GENETIKAI ELTÉRÉSEK GÉN- ÉS FEHÉRJESZINTŰ MENNYISÉGI VIZSGÁLATÁNAK KLINIKAI JELENTŐSÉGE PHILADELPHIA KROMOSZÓMA NEGATÍV MYELOPROLIFERATÍV NEOPLAZMÁKBAN

Doktori értekezés

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
Komplex vizsga bizottság elnöke:	Dr. Kulka Janina, DSc, egyetemi tanár
Komplex vizsga bizottság tagjai:	Dr. Horváth Laura, PhD, egyetemi tanársegéd Dr. Tóth Erika, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke: ***4***

I. Bevezetés ***8***

I.1 A normális csontvelői vérképzés **8**

I.2 Myeloproliferatív neopláziák (MPN) **9**

I.2.1 Klasszikus Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák 11

I.2.1.1 Polycytaemia Vera 12

I.2.1.2 Esszenciális Thrombocytemia 14

I.2.1.3 Primer Myelofibrózis 16

I.3 Philadelphia kromoszóma negatív neopláziák genetikai háttere **20**

I.3.1 A *JAK2* mutációi 21

I.3.2 Az *MPL* mutációi 23

I.3.3 A Calreticulin mutációi 24

I.3.4. A driver mutációk klinikai jelentősége Philadelphia negatív MPN-ben 27

I.3.5 A mutáns alléltömeg jelentősége MPN-ekben 30

II. Célkitűzések ***31***

III. Módszerek ***32***

III.1 Molekuláris genetikai módszerek **32**

III.1.1 Beteganyag 32

III.1.2 DNS izolálás 33

III.1.3 A *JAK2* V617F mutáció kimutatása valósidejű PCR-rel 33

III.1.4 *CALR* mutációk analízise 34

III.1.4.1 *CALR* polimeráz láncreakció (PCR) 34

III.1.4.2 *CALR* fragmensanalízis 36

III.1.4.3 CALR szekvenciaanalízis 36

III.2 Immunhisztokémia **38**

III.2.1 Beteganyag 38

III.2.2 CAL2 immunhisztokémia 39

III.3 Digitális képanalízis **39**

III.3.1 A metszetek értékelése 40

III.3.1.1 Manuális H score (H_{man} score) 41

III.3.1.2 Automatikus H score (H_{auto} score) 41

III.4 Statisztikai módszerek 42
IV. Eredmények 43
IV.1 A driver mutációk megoszlása a vizsgált betegcsoportban 43
IV.2 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése 47
IV.2.1 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése ET-ben 47
IV.2.2 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése PMF-ben 49
IV.3 A mutáns allélfrekvencia és a klinikum összefüggése 50
IV.3.1. *JAK2* V617F VAF hatása a klinikai paraméterekre 50
IV.3.2 *CALR* variáns allélfrekvencia és a klinikum összefüggése 53
IV.4 CALR mutációk fehérje-szintű analízise 57
IV.5 A kvantitatív IHC adatok és a klinikum összefüggése 61
IV.6 Fehérjeszintű és molekuláris eredmények összevetése 62
V. Megbeszélés 64
VI. Következtetések 70
VII. Összefoglalás 71
VIII. Summary 72
IX. Irodalomjegyzék 73
XI. Saját publikációk jegyzéke 86
XII.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények 86
XI.2. Egyéb témában megjelent közlemények 86
XII. Köszönetnyilvánítás 87

Rövidítések jegyzéke:

6-FAM -	6-karboxifluoreszcein
A-	adenin
ABL1-	Abelson tirozin-kináz
AML -	Akut myeloid leukemia
ASXL1-	„Additional sex combs like transcriptional regulator 1”
BCR-	„Breakpoint cluster region”
bp -	bázispár
BFU-	„Brust forming unit”
C-	citozin
C -	cisztein
CAL2 -	anti-mutáns calreticulin antitest, CAL2-es klón
CALR -	Calreticulin
CBL -	Casitas B-lineage Lymphoma
CEL -	Krónikus Eozinofil leukémia
cDNS -	Komplementer dezoxiribonukleinsav
CXCR4 -	4-es típusú C-X-C kemokin receptor
CXCL12 -	C-X-C motívumot tartalmazó kemokin 12
CFU -	Kolóniaformáló egység
CLP-	„common lymphoid progenitor”
CML -	Chronicus Myeloid Leukemia
CMMoL -	Chronicus myelomonocytaer leukemia
CMP-	„common myeloid progenitor”
CMPD -	„chronic myeloproliferative disease”
CNL -	Krónikus Neutrofil Leukemia
D -	aszparaginsav
DAB -	3,3′-Diaminobenzidin
ddNTP -	didezoxinukleotid-trifoszfát
ddPCR -	„digital droplet” polimeráz láncreakció
del -	deléció
DIPSS -	„dynamic prognostic scoring system”

DIPSS-plus - „dynamic prognostic scoring system-plus”

DNMT1 - DNS-(citozin-5)-metil-transzferáz 1

DNMT3A - „DNS-(citozin-5)-metiltranszferáz 3A

DNS - dezoxinukleinsav

dNTP - dezoxinukleotid-trifoszfát

E - glutaminsav

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

EMH - extramedulláris haemopoesis

EPO - erythropoetin

EPO-R - erythropoetin receptor

ER - endoplazmás retikulum

ERK1/2 - „extracellular signal–regulated kinase 1/2”

ET - esszenciális thrombocytemia

EZH2 - „enhancer of zeste homolog 2”

F - fenilalanin

FFPE - Formalin fixált parafinba ágyazott

G - guanin

G - Glicin

G/l - giga (10^9)/liter

H - Hisztidin

H_{auto} - „automatikus” H-score

Hb - hemoglobin

Hct - hematokrit

HE - Haematoxilin-eozin

H_{man} - „manuális” H-score

HRP- „harshperoxidase” - tormaperoxidáz

HSC - haemopoetikus őssejt

I - izoleucin

IDH1/2 - izocitrát-dehidrogenáz 1/2

IgG - immunglobulin G

indel - inzerció vagy deléció

ins - inzerció

IPSET – score -	„International prognostic Score of Thrombosis for ET”
JAK-	Janus arcú kináz
JAK2 -	Janus arcú kináz 2
JH1 -	„Janus kinase homology domain 1”
JH2 -	„Janus kinase homology domain 2”
K -	Lizin
kb -	kilobázis
L -	Leucin
LDH -	laktát-dehidrogenáz enzim
LNK -	Links
MDS -	Mielodiszpláziás szindróma
MKB -	megakaryoblast
MPL -	„myeloproliferative leukemia virus oncogene”
MPN -	Myeloproliferatív neoplázia
MPN - U -	Myeloproliferatív neoplázia másképp nem osztályozott
mRNS -	messenger ribonukleinsav
N -	aszparagin
NE -	nemzetközi egység
NPÉ -	Negatív prediktív érték
P -	Prolin
p -	a kromoszóma rövid karja
PCR -	polimeráz láncreakció
PDGFR α -	„platelet-derived growth factor receptor α”
PDGFR β -	„platelet-derived growth factor receptor β”
Ph -	Philadelphia- kromoszóma
PMF-	primer myelofibrózis
PPÉ -	pozitív prediktív érték
PV -	polycytaemia vera
Q -	glutamin
qPCR -	valósidejű polimeráz láncreakció
q -	a kromoszóma hosszú karja
R -	arginin

