

**Genetikai eltérések gén- és fehérjeszintű mennyiségi  
vizsgálatának klinikai jelentősége Philadelphia  
kromoszóma negatív myeloproliferatív neoplazmákban**

Doktori tézisek

**Dr. Mózes Réka**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Bödör Csaba, PhD, tudományos főmunkatárs
- Hivatalos bírálók: Dr. Masszi András, PhD, egyetemi tanársegéd  
Dr. Simon Zsófia, PhD, egyetemi adjunktus
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, DSc, egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Horváth Laura, PhD, egyetemi tanársegéd  
Dr. Tóth Erika, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest  
2019

## 1. Bevezetés

A Philadelphia negatív myeloproliferatív neopláziák (MPN) klonális, haemopoetikus őssejt (HSC) eredetű neoplasztikus természetű betegségek, amelyekre egy vagy több sejtsoron kiérett funkcionáló sejtek excesszív szaporulata mellett fokozott thrombózis-rizikó és leukémiás transzformáció rizikója jellemző. A klasszikus Philadelphia negatív MPN-ek közé a polycythaemia verát (PV), az esszenciális thrombocythaemiát (ET) és a primer myelofibrózist (PMF) soroljuk. A klasszikus Philadelphia negatív neopláziák háttérében álló driver mutációkat az elmúlt 13 évben azonosították: 2005-ben a Janus-2 kináz (*JAK2*) mutációit, 2006-ban a thrombopoetin receptor (*MPL*) mutációit, 2007-ben a *JAK2* gén 12-es exont érintő mutációit, majd végül 2013-ban a *Calreticulin* gén (*CALR*) mutációt. Az előbb részletezett driver-géneket a gyakorlatban egymást kölcsönösen kizárónak tekintik.

A *JAK2* funkciónyerő mutációi az MPN-ek többségében jelen vannak. A *JAK2* V617F mutáció a betegséget okozó abnormalitás a PV betegek 98%-ában, az ET és PMF betegek 50-60%-ában. A *JAK2* gén 12-es exonjának mutációi PV-ben a háttér-abnormalitások 1-2%-át adják, ET-ben és PMF-ben nem fordulnak elő. Az ET és PMF esetek 20-30%-ának háttérében a *CALR* mutációi és 3-5%-ának háttérében az *MPL* mutációi mutathatók ki. Az ET és PMF esetek fennmaradó csaknem 10%-ának háttérében nem mutatható ki genetikai abnormalitás ezeket az eseteket tripla-negatív eseteknek hívjuk. A *JAK2*, az *MPL* és a *CALR* mutációk hatásukat a JAK-STAT vagy a TPO-R onkogén útvonalakon fejtik ki. A patogén szerepüknek, a klinikai lefolyást befolyásoló hatásuknak és a *JAK2* V617F mutáció terápiás jelentőségének köszönhetően az előbb felsorolt mutációk a major diagnosztikus kritériumként szerepelnek.

2013-ban két független kutatócsoport egy időben közölte eredményeit arról, hogy a *JAK2* és *MPL* negatív MPN-ek háttérében egy konzervált szerkezetű multifunkcionális fehérje, a calreticulin mutációit azonosították nagy százalékban. 2013-óta több, mint 60 különböző olvasási keret-eltolódással járó mutációt írtak le a *CALR* génben, amelyek mindegyike a 9-es exont érinti. A két leggyakoribb mutáció az 1-es típusú (ún. „type1”) mutáció, ami egy 52 bázispárnyi szakasz deléciójával jár (c.1092\_1143del), és a 2-es típusú (ún. „type2”), ami egy 5 bázispárnyi szakasz inzercióját eredményezi (c.1154\_1155insTTGTC). E két mutáció-típus teszi ki a mutációk 65-75%-át, a többi mutáció előfordulása jóval ritkább. A további *CALR*

mutációk. A fennmaradó *CALR* mutációk túlnyomó többségét a kóros protein-szerkezet alapján 1-es típus-szerű, 2-es típus szerű és egyéb mutációkra oszthatjuk.

ET-ben és PMF-ben egyaránt a *CALR* mutáns betegek alacsonyabb fehérvérsejt-számmal és magasabb thrombocyta-számmal rendelkeznek a *JAK2* V617F mutáns betegekhez viszonyítva. A magasabb thrombocyta-szám ellenére paradox módon a major thrombotikus események aránya alacsonyabba *CALR* mutáns MPN-csoportban. PMF-ben a *CALR* mutáció egy külön alcsoportot definiál kedvezőbb prognózissal, azonban ET-ben sem a *CALR* mutáció sem a *JAK2* mutáció nem befolyásolja a túlélést.

Manapság a *CALR* mutáció meghatározása az MPN diagnosztika integráns részévé vált. A mindennapokban a *JAK2*, a *CALR* és az *MPL* mutációk meghatározása molekuláris módszerekkel, szekvenciálisan történik fluoreszcens fragmenthossz-meghatározással és szekvenálással történik kvalitatív és kvantitatív módszerekkel egyaránt. A kvantitatív módszerek jelentősége abban rejlik, hogy a mutáció alléltömege befolyásolni látszik a betegség lefolyását. Magasabb *JAK2*V617F alléltömeg számos klinikai paraméterrel, többek között magasabb thrombotikus rizikóval, magasabb myelofibrotikus transzformációs rátával, és splenomegáliával asszociál ET-ben, PMF-ben a mutációs alléltömeg jelentőségét még nem definiálták, a relative ritkább incidencia miatt. A *JAK2* mutáció alléltömegének és fenotípus-befolyásoló szerepe ugyan valamelyest a fentiek értelmében ismeretes, azonban *CALR* esetében a nemzetközi irodalomban csupán kevés ismeret áll rendelkezésünkre.

