltérő *TERT* genotípusú PV betegek hosszú távú túlélési esélyei különbözőek voltak. Ennek okait kutatva felfedtük, hogy a homozigóta *TERT* rs2736100_CC genotípusú betegek magasabb mortalitása a hematológiai megbetegedéstől független szolid tumorok következtében emelkedett, amely általános feltételezések szerint a citoreduktív terápia következménye. Multivariancia elemzést végezve azonban elsőként mutattuk ki, hogy a társuló nem hematológiai tumorok kialakulására nézve a *TERT* rs2736100_C polimorfizmus és a citoreduktív terápia egymástól független kockázati tényezők.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

- **Krahling T**, Balassa K, Kiss KP, Bors A, Batai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Remenyi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Co-occurrence of myeloproliferative neoplasms and solid tumors is attributed to a synergism between cytoreductive therapy and the common TERT polymorphism rs2736100. *CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION* 25:(1) pp. 98-104. (2016)
- **Krahling T**, Balassa K, Meggyesi N, Bors A, Csomor J, Bártai A, Halm G, Egyed M, Fekete S, Reményi P, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Komplex molekuláris genetikai vizsgálati algoritmus myeloproliferatív neoplasiák diagnosztikájában. *ORVOSI HETILAP* 155:(52) pp. 2074-2081. (2014)
- Andrikovics H, **Krahling T**, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, Batai A, Dolgos J, Csomor J, Egyed M, Sipos A, Remenyi P, Tordai A, Masszi T. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *HAEMATOLOGICA* 99:(7) pp. 1184-1190. (2014)

6.2 A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények

- Balassa K, **Krahling T**, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, Torbagyi E, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Varga G, Tordai A, Masszi T, Andrikovics H. Recipient and donor JAK2 46/1 haplotypes are associated with acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *LEUKEMIA & LYMPHOMA* 58(2) pp. 391-398. (2017)
- Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Batai A, Csacsovszki O, Lehoczky E, Adam E, Kozma A, Lovas N, Sipos A, **Krahling T**, Dolgos J, Remenyi P, Fekete S, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Medium-sized FLT3 internal tandem duplications confer worse prognosis than short and long duplications in a non-elderly acute myeloid leukemia cohort. *LEUKEMIA & LYMPHOMA* 55:(7) pp. 1510-1517. (2014)