RARS-T -	Refrakter anaemia gyűrűs sideroblastokkal és thrombocytemiával
SH2 -	„src homology 2”
STAT –	„signal transducer and activator of transcription”
STAT5	„signal transducer and activator of transcription 5”
T -	Timin
t -	transzlokáció
TBS -	„Tris- buffered saline”
TCT -	thrombocyta
TIA -	Tranziens ischaemiás attack
TGF-β -	„Transforming growth factor beta”
TPO -	Thrombopoetin
V -	valin
VAF -	Variáns allélfrekvencia
W -	triptofán
wt -	vad típus („wild type”)
WHO -	Egészségügyi világszervezet („Word Health Organisation”)

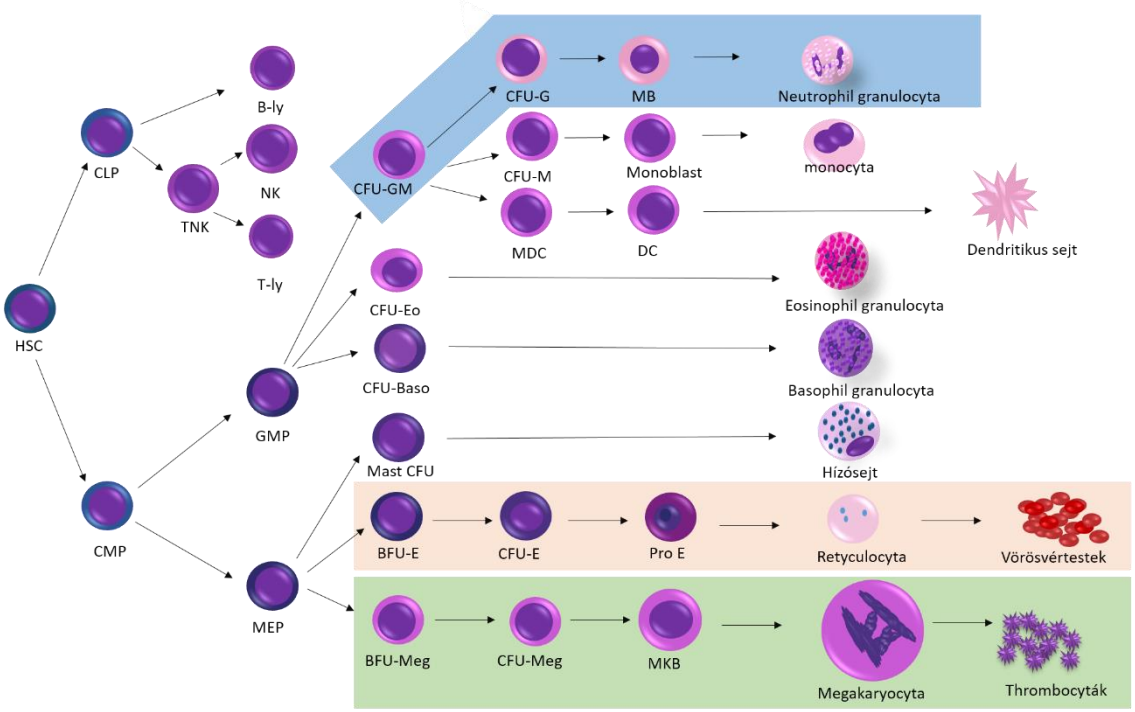
I. Bevezetés

I.1 A normális csontvelői vérképzés

Az emberi szervezet sejtjei folyamatosan képződnek és pusztulnak, ez alól nem képeznek kivételt a vér alakos elemei sem. A vérképzés egy finoman, több szinten szabályozott folyamat, amely a vérképzőszervek specifikus mikrokörnyezetében zajlik. Felnőttkorban a vörös csontvelő látja el a vérképző funkciót, de embrionális és magzati korban a szikzacskó, majd a máj, lép, nyirokcsomók rendelkeznek vérképző funkciókkal, amelyet fokozatosan vesz át a csontvelő. Gyermekkorban szinte mindegyik csont csontveleje termel vérsejteket, de felnőttkorra már csak a lapos csontok és a hosszú csöves csontok proximális végei látják el ezt a feladatot. A folyamat érdekessége, hogy bizonyos betegségekre jellemző az extramedulláris haemopoesis (EMH), ezen esetekben a vérképző szigetek elsősorban azokban a szervekben telepszenek meg, amelyek magzati korban részt vettek a haemopoesisben.

A folyamat origója a pluripotens hemopoetikus őssejt (HSC), amely korlátlan önmegújító képessége mellett bármely sejtvonal irányába történő differenciálódásra is képes. A differenciálódás során az első köztes alakok a totipotens közös lymphoid progenitor (CLP) és a közös myeloid progenitor (CMP) sejtek, amelyek két egymástól jól elkülönülő érési ágat reprezentálnak. A CMP sejtekből a következő lépésben a granulocyta-monocyta sejtvonal irányába differenciálódó granulocyta-monocyta progenitor (GMP) és az erythroid-megakaryocyta-hízósejt vonal felé differenciálódó myeloid-erythroid progenitor (MEP) jön létre. Ezen lépéseket követően kolóniaformáló egységek (CFU) jönnek létre, amelyek már csak limitált számú, döntően egy-egy dedikált sejtvonal irányába képesek differenciálódni. Így minden sejtsor felsorolása nélkül néhányat kiemelve: erythroid-CFU vonalon végül vörösvérsejtek, a megakaryocyta-CFU (CFU-meg) vonalon végül megakaryocyták képződnek (*1. ábra*).