Az utóbbi években voltak próbálkozások arra nézve is, hogy lehetséges-e fehérje-szinten kimutatni az eltérést például immunhisztokémiával (IHC). Stein és munkacsoportja 2016-ban létrehozta a CAL2 antitestet, amely nagy specificitással képes kimutatni a mutáns calreticulin fehérjét. Később két másik munkacsoport limitált számú eseten és mutációtípuson validálta a CAL2 IHC használhatóságát, azonban a két leggyakoribb mutáción kívül csak néhány ritka *CALR* variáns fehérje-szintű vizsgálata történt meg.

## 2. Célkitűzések

- A *JAK2* V617F, *CALR* és *MPL* gének mutációs státuszának meghatározása magyar MPN betegcsoporton, majd annak megállapítása, hogy ezen mutációk milyen befolyással bírnak laboratóriumi és klinikai paraméterekre.
- A *JAK2* V617F és *CALR* gének variáns allélfrekvenciájának (VAF) meghatározása magyar MPN betegcsoporton.
- Annak megállapítása, hogy a *JAK2* V617F és *CALR* variáns allélfrekvencia milyen befolyással bír laboratóriumi és klinikai paraméterekre.
- A *CALR* mutációk mennyiségi kimutatása fehérje-szinten, mutáció-specifikus immunhisztokémiai analízissel, és a mindennapi diagnosztikus gyakorlatban való alkalmazhatóságának tesztelése.
- A *CALR* mutációk fehérje szinten meghatározott mennyiségi viszonyainak összevetése a molekuláris módszerrel meghatározott *CALR* mutáció altípusával, a variáns allélfrekvenciával, valamint a klinikai- és laboratóriumi paraméterekkel.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Molekuláris genetikai módszerek

##### 3.1.1 Beteganyag

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz 652 Philadelphia negatív myeloproliferatív neopláziával diagnosztizált beteg perifériás vérből vagy csontvelő-aspirátumból izolált DNS mintáját használtuk fel. Az esetek három centrumból: a Semmelweis Egyetemről, a Pécsi Tudományegyetemről és a Szegedi Tudományegyetemről származtak, a mintavétel 1976-2016 között történt. A betegség-besorolás a WHO 2008-ban kiadott kritériumrendszerének megfelelően történt. A tanulmány a Helsinkai deklarációnak megfelelően, a betegek írásos beleegyezésével zajlott.

A 652 MPN esetből 425 ET (131 férfi és 294 nő), az ET betegek átlagéletkora 59 év. A legfiatalabb beteg 4, a legidősebb beteg 97 éves volt a diagnózis felállításakor. A diagnózis felállítását követően átlagosan 62 hónapnyi információ állt rendelkezésünkre a betegekről, a legrövidebb követési idő 13, a leghosszabb 444 hónap ET betegek esetében. Az MPN esetek mintegy 1/3-a, összesen 227 eset volt PMF, amely eseteknél nemek aránya kiegyenlített volt: 112 férfi és 115 nő mintáit vizsgáltuk. Az átlagéletkor diagnóziskor 67 év volt, a legfiatalabb PMF beteg 23, a legidősebb PMF beteg 93 éves volt.

##### 3.1.2 Molekuláris módszerek

A DNS-izolálás perifériás vérmintából vagy csontvelő-aspirátumból High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) segítségével történt a gyártó utasításai szerint. A DNS-koncentráció fotometriás mérését MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (Maestrogen) segítségével végeztük 260 nm hullámhosszon. A DNS-mintákat a további vizsgálatokig 4 °C-on tároltuk.

A JAK2 V617F mutáció kimutatásához Larsen és munkatársai által leírtak alapján összeállított TaqMan-alapú qPCR assay-el történt. Külön reverz primert használtunk a mutáns, valamint a vad típusú allél meghatározására. A valósidejű PCR reakció során a mennyiségi meghatározás a fluoreszcencia mérésével történik, így további, fluoreszcens jellel ellátott primert (TaqMan) is alkalmaztunk. A JAK2 mutációs alléltömeget a  $\Delta C_t$  módszerrel határoztuk meg.

A *CALR* gén 9-es exonját amplifikáltuk AmpliTaqGold™ (Life Technologies) DNS-polimeráz enzimmal és a Primer3Plus online tervezővel (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) tervezett primerekkel. A fragmensanalízis céljára szánt amplifikáció során az 5'-végen 6-karboxifluoreszcein (6-FAM) jelöléssel ellátott forward *CALR* primert és jelöletlen reverz *CALR* primert használtunk, míg a direkt szekvenálással tovább vizsgálendő mintákat jelöletlen forward (5'-AGTTTGGCAACGAGACGTG-3', T<sub>m</sub>=59,9 °C) és reverz (5'-GAGTCTCACAGAGACATTATTTGG-3', T<sub>m</sub>=57,1 °C) primerekkel amplifikáltuk. A fragmensanalízist ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) segítségével. A kapillaris elektroforézis során a DNS-fragmensek méret szerint válnak el egymástól és fluoreszcenciájuk alapján azonosíthatók. Az elektroferogramok kiértékelését GeneMapper™ v5 software (Life Technologies) alkalmazásával végeztük. A tisztított termék bázissorrendjét kétirányú direkt szekvenálással határoztuk meg Big Dye™ Terminator Kit v3.1 (Life Technologies) segítségével. A reakció 25 cikluson keresztül zajlott a PE 2720 Gene Amp (Perkin-Elmer, USA) PCR-készülékben.