A lymphoid előalakok érésének megtárgyalása a dolgozat témáján túlmutat, így azok részletezésére nem kerül sor.



1. ábra: A csontvelői haemopoesis sematikus folyamatábrája. A folyamat a haemopoetikus őssejttel (HSC) indul, majd a közös lymphoid progenitor (CLP) és közös myeloid progenitor (CMP) sejtek alakulnak ki. A lymphoid sejtvonalakon NK-sejtek, T- és B- lymphocyták jönnek létre, a T- és NK sejtek egy közös alakon keresztül (TNK) alakulnak ki, a B-lymphocyták külön útvonalon. A CMP-ből myeloid erythroid prekurzoron keresztül (MEP) alakulnak ki „burst forming unit”-okon (BFU) és kolóniaformáló egységeken keresztül (CFU) végső soron a megakaryocyták, a vörösvértestek és a hízósejtek. A granuopoetikus-monocita prekurzoron keresztül (GMP) alakulnak ki CFU-kon keresztül a bazofil és eozinofil granulocyták. A neutrophil granulocyták, a dendritikus sejtek és a monocyták egy közös CFU-ből, a CFU-GM-ből válnak szét. (Saját ábra)

I.2 Myeloproliferatív neopláziák (MPN)

A myeloproliferatív neopláziák (MPN) neve árulkodik arról, hogy mi a betegségcsoport lényege: az MPN-ek klonális, haemopoetikus őssejt (HSC) eredetű és proliferatív, azaz sejtszaporulattal járó neoplasztikus természetű betegségek. A proliferatív, neoplasztikus eltérések a myeloid sejtsorok közül (erythroid-, megakaryo- vagy granulopoetikus) egyet vagy többet érintenek. A régebbi elnevezésük, a chronicus myeloproliferatív betegség

(CMPD) nem tükrözte a betegségcsoport neoplasztikus természetét. Az MPN-ek klasszifikációját az *1. táblázat* tartalmazza. Kezdetben az MPN-ek proliferatívak, azaz a perifériás vérben az érintett sejtvonal(ak)on kifejlődő sejtek felszaporodnak; a panaszok és komplikációk entitásfüggőek ugyan, de közös vonásuk, hogy a túlszaporodott sejteknek köszönhetően alakulnak ki. Ilyen tünetek például a hiperviszkozitás, ischaemiák, érelzáródások, splenomegalia és hepatomegalia. A betegséglefolyás és a végkifejlet azonban entitásfüggő, bár az egyes entitásokon belül is vannak különbségek, de általában az esszenciális thrombocytaemia (ET) lefolyása indolens, addig más betegségek pl.: a primer myelofibrózis (PMF) gyakran igen progresszív lefolyással bírnak. A progresszívebb betegségek gyakran csontvelő-elégtelenségbe vagy blasztos transzformációba torkollanak, amelyek a beteg halálát is okozhatják.

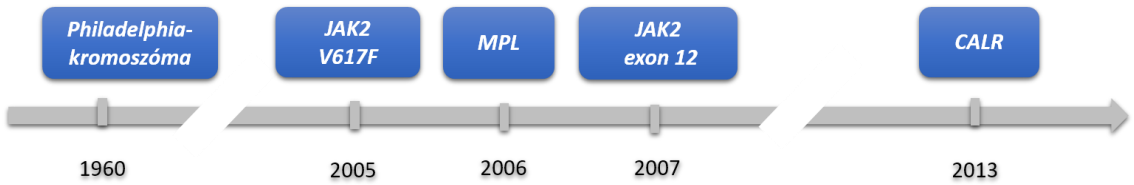
Az egyik legfontosabb és legismertebb entitás a csoportban krónikus myeloid leukémia (CML), amely a 9-es és 22-es kromoszóma transzlokációja következtében kialakuló Philadelphia-kromoszómának és az azon található *BCR-ABL1* fúziós-génnek köszönhetően alakul ki. A BCR-ABL1 transzlokáció volt az első driver mutáció, amelyet 1960-ban fedeztek fel (1). Azokat az MPN-eket, amelyek nem hordozzák a Philadelphia-kromoszómát, Philadelphia kromoszóma negatív MPN-eknek hívjuk.

1. táblázat: A myeloid neopláziák WHO klasszifikációja (2016).

A myeloproliferatív neopláziák WHO klasszifikációja	
Krónikus Myeloid Leukemia, BCR-ABL1 pozitív	(CML)
Krónikus Neutrofil leukémia	(CNL)
Polycytaemia Vera	(PV)
Esszenciális Thrombocytaemia	(ET)
Primaer Myelofibrosis	(PMF)
Prefibrotikus/korai myelofibrosis	
Manifeszt myelofibrosis	
Chronikus eosinophil leukemia	(CEL)
Myeloproliferatív neoplázia nem klasszifikálható	(MPN-U)

I.2.1 Klasszikus Philadelphia kromoszóma negatív myeloproliferatív neopláziák

A Philadelphia negatív MPN-ek közül három entitás: a primer myelofibrózis (PMF), az esszenciális thrombocytaemia (ET) és a polycytaemia vera (PV) gyakoribb a többi Philadelphia kromoszóma negatív MPN-nél, ezeket az entitásokat gyakran „klasszikus" Philadelphia negatív MPN-eknek is hívjuk. A klasszikus Philadelphia negatív neopláziák hátterében álló driver mutációkat az elmúlt 13 évben azonosították: 2005-ben a Janus-2 kináz (*JAK2*) mutációit (2), 2006-ban a thrombopoetin receptor (*MPL*) mutációit (3; 4) és végül 2013-ban a *Calreticulin* gén (*CALR*) mutációt (5; 6) (*2. ábra*). Időközben olyan mutációk jelenlétére is fény derült, amelyek az entitások kisebb százalékában fordulnak elő, és ugyan nem szükségesek a betegség kialakulásához, jelentős betegség-kimenetel módosító hatásuk van. Ezeket fenotípus-módosító mutációknak hívjuk, jelentőségüket leginkább PMF-ben vizsgálták, azonban ET-ben és PV-ben is megjelenhetnek.



2. ábra: Driver mutációk myeloproliferatív neopláziákban a felfedezésük sorrendjében. A t(9;22) kapcsán kialakuló Philadelphia-kromoszóma leírása úttörő felfedezésnek bizonyult a myeloproliferatív kórképek hátterének megismerésében. Ezt követően közel öt évtizedet kellett várni újabb áttörő felfedezésre, a *JAK2* V617F mutáció onkogén szerepének felfedezésére, amely új lendületet adott az MPN-ek genetikai feltérképezésének. Ezt követően felgyorsultak az események, az *MPL* és a *JAK2* 12-es exon mutációit két éven belül leírták, majd a legutóbbi nagy áttörés a driver mutációk tekintetében a *CALR* mutációk 2013-as leírása volt.