Az *MPL* gén 10-es exonjának szekvenanciaanalízise a *CALR* mutációanalízissel analóg módon (lásd IV.1.4.3 fejezet) történt, az alábbi oligonukleotidok felhasználásával: *MPL* forward primer - 5'-CCG AAG TCT GAC CCT TTT TG-3' and *MPL* reverse primer - 5'-ACA GAG CGA ACC AAG AAT GC-3'.

## 3.2 Immunhisztokémia

### 3.2.1 Beteganyag

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a mintákat a genetikai vizsgálatokhoz felhasznált esetek közül választottuk ki. Célzottan olyan *CALR* pozitív ET és PMF eseteket kerestünk, akiknek elérhetőek voltak a formalinban fixált, paraffinba ágyazott csontvelői biopsziái. Kontrollként huszonhat *CALR* negatív esetet választottunk ki, amelyek között *JAK2* V617F mutáns, *MPL* mutáns és tripla negatív esetek is voltak. A csontvelő-biopsziákból a diagnózisokat a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben és a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Patológia Intézetében állították fel 2002-2016 között, a minták besorolása a 2008-as WHO kritériumoknak megfelelően történt.

A vizsgálatokhoz n=70 ET (n=28 férfi, n=42 nő, átlagéletkor diagnóziskor: 58,8 év, tartomány: 4-84 év) és n=47 PMF eset (n=24 férfi, n=23 nő, átlagéletkor: 65,1 év, tartomány: 31-90 év) blokkjait használtuk.

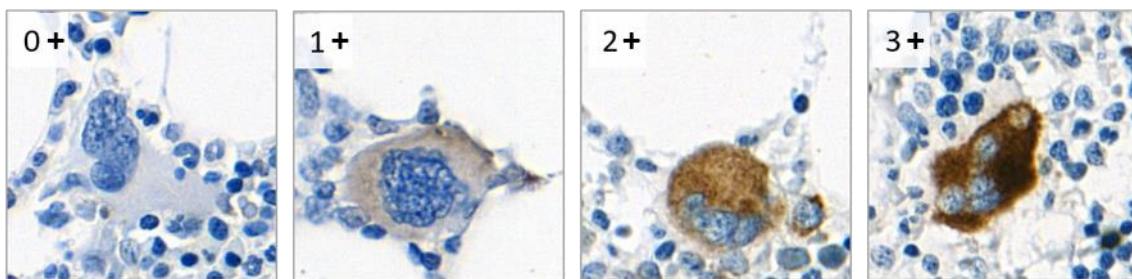
### 3.2.2 CAL2 Immunhisztokémia

A dekalcinált, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkokból 4 µm vastag metszeteket készítettünk xylánnal borított tárgylemezre. A deparaffinálás xylol segítségével történt, majd leszálló alkoholsorral rehidráltuk, végül desztillált vízzel öblítettük a metszeteket. Az endogén peroxidáz aktivitás gátlásának céljából 1,5%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metanos oldatba helyeztük a tárgylemezeket. Az antigén-feltárást elektromos kuktában 105 °C-on 40 percig végeztük 0,1M Tris és 0,01M EDTA (pH 9,0) pufferek keverékében. Primer ellenanyaggal való inkubálás előtt, az aspecifikus kötődés megelőzésének érdekében protein blokkal indítottuk az inkubáció sorozatot 10 percig, majd 5 perces 0,1M-os TBS pufferben való mosást követően a primer antitesttel inkubáltuk a metszeteket. Primer antitestként kereskedelmi forgalomban kapható mutáns calreticulin elleni monoklonális ellenanyagot használtunk (CAL2 clone, Dianova DIA-CAL-250) 1:100-as hígításban. Újabb, 0,1M-os TBS pufferben történő mosást követően a polimer hatékonyabb bejutása miatt 30 percig posztprimer komponenssel, majd tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-egér antitesttel inkubáltuk. Az immunreakcióhoz biotinmentes anti-egér IgG konjugált polimer (Dako Cytomation) előhívó rendszert használtunk. Az immunreakciót DAB szubsztrát/chromogén kit segítségével hívtuk elő. Háttérfestésként hematoxin festést alkalmaztunk. Pozitív kontrollként a vizsgált ismert *CALR* mutáns esetek megakaryocytái szolgáltak, negatív kontrollként ismert más driver mutációjú eseteket használtunk. A pozitív immunreakciót a megakaryocyták citoplazmájának jelölődésekor fogadtuk el.

A CAL2 immunhisztokémiai reakció elvégzését követően a metszeteket Panoramic 250 Flash III scan berendezéssel szkenneltük (3DHISTECH™) 20X nagyítású nagy látószögű (NA=0,83) Zeiss objektívet alkalmazva (Carl Zeiss Microimaging INC). A digitalizált metszeteket Caseviewer szoftvert (3DHISTECH™) alkalmazva vizsgáltuk.

### 3.2.3 A mutáns CALR protein expresszió kvantifikálása

A metszeteken számos paraméter meghatározásra került. A CAL2 antitest specifikusan a megakaryocyták citoplazmáját jelöli, ezért minden metszeten 100 random megakaryocytá citoplazmát annotáltunk. Az annotált megakaryocyták intenzitását negatívtól 3+ pozitívításig adtuk meg. Negatívnak az immunreakciót nem mutató sejteket, 3+ pozitívnak az erős, intenzív IHC reakciót mutató sejteket tekintettük. A köztes 1+ és 2+ pozitívítás értékelése nehezebb volt, hiszen nem volt egy objektív skála, amihez hasonlítani lehetett volna, de az 1+ pozitívnak az igen gyenge, de specifikus, citoplazmatikus CAL2 jelölődést tekintettük, és 2+ pozitívnak a közepes intenzitású immunreakciót ami az igen gyengénél erősebb, de a 3+ pozitív megakaryocytáknál gyengébb. A megakaryocyták citoplazmáinak intenzitási adataiból a manuális H-score-t és, 2+/3+ megakaryocyták arányát határoztuk meg. Ezek mellett CAL2 pozitív nonmegakaryocytá sejtek arányát is rögzítettük minden esetben. A metszeteket két független patológus nézte át (Dr. Kajtár Béla és Dr. Mózes Réka)



**1. ábra.** Különböző intenzitással jelölődő megakaryocyták. 0: negatív megakaryocytá. 1+: gyenge CAL2 pozitívítást mutató megakaryocytá, 2+: mérsékelt intenzitású CAL2 jelölődést mutató megakaryocytá. 3+: erős CAL2 intenzitást mutató megakaryocytá. (saját felvételek)

### 3.3 Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism szoftverrel készítettük. Az összehasonlításokhoz két változó esetén normál eloszlást mutató folytonos változó esetén t próbát, nem Gauss-eloszlást mutató folytonos változó esetén Mann-Whitney U-próbát alkalmaztunk, több változó esetén ANOVA analízist használtunk. ANOVA analízis esetén post-hoc tesztként Tukey- vagy Bonferroni-tesztet alkalmaztunk. Korreláció számításához Pearson-próbát használunk. a P értékeket 0,05-ös érték vagy annál alacsonyabb esetén tekintettük szignifikánsnak.



## 4. Eredmények

### 4.1 A driver mutációs státusz és klinikai korrelációk

Az ET esetek háttérében álló driver mutációk megoszlása a következőképpen alakult: *JAK2* V617F mutáció igazolódott az esetek 55,8%-ában (237/425), *CALR* mutációt az esetek 24,5%-a (104/425) hordozott, míg *MPL* mutáció (W515A/K/L/R) az esetek 1,6% -ában igazolódott (7/425). Az ET-s betegek között egy *JAK2* V617F és *CALR* mutációt is hordozó esetet azonosítottunk (0,2%). A fennmaradó 76 ET eset (17,9%) negatívnak bizonyult mindhárom driver mutációra. A PMF esetek háttérében álló driver mutációk a következő eloszlásban voltak jelen: az esetek 58,6%-ában (133/227) *JAK2* V617F mutáció volt azonosítható, *CALR* mutáció az esetek 21,6%-ában (49/227) volt detektálható, míg *MPL* mutációt összesen 16 esetben (7%) azonosítottunk. Mindezek mellett két *CALR* és *MPL* kettős mutációt hordozó esetet is azonosítottunk (0,9%). A PMF csoport 11,9%-át (27/227) alkották a tripla vad esetek (1. táblázat).

A teljes betegcsoportban összesen 24 féle *CALR* mutációt azonosítottunk, ebből 12 új, eddig még nem azonosított *CALR* mutáció. Az újonnan azonosított mutációk között 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű, két ritka in-frame mutációt (c.1142\_1144del - E381del és c.1191\_1199del - E398\_D400del) és egyéb mutációkat is azonosítottunk, melyek közül az egyik egy korai stop-kodonnak köszönhetően protein-trunkációt eredményezett (c.1110\_1141del, E371fs\*6).

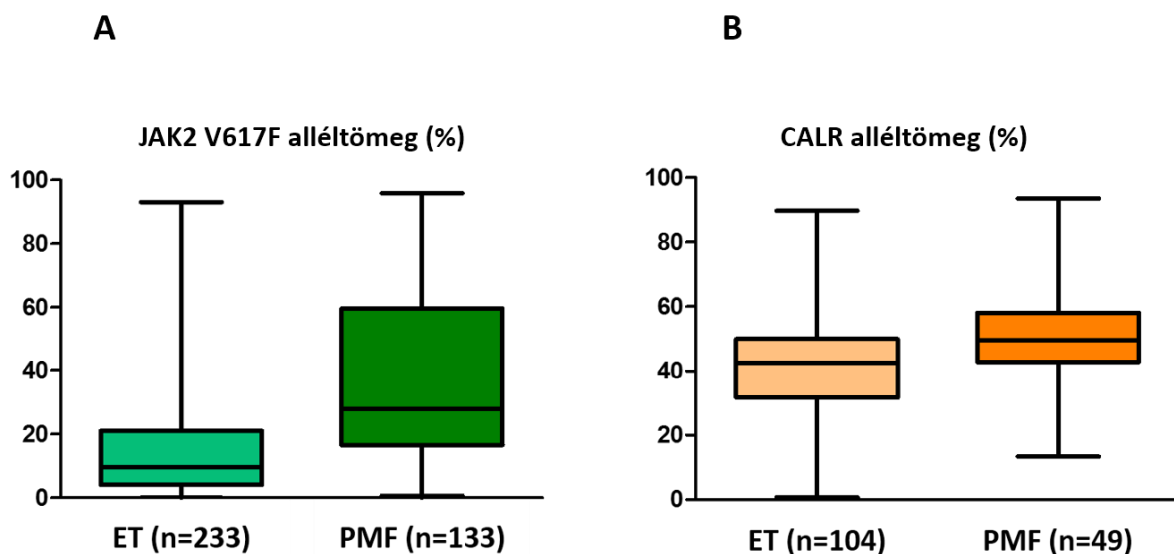
#### 1. táblázat: A *JAK2*, *CALR* és *MPL* driver mutációk eloszlása a vizsgált mintában