I.2.1.1 Polycytaemia Vera

A polycytaemia vera (PV) egy olyan Philadelphia negatív MPN, amelyre a vörösvértestek neoplasztikus túltermelődése jellemző. A betegség etio-pathogenezisében a *JAK2* szomatikus mutációi állnak. Az esetek túlnyomó többségében (98%-ában) a *JAK2* V617F pontmutáció felelős a neoplasztikus klón kialakulásáért, és a következményes JAK-STAT útvonal konstitutív, nem szabályozott aktiválásáért (7; 8). Azonban a háttérben állhatnak a *JAK2* 12-es exonjának szomatikus mutációi is alacsony százalékban. (A dolgozatban később a driver mutációk (II.3) részletesen bemutatásra kerülnek.) Az esetek egy kis részében (1-2%) nem található meg sem a *JAK2* V617F mutáció, sem a 12-es exon mutációi. Ezekben az esetekben egyelőre nem ismerjük a háttérben álló driver genetikai eltérést, így a kimutatható mutáció hiányában különösen fontos a polyglobuliát okozó egyéb betegségek kizárása.

A PV incidenciáját tekintve ritka betegség, évente 100000 lakosra vetítve 0,01-2,8 esetet diagnosztizálnak a fejlett országokban, (9) enyhe férfi predominancia jellemzi. Széles életkori tartományban találhatóak érintett betegek, azonban az átlagos életkor diagnózis idején 60 év. A betegség diagnosztikus kritériumait a *2. táblázat* tartalmazza.

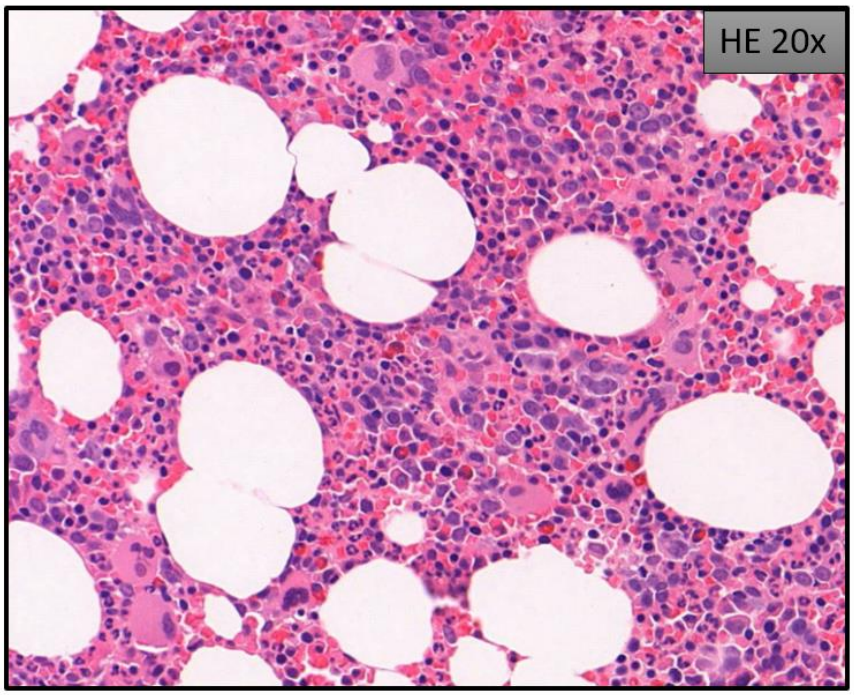
2. táblázat: A Polycytaemia vera diagnosztikus kritériumai (WHO, 2016).

A polycytaemia vera diagnosztikus kritériumai
Major kritériumok
1, emelkedett szérum haemoglobin koncentráció > 16,5g/dl férfiakban és > 16g/dl nőkben vagy emelkedett haematokrit érték: > 49 férfiakban és > 48 nőkben, vagy emelkedett vörösvértest-szám (25%-al a várható átlagos vvt szám felett) 2, a csontvelői biopszia három sejtvonalat érintő hiperpláziát mutat (panmyelosis), prominens erythroid, myeloid és megakariocyta hyperpláziával, pleomoph, változatos méretű érett megakariocytákkal 3, *JAK2V617F* mutáció vagy *JAK2* 12. exon mutáció jelenléte.
Minor kritériumok
Szubnormális erythropoetin szint

*A 2. fő kritérium (csontvelőbiopszia) nem szükséges tartós erythrocytozis esetében (ha a haemoglobin koncentráció férfiakban >18,5gdl vagy nőkben 16,5g/dl és a haematokrit érték férfiakban > 55,5% vagy nőkben >49,5%), ha a 3. major kritérium teljesül.

Mivel a betegség korai szakaszában jellemző a vörösvértestek túlprodukciója, ezért a klinikumban főként azok a tünetek jellemzőek, amelyek ezzel összefüggésbe hozhatóak: hiperviszkozitás, végtagi ischaemiák, artériás és vénás trombózisok: „különlegesebb" trombózisok, mint például véna lienalis trombózis, Budd-Chiari szindróma és artéria mesenterica trombózisok esetén PV-nek mindenképpen fel kell merülnie a kezelőorvosban. Szédülés, fejfájás, tranziens ischaemiás attak (TIA), esetleg stroke szintén jellemző tünet lehet. A PV-re jellemző a magas vörösvértest szám mellett a magas haemoglobin koncentráció, amely nem társul magas eritropoetin szinttel. A vörösvértestek képzése a többi vérsejthez hasonlóan a csontvelőben történik, a csontvelői kép sejtdús, mindhárom (granulopoetikus, erythropoetikus és megakaryocyta) sejtvonal hiperpláziája megfigyelhető, de az erythroid sejtvonal képviselőinek megszaporodása sokszor prominensebb, mint a másik sejtvonalaké (*3. ábra*). Fontos megjegyezni azonban, hogy a PV utánozhat más MPN-t, akár markáns megakaryocytózissal és thrombocytózissal is járhat, de ezen esetben a többi sejtvonalak hiperpláziája is megfigyelhető szemben az esszenciális thrombocytemiával, ahol a megakaryocytózis mellett a másik két sejtsoron a sejtarányok normálisak vagy akár enyhén visszaszorultak. PV-ben a hiperplázia gyakran szubkortikális. Enyhe fibrózis előfordulhat, azonban myelofibrózisra jellemző számottevő rost-szaporulat nem jellemző a betegségre. A vérképre magas abszolút sejtszámok jellemzőek, amelyek közül a vörösvértestek aránya (és a haemoglobin koncentráció emelkedése) a legkifejezettebb.