MPN (n=652)	Előfordulás (eset /összes eset)	Gyakoriság (%)	Nemzetközi gyakoriság (%)
<b>Essentiális thrombocythemia (n=425)</b>			
<i>JAK2</i> V617F mutáció	237	55.8	50-60
<i>CALR</i> mutáció	104	24.5	25-30
<i>MPL</i> mutáció	7	1.6	1-2
<i>JAK2</i> V617F - <i>CALR</i> kettős mutáció	1	0.2	<1
Tripla vad	76	17.9	10
<b>Primer myelofibrózis (n=227)</b>			
<i>JAK2</i> V617F mutáció	133	58.6	50-55
<i>CALR</i> mutáció	49	21.6	25-30
<i>MPL</i> mutáció	16	7.0	3-5
<i>CALR</i> - <i>MPL</i> kettős mutáció	2	0.9	<1
Tripla vad	27	11.9	10

Megvizsgáltuk a driver mutációs státusz és a klinikai paraméterek összefüggéseit ET-ben és PMF-ben. Többek között előzőleg már leírt magasabb fehérvérsejt-szám és alacsonyabb thrombocytá szám volt *JAK2* mutáció esetén megfigyelhető ET-ben, azonban a *CALR* mutáció szubtypusa és a klinikum között nem figyeltünk meg összefüggést ET-ben.

## 4.2 A CALR és JAK2 mutációs allélfrekvencia és klinikai korrelációik

A mutációs alléltömeget és a fő klinikai paramétereket összehasonlítottuk ET-ben és PMF-ben. Nem minden beteg esetében sikerült valamennyi klinikai és laboratóriumi paramétert összegyűjteni, ezért paraméterenként vizsgálva a populációt más-más medián VAF értékeket kaptunk. A mutáns alléltömeg (amit a variáns allélfrekvenciával-VAF számszerűsítettünk) PMF-ben magasabbnak bizonyult, mint ET-ben mind JAK2 V617F mutáció (31,4% vs. 9,7%,  $p < 0,001$ ) (2/A. ábra), mind CALR mutáció esetén (49,6% vs. 42,5%,  $p < 0,001$ ) (2/B. ábra).



**2. ábra.** A (A) JAK2 V617F és a (B) CALR mutáns alléltömeg eloszlása ET és PMF esetén.

A mutáns alléltömeg és a klinikum összefüggések vizsgálatának céljából a populációt a medián érték mentén alacsony és magas alléltömegegél bíró csoportokra osztottuk.

JAK2 mutáció esetében, azokban az ET esetekben, ahol a *JAK2* mutáns alléltömege meghaladta a medián értéket, a thrombotikus események aránya szignifikánsan gyakoribb volt (32,3% vs. 13,8%,  $p = 0,02$ ). ET-ben a magasabb *JAK2* VAF szignifikánsan magasabb szérumszintű LDH-val (403 vs. 360 NE/l,  $p = 0,03$ ), szignifikánsan magasabb fehérvérsejt-számmal (10,8 vs. 9,6 G/l,  $p = 0,04$ ) és szignifikánsan magasabb thrombocyta számmal (814 vs. 695,5 G/l,  $p = 0,004$ ) társult. Nem volt azonban szignifikáns különbség az életkor és a hemoglobinkoncentráció tekintetében, az AML- vagy myelofibrotikus transzformációs ráta gyakoriságában, vagy a citoreduktív terápia szükségességének gyakoriságában (22. táblázat) a mediánértéknél magasabb és alacsonyabb mutáns *JAK2* alléltömegegű csoportok között. A PMF eseteknél nem

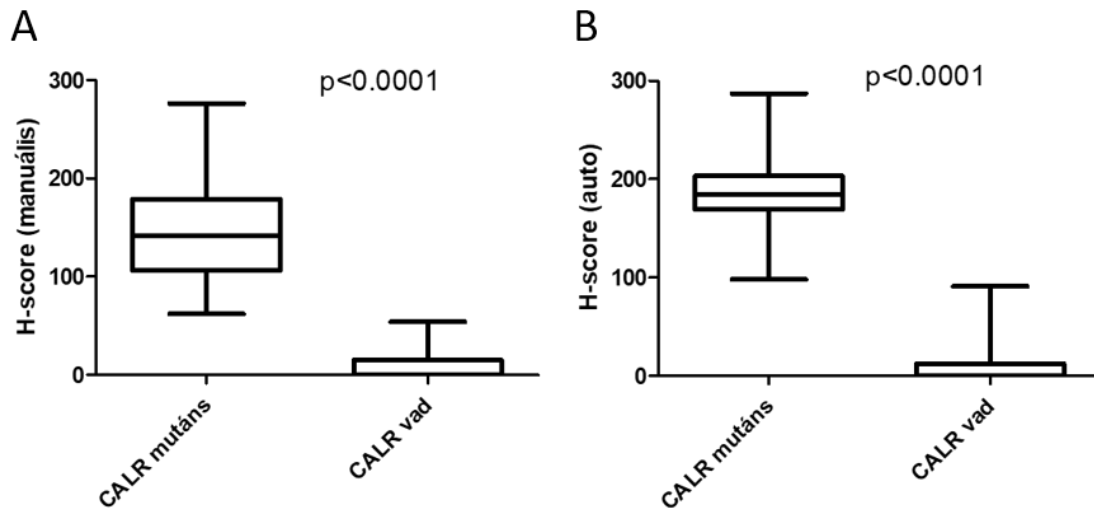
tudtunk megfigyelni egyik vizsgált paraméter esetén sem szignifikáns különbséget a mediánál alacsonyabb és magasabb mutáns *JAK2* burden esetén sem.