A betegség lefolyására terápia nélkül progresszivitás jellemző, ami egyéni eltéréseket mutat, a betegség kimenetele akár myelofibrotikus vagy blasztos transzformáció is lehet. A poszt-polycytaemiás fázisban a betegségre cytopeniák jellemzőek, és a betegség morfológiája és tünetei is nagyban hasonlítanak a primer myelofibrózishoz (PMF). Ilyenkor a betegség nomenklatúrája poszt polycytaemiás myelofibrózis. A driver mutációnak megfelelő (JAK2) inhibítorokkal, sejtcsökkentő terápiával kordában tartható, azonban a kezelés részletezése meghaladná a dolgozat kereteit.



3. ábra: A PV jellegzetes csontvelői képe (Hematoxilin-eozin, 20X). A csontvelő cellularitása emelkedett, háromvonalas hiperplázia és pánmyelosis látható.

I.2.1.2 Esszenciális Thrombocytemia

Az esszenciális thrombocytaemia (ET) egy olyan Philadelphia negatív MPN, amely főként a megakaryocyta sejtvonalat érinti. A perifériás vérben tartósan emelkedett thrombocytaszám (> 450G/l), a csontvelőben érett megakaryocyták előfordulása jellemzi. Incidenciája hasonló a PV-hez, évente 0,2-2,3 új megbetegedést jelentenek 100000 főre vetítve. A betegek átlagéletkora valamelyest a PV-s betegeké alatt van, 50-60 év körülire tehető, de a betegek két életkori csúcs körül rendeződnek, 30 és 60 év körül; ritkán gyermekekben is előfordulhat a betegség (10). Az ET diagnosztikus kritériumai a *3. táblázatban* láthatóak. A három driver mutáció (*JAK2* V617F, a *CALR* vagy a *MPL*) valamelyike nagy valószínűséggel kimutatható a betegség hátterében. Az esetek 55-60%-ában *JAK2* V617F mutáció; mintegy 30%-ában *CALR* mutáció és megközelítőleg 3%-ában *MPL* mutáció figyelhető meg. A betegek fennmaradó 10-12%-a negatív az előbb sorolt driver mutációkra, gyakran tripla negatív néven is említjük őket (11-13).

Az ET-re a magas thrombocytaszám, és az ehhez kapcsolódóan thrombózisok kialakulásának fokozott rizikója jellemző, akár a vénás akár az artériás oldalon, akár

különleges lokalizációban is (pl.: Budd-Chiari szindróma). Azonban fontos megjegyezni, hogy a magas thrombocytaszám ellenére gyakran vérzékenység is jelen lehet purpurák/petechiák és egyéb bőrvérzések formájában, mivel a thrombopoezis nagyon gyakran defektív e kórképben. Az ET alapvetően indolens betegség, hosszú tünetmentes periódus és hosszú betegségmentes túlélés jellemzi, a betegek életkilátásai jók. A betegek leggyakoribb problémái a thrombotikus szövődményekből adódnak, amelyek előfordulása számos tényezőtől függ, többek között a driver mutációtól, az addicionális szubklonális mutációk jelenlététől, és a beteg korától is (14). Ezen genetikai és klinikai adatok ismeretében a betegek különböző rizikócsoportokba sorolhatóak. A thrombózisrizikó szempontjából rendkívül alacsony-, alacsony-, közepes- és magas rizikójú betegeket különböztetünk meg (14). A többi szövődmény igen ritka, a betegség ritkán progrediálhat myelofibrózisba de a post ET-MF a post PV-MF eseteknél jóval ritkábbak (15). Az akut leukémiába való blasztos transzformáció extrém ritka (14).

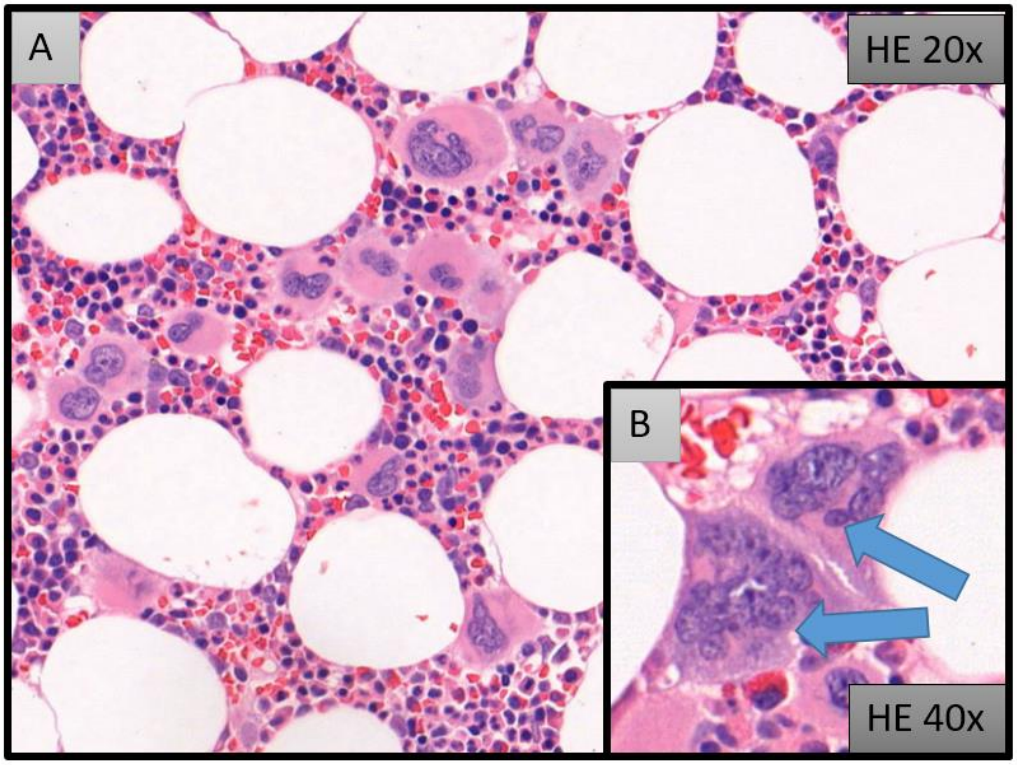
3. táblázat: Az esszenciális thrombocytaemia (ET) diagnosztikus kritériumai.

Az esszenciális thrombocytaemia diagnosztikus kritériumai (WHO 2017)
Major kritériumok
1, a trombocyta szám ≥ 450G/l 2, A csontvelőbiopszia a főként megakaryocyta sejtvonal proliferációját mutatja, emelkedett számban vannak jelen megnagyobbodott, érett, hyperlobulált magvú megakaryocyták. A neutrofil granulopoesis és az eritropoesis sejtjeiben nincs szignifikáns balratoltság. Nagyon ritkán minor (grade 1a) reticulin fibrózis előforduhat. 3, A BCR-ABL1+ CML, PV, PMF vagy egyéb myeloid neopláziák WHO kritériumainak nem felel meg. 4, JAK2V617F-, CALR- vagy MPL mutációk egyikének jelenléte
Minor kritériumok
Klonális marker jelenléte Trombocytózis reaktív okainak kizárása

* A diagnózis felállításához az összes major kritériumnak vagy a első 3 major kritériumnak és a minor kritériumoknak kell teljesülnie.

Mikroszkóposan a perifériás vérben emelkedett thrombocytaszám, összecsapzódott thrombocyta felhők jellemzőek. A csontvelőben a cellularitás nem- vagy csak enyhén emelkedett, és egyedül a megakaryocyta sejtvonalban látható szaporulat (4. ábra). A felszaporodott megakaryocyták jellegzetesen multilobulált, szarvasagancsra

emlékeztető maggal rendelkező sejtalakok. Fibrózis nem jellemző, esetleg nagyon enyhe reticulin- rostszaporulat figyelhető meg.



4. ábra: Az ET csontvelői képe. (A) A csontvelői cellularitás normálishoz közeli, egyedül a megakaryocyták száma emelkedett (egyvonalas hiperplázia, megakaryocytózis). A megakaryocyták laza clustert formálnak, sejtmagjaik hiperlobuláltak. HE 20X (B) nyilakkal jelölve jellegzetes szarvasagancs-szerű magszerkezetű (staghorn) megakaryocyták láthatóak. (Hematoxilin-eozin, 40X)

I.2.1.3 Primer Myelofibrózis

A primer myelofibrózis (PMF) egy jellegzetesen a 6.-7. évtizedben jelentkező Philadelphia negatív MPN. Százezer emberre vetítve 0,5-1,5 új eset kerül felismerésre évente. 40 éves kor előtt ritkán, gyermekkorban praktikusan (egy-egy irodalmi ritkaságot leszámítva) nem fordul elő. A betegség progresszív lefolyású, korai/prefibrotikus fázissal kezdődik, amelyet egy manifeszt fibrotikus stádium követ. Ahogy a betegség progrediál, és a csontvelői fibrózis fokozódik, a vérképzőelemek a csontvelőn kívül is elkezdenek megtelepedni, főként a magzati vérképzésnek megfelelő helyszíneken, ezzel kialakul az extramedulláris haemopoezis (EMH). A halálozás oka leukémiás transzformáció vagy a

citopéniák következtében kialakuló fertőzésekkel szembeni fogékonyság. A betegség rizikóbecslésére prognosztikai pontrendszereket alkalmaznak (IPSS, DIPSS, DIPSS-plus) A diagnosztikus kritériumokat az *4. táblázat* tartalmazza.

A PMF morfológiája attól függ, hogy mely stádiumban tart a betegség (5. ábra). A prefibrotikus stádiumban a csontvelői biopsziában sejtdús csontvelői kép látható kétvonalas (a granulopoetikus és a megakaryocyta sejtvonalat érintő) hiperpláziával az eritrocitózis relatív háttérbe szorulásával. A megakaryocyták változatos méretűek, alakúak, szoros clustereket képezhetnek, és előfordulhat paratrabekuláris lokalizáció. A sejtmagok atípusosak, de nem az ET-nél látott szarvasagancsszerű alakok figyelhetőek meg, hanem atípusosabb, szabálytalanabb, akár éretlenebb formák. A granulopoetikus- és erythropoetikus sejteken szignifikáns diszplázia jelei nem mutatkoznak. A csontvelői fibrózis kialakulása komplex folyamat eredménye: első lépésként a neoplasztikus sejtek által termelt növekedési faktorok (TGF-β, PDGFR, VEGEF) aktiválják a strómasejteket és ezek mellett deprimálódik a CXCL12/CXCR4 tengely, amelynek az őssejtek letelepedésében kiemelt szerepe lenne, hozzájárulva ezzel az őssejtek keringésbe jutásához. A klonális alapbetegség poliklonális rosttermelést idéz elő, amelynek következtében bizonyos fokú fibrózis alakul ki. A fibrózis mértékét egy négyfokozatú skálán definiáljuk (16) (*5. táblázat*). Ahogy halad előre a betegség, a csontvelőből elkezdenek kiszorulni a vérképző alakok, a csontvelői szinuszok megnyílnak, a fibrózis a vérképzőelemeket örvénylő sorokba rendezi. A betegség előrehaladtával a vérképzősejtek száma jelentősen csökken, a csontvelő fibrotikussá, acellulárissá alakul át. A fibrózis előrehaladtával csontvelői aspirátum végzése korlátozott eredményt ad, mert általában nem lehet csontvelői sejteket aspirálni, vagy ha lehet akkor is minimális mennyiségben. Ezt a jelenséget punctio sicca-nak is szokták hívni a klinikumban. A perifériás vérben a korai fázisban túl sok jellegzetesség nem látható, azonban a manifeszt fibrózis idejében nézett vérkenet jellegzetesen leuko-erythroblasztos, a vörösvértestek pedig gyakran deformálódnak, könnycsepp-szerű alakokat vesznek fel (*5. ábra*).