*CALR* esetében is megvizsgáltuk a mutáns allélfrekvencia esetleges összefüggését a laboratóriumi és klinikai paraméterekkel, úgy, hogy a VAF mediánértéke mentén két csoportra bontottuk a betegpopulációt. ET esetében a mediánál magasabb *CALR* VAF értékek esetén szignifikánsan ( $p = 0,01$ ) magasabb szérum LDH értékeket tapasztaltunk, mint a mediánál alacsonyabb *CALR* VAF esetén (510 vs. 351 NE/l), emellett a mediánál magasabb VAF értékek mellett tendenciózusan ( $p = 0,07$ ) alacsonyabb haemoglobin szinttel (12 vs. 13,6 g/dl), és tendenciózusan ( $p = 0,08$ ) emelkedett myelofibrotikus transzformációs rátával (19% vs. 5%,  $p = 0,08$ ) jellemezhetőek. ET esetén a követés ideje alatt észlelt thrombotikus események aránya gyakoribb volt a mediánértéknél magasabb *CALR* VAF értékek esetében, azonban ez a különbség sem bizonyult szignifikánsnak ( $p = 0,18$ ). PMF esetén nem találtunk olyan klinikai paramétert, amely a medián *CALR* VAF értékek mentén ketté választva a populációt szignifikánsan különbözött volna.

#### 4.3 Immunhisztokémia

A molekuláris vizsgálattal vad típusú *CALR* esetek ( $n=26$ ) egy-egy halvány jelölődéstől eltekintve nem mutattak specifikus CAL2 jelölődést. A negatív esetek manuális H score ( $H_{\text{man}}$ ) értékének átlaga 8,6 (tartomány: 0-54), az automatikus képanalízissel nyert intenzitási score ( $H_{\text{auto}}$ ) átlagértéke 10,0 (tartomány: 0-91) volt. Az eseteket két hematopatológus (Dr. Mózes Réka és Dr. Kajtár Béla) egymástól függetlenül CAL2 negatívnak nyilvánította.

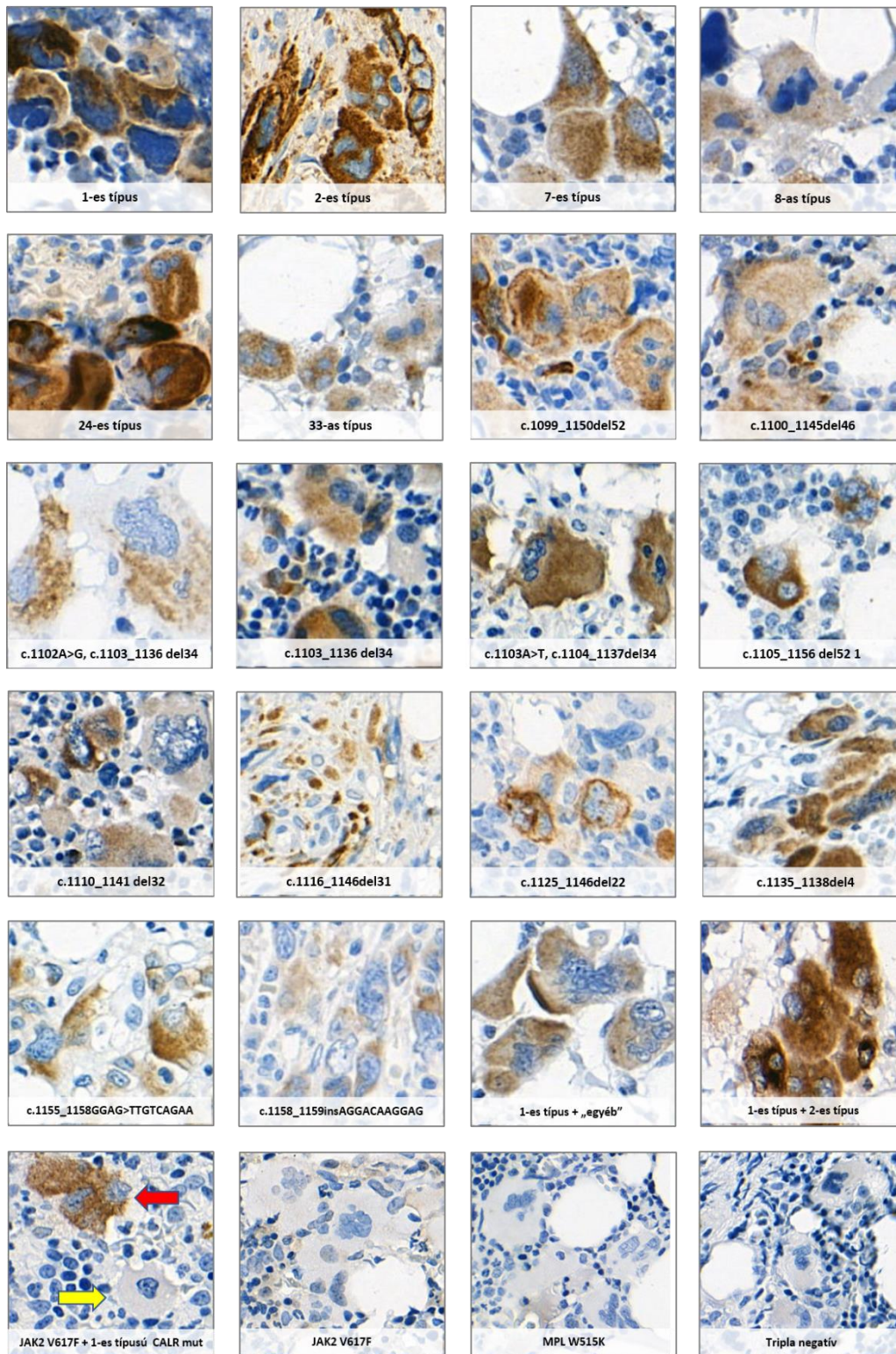
A molekuláris vizsgálattal *CALR* mutáns esetek mindegyikét ( $n=91$ ) CAL2 IHC-vel is pozitívnak nyilvánították a vizsgáló patológusok, emellett az IHC pozitív és IHC negatív esetek a H score-ok tekintetében is jól elkülönültek. A  $H_{\text{man}}$  score értékek a CAL2 pozitív esetek esetében 62-276 közötti tartományba estek, átlaguk 144,5 (3/A. ábra); míg a  $H_{\text{auto}}$  score-ok a 98-287 közötti tartományba estek, a score-ok átlagértéke 186,5 volt (3/B ábra). A manuális  $H_{\text{man}}$  és az automatizált analízisből származó  $H_{\text{auto}}$  score-ok egymással szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) és erősen ( $r=0,8576$ ) korreláltak.