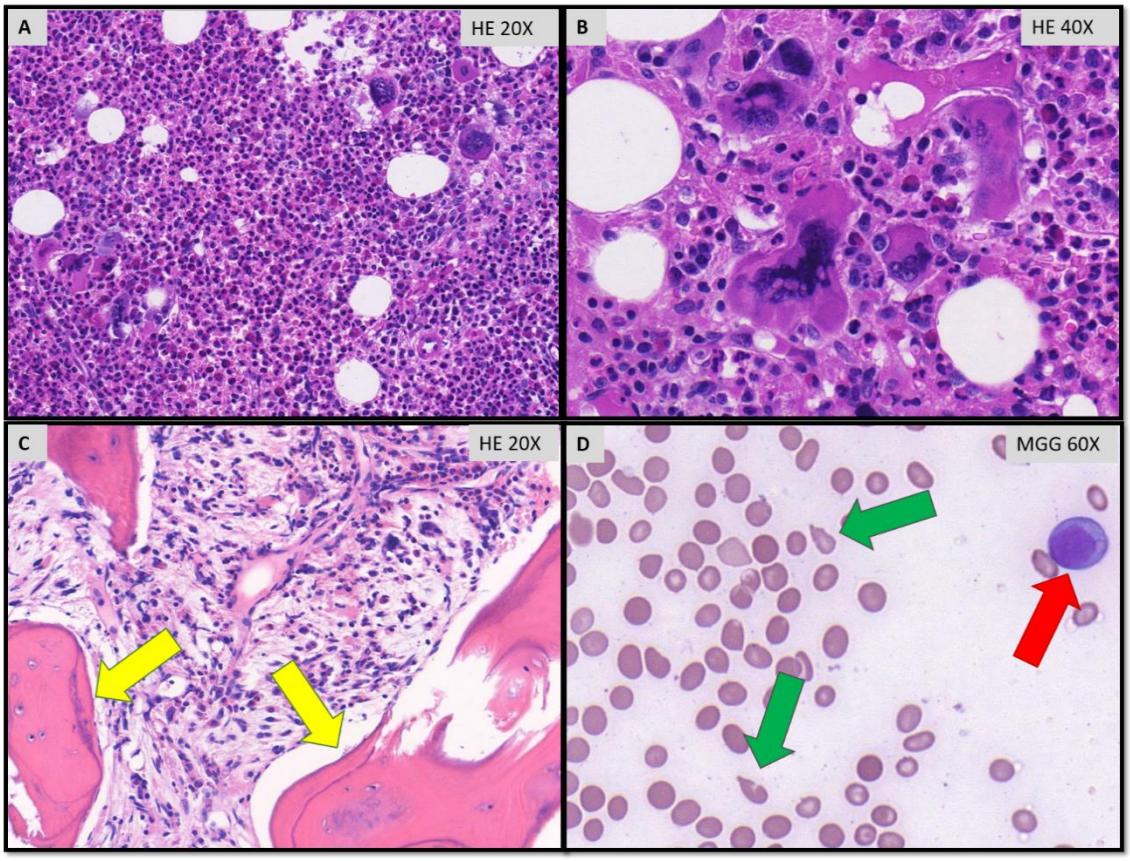
4. táblázat: A primer myelofibrózis diagnosztikus kritériumai.

A primaer myelofibrózis (PMF) diagnosztikus kritériumai
Prefibrotikus/korai primer myelofibrózis
Major kritériumok
1, Atípusos megakaryocyta-proliferáció jelenléte retikulinfibrózis jelenléte nélkül >grade1*, az életkorra korrigált csontvelői cellularitás emelkedésével, granulopoetikus hiperpláziával és gyakran csökkent eritropoezissel 2, A BCR-ABL1+ CML, PV, ET MDS vagy egyéb myeloid neopláziák WHO kritériumainak nem felel meg. 3, JAK2V617F-, CALR- vagy MPL mutációk egyikének jelenléte, ezek hiányában más klonális marker** jelenléte. Klonális marker hiányában csontfibrózis reaktív okainak kizárása.***
Minor kritériumok
a, Anaemia b, Leukocytosis ≥ 11G/l c, Tapintható splenomegalia d, Emelkedett LDH szint
Manifeszt primer myelofibrosis
Major kritériumok
1, Atípusos megakaryocyta-proliferáció jelenléte retikulin- vagy kollagénfibrózis kíséretében (grade2 vagy grade 3)* 2, A BCR-ABL1+ CML, PV, ET MDS vagy egyéb myeloid neopláziák WHO kritériumainak nem felel meg. 3, JAK2V617F-, CALR- vagy MPL mutációk egyikének jelenléte, ezek hiányában más klonális marker** jelenléte. Klonális marker hiányában csontfibrózis reaktív okainak kizárása.***
Minor kritériumok
a, Anaemia b, Leukocytosis ≥ 11G/l c, Tapintható splenomegalia d, Emelkedett LDH szint e, Leukoerythroblastosis

*lásd szemikvantitatív fibrózisbesorolás x táblázat

** A három major diagnosztikus kritérumként szereplő klonális mutációk hiányában a leggyakoribb szubklonális mutációk vizsgálata javasolt (ASXL1, EZH2, TET2, SF3B1) a betegség klonális természetének igazolása

*** Reaktív csontfibrózis kialakulhat infekciókban, autoimmun kórképekben vagy más egyéb gyulladásos állapotok hatására.



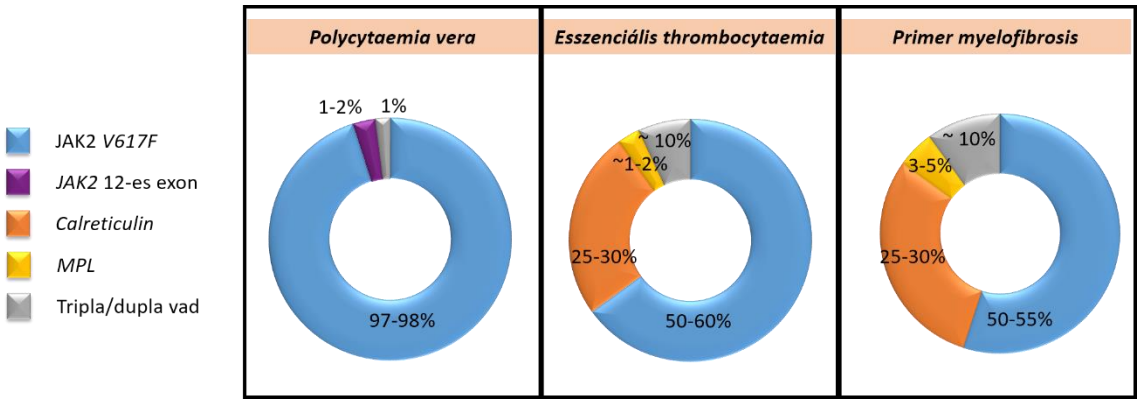
5. ábra: A primer myelofibrózis mikroszkópos morfológiája. **(A)** és **(B)**: A sejtdús prefibrotikus szakasz csontvelői képe látható két különböző nagyítással. Látható a granulopoetikus és megakaryocyta vonalakat érintő kétvonalas hiperplázia, a B ábrán az atípusos megakaryocyták egy csoportja is jobban kivehető**. (C):** Manifeszt fibrotikus szakaszban a csontvelő cellularitása lecsökken, a sejteket a fibrózis örvénylő sorokba rendezi. Sárga nyilakkal az oszteosclerosis, a csontgerendák felszínén látható csontújdonképződés látható. **(D):** Perifériás vérkenet jellegzetes dakryocytákkal (zöld nyilak) és perifériás blaszttal (piros nyíl). (Saját felvételek, Mózes és mtsai. Magyar Onkológia Vol 61, Nr. 1, 36-45, 2017.)