**3. ábra** A CALR mutáns és vad típusú esetek a manuális H score ( $H_{\text{man}}$ ) (A) és az automatikus képanalízissel nyert H score ( $H_{\text{auto}}$ ) (B) alapján is megbízhatóan elkülöníthetők a CAL2 antitest alkalmazásával.

Az ET és PMF esetek között nem volt különbség a CAL2 IHC jelölődési mintázatában, minden esetben – változó intenzitású – diffúz citoplazmatikus jelölődést figyeltünk meg. Minden típusú mutációról és kontroll esetből a 4. ábrán mutatunk be reprezentatív felvételeket.

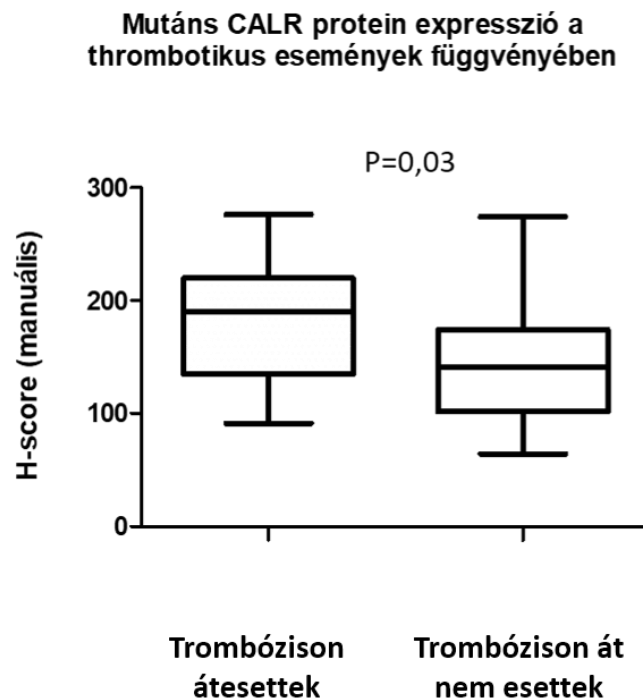
A CAL2 IHC-vel vizsgált CALR mutáns esetek többségét az 1-es és 2-es típusú CALR mutációk tették ki (51,6% és 25,27%), azonban 16 ritka CALR mutációt és három többszörös mutációt hordozó eset csontvelői mintáján is végeztünk CAL2 IHC vizsgálatot. az összes általunk vizsgált CALR pozitív eset CAL2 pozitívnak bizonyult. Kutatócsoportunk 16 különböző típusú ritka CALR mutáció esetében elsőként demonstrálta a CAL2 immunhisztokémia alkalmazhatóságát a CALR mutációs státusz meghatározásában.



**4. ábra:** CAL2 monoklonális antitesttel pozitívan jelölődő különböző *CALR* mutációk bemutatása, amely mellett a *CALR* negatív kontrollok CAL2 negatívak. Egy *CALR/ JAK2* V617F dupla mutáns eset is látható, amelyben egy pozitív (piros nyíl) és egy negatív (sárga nyíl) megakaryocita is látható.

A vizsgált *CALR* mutáns esetek 46%-ában (42/91) a non-megakaryocita sejtekben is megfigyeltünk CAL2 jelölődést, főként a granulopoetikus prekurzorokban. A pozitív non-megakaryocita sejtek aránya 0-65%-os tartomány között változott, de jellemzően, alacsonyabb arányban voltak megfigyelhetőek (1-5%).

Az IHC-vel meghatározott festődési intenzitási score-okat ( $H_{\text{man}}$  és  $H_{\text{auto}}$ ), a 2+ és 3+ pozitív sejtek arányát és a non-megakaryocita sejtek arányát is megvizsgáltuk, mutatnak-e összefüggést a betegek bármilyen klinikai paraméterével. Sem a  $H_{\text{man}}$  és  $H_{\text{auto}}$  score-ok, sem a közepesen és erős intenzitással jelölődő sejtek aránya, sem a CAL2+ non-megakaryocita sejtek aránya nem mutatott összefüggést sem a betegek LDH-szintjével, thrombocyta számával, vörösvértest számával, fehérvérsejt-számával, hematokrit-értékkel (adatok megjelenítés nélkül). Azonban a major thrombotikus eseményeken átesett betegeknél szignifikánsan magasabb  $H_{\text{man}}$ -score volt megfigyelhető ( $p = 0,03$ ) szemben azokkal a betegekké, akiknél major thrombotikus eseményeket nem dokumentáltak (5. ábra).



**5. ábra:** A major thrombotikus eseményeken átesett betegeknél (n=9), amelyek artériás trombózisokat (artéria poplitea oclusio, acut myocardialis infarctus, ischaemiás stroke) és vénás trombózisokat (pulmonális embólia, v. femoralis trombózis, v. hepatica trombózis, és v. portae trombózis) foglalnak magukba, szignifikánsan magasabb  $H_{\text{man}}$  score-t figyeltünk meg a thrombotikus eseményeken át nem esett betegekhez (n=43) képest ( $p = 0,03$ ).

#### 4.4 A molekuláris és fehérje szintű eredmények korrelációja

A *CALR* variáns alléltömeg nem mutatott összefüggést az IHC intenzitásból nyert adatainkkal ( $H_{\text{auto}}$  és  $H_{\text{man}}$  score-ok). A közepes és erős IHC reakciót mutató megakaryocyták aránya és a CAL2 pozitív non-megakaryocyta sejtek aránya úgy tűnik, magasabb *CALR* VAF értékkel társul, de az összefüggés nem érte el a szignifikancia szintjét.

## 5. Következtetések

Munkánk során a *JAK2* és *CALR* gének mutációinak mennyiségi analizisét végeztük el gén- és fehérjeszinten egy hazai Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziákban szenvedő betegcsoport esetében. A szakirodalomban már ismert összefüggéseken túl a disszertáció eredeti megállapításai az alábbi néhány pontban foglalhatóak össze:

- Munkacsoportunk 12 új, korábban még nem közölt *CALR* mutációt azonosított.
- A mediánértéknél magasabb *JAK2* V617F mutáns allél-tömeg esszenciális thrombocytemiában szignifikáns összefüggést mutatott a magasabb LDH-értékkel, thrombocytá számmal és fehérvérsejt számmal.
- Esszenciális thrombocytemiában és primer myelofibrózisban is szignifikánsan gyakrabban volt megfigyelhető a splenomegália a mediánértéknél magasabb *JAK2* V617F alléltömeggel rendelkező csoportban.
- A magas *CALR* mutáns alléltömeg összefüggést mutat a diagnózissal: Magasabb burden proliferatívabb fenotípussal asszociál. Magasabb burdenre jellemző a PMF, a type1 mutáció, a magasabb thrombotikus ráta, és a magasabb myelofibrotikus transzformációs ráta.
- A mediánértéknél alacsonyabb alléltömeggel asszociál az ET, a type2 mutáció, és az indolensebb fenotípus, ritkább MF transzformációs és thrombotikus ráta.
- A *CAL2* immunhisztokémia specifikusan azonosította az összes általunk vizsgált (n=91, összesen 21 féle) *CALR* mutációt hordozó esetet.
- Munkacsoportunk elsőként vizsgált 16 féle ritka *CALR* mutációt a *CAL2* monoklonális antitest alkalmazásával.
- A *CAL2* IHC-vel fehérjeszinten vizsgált mutáns proteinexpresszióból származtatott számszerűsített paraméterek közül a Hman score-ban a thrombotikus eseményen átesett és át nem esettek szignifikánsan elkülönültek egymástól esszenciális thrombocytemiában és primer myelofibrózisban egyaránt.



## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Mózes R**, Gángó A, Sulák A, Vida L, Reiniger L, Timár B, Krenács T, Alizadeh H, Masszi T, Gaál-Weisinger J, Demeter J, Csomor J, Matolcsy A, Kajtár B and Bödör C. Calreticulin mutation specific cal2 immunohistochemistry accurately identifies rare calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Pathology* 2018. DOI: 10.1016/j.pathol.2018.11.007. **IF: 3.068.**
2. Gángó A, **Mózes R**, Boha Z, Kajtár B, Timár B, Király PA, Kiss R, Fésüs V, Nagy N, Demeter J, Körösmezey G, Borbényi Z, Marton I, Szőke A, Masszi T, Farkas P, Várkonyi J, Plander M, Pósfai É, Egyed M, Pál K, Radványi G, Hamed A, Csomor J, Matolcsy A, Alpár D, Bödör C. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research* 2018, 65:42-48. **IF: 2.319.**
3. **Mózes R**, Gángó A, Boha Z, Csomor J, Bödör C. [The role of driver and subclonal mutations in pathogenesis of primary myelofibrosis]. *Magyar Onkológia*. 2017, 61 :36-45.

### 6.2 Egyéb témában megjelent közlemények

1. Réger B, Losonczy H, Nagy Á, Péterfalvi Á, **Mózes R**, Pótó L, Farkas N, Kovács GL, Miseta A, Hussain A, Tóth O. Detection of high-risk thrombophilia with an automated, global test: the Coagulation Inhibitor Potential assay. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2018, 29: 435-441. **IF: 1.119.**
2. Réger B, Péterfalvi A, Litter I, Pótó L, **Mózes R**, Tóth O, Kovács GL, Losonczy H. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thromb Res*. 2013, 131: e183-7. **IF: 2.427.**