5. táblázat: A fibrózis mértékének megállapítása rostfestéssel.

Fokozat	Jellemző
Grade 0	Foltos, egyenes egymással nem kereszteződő reticulin-rost, normál
Grade 1	Laza reticulin hálózat focalis, főként perivascularis interakcióval
Grade 2	Diffúz, egymással sűrűn kereszteződő reticulinhálózat focalis kollagénszaporulattal és/vagy osteosclerosissal
Grade 3	Diffúz, egymással sűrűn kereszteződő reticulinhálózat jelentős kollagénszaporulattal és/vagy osteosclerosissal

I.3 Philadelphia kromoszóma negatív neopláziák genetikai háttere

A *JAK2*, az *MPL* és a *CALR* gén mutációi az úgynevezett fenotípus-meghatározó driver mutációk a Philadelphia-kromoszóma negatív MPN-ekben, ami azt jelenti, hogy patogenetikai szerepük van az adott entitás létrejöttében (3-6; 8). A három driver mutáció más-más arányban fordul elő PV-ben, ET-ben és PMF-ben (*6. ábra*). Azokat az eseteket, amelyek nem hordozzák ezen gének mutációit, tripla (PV esetén dupla) negatív vagy tripla vad típusú eseteknek hívjuk. Azonban nem kizárt, hogy még egyelőre számunkra ismeretlen driver eltérés állhat ezen esetek hátterében.



6. ábra: A BCR-ABL1 negatív MPN-ek hátterében álló driver mutációk gyakorisága. A PV esetek mintegy 98%-ának hátterében a *JAK2* V617F mutáció vagy a 12-es exon mutációi állnak, az ET és PMF hátterében *JAK2* V617F, a *CALR* és az *MPL* mutációi fordulnak elő driver mutációként. Mindhárom entitás esetében a betegek kis százalékban

nem figyelhető meg driver mutáció, ilyenkor PV esetén dupla vad, ET és PMF esetén tripla vad esetnek hívjuk.

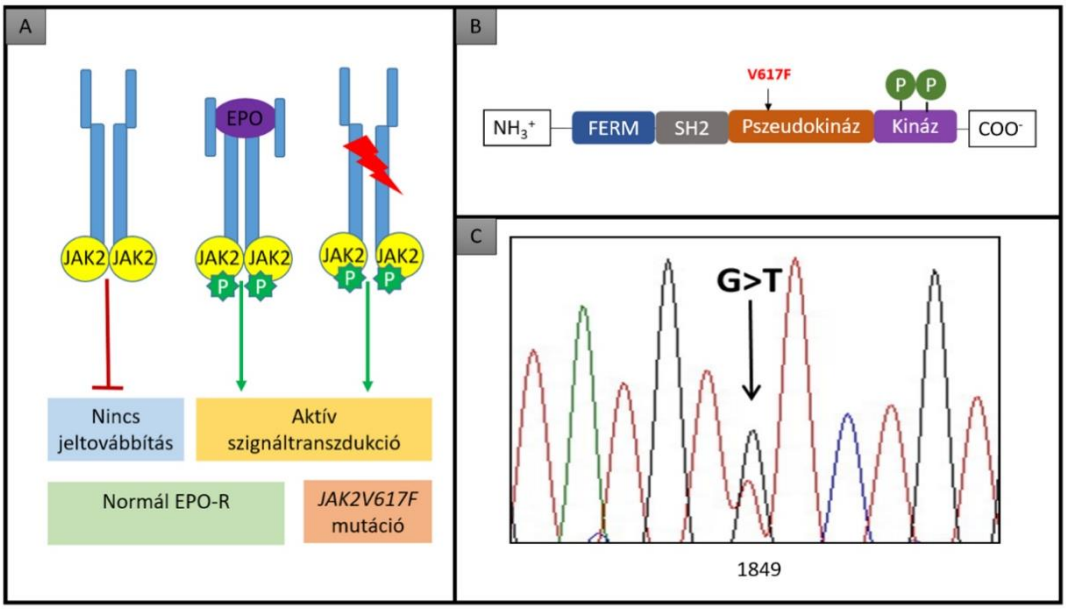
Felmerülhet a kérdés, hogy ugyanazon driver mutációk esetén hogyan alakulhatnak ki különböző betegségek, és az is érdekes kérdés, hogy különböző driver mutációk miképp vezethetnek hasonló ugyanazon kórkép kialakulásához. Mindkét jelenség magyarázható azzal, hogy a három megismert fenotípust meghatározó driver mutáció, azaz a *JAK2* V617F, a *CALR* mutációk és az *MPL* mutációi egy közös úton, a JAK-STAT jelátviteli úton fejtik ki hatásukat (17-19). A legdisztálisabb pont az *MPL*, azaz a thrombopoetin receptor, amely normál esetben ligandkötődés esetén aktiválódik, és a JAK-STAT útvonalon szignáltranszdukciót indít el. MPL mutáció esetén nincs szükség ligandkötődésre a jelút aktiválásához (17). *JAK2* mutáció esetén sincs szükség ligandkötődésre, a mutáció konstitutív aktivációt indít el a JAK-STAT jelpályán. *CALR* mutáció esetén az aktiváció az MPL-en keresztül történik. A mutáns calreticulin fehérje homomultimerként kapcsolódik az MPL extracelluláris doménjéhez, és a megváltozott struktúrájának köszönhetően aktiválja a jelutat (20).

I.3.1 A *JAK2* mutációi

A Janus arcú kináz 2 (JAK2) a Janus kináz család tagja, egy non-receptor tirozinkináz. A JAK2 a kináz család egyetlen tagja, amely az eritropoetin receptorral (EPO-R) kapcsolódva részt vesz a szignál-transzdukcióban, emellett jelet továbbít a trombopoetin-receptorból (MPL), illetve a granulocyta-kolóniastimuláló faktor receptorból (G-CSR) érkező szignálokat is továbbítja (18). A JAK2 fehérje számos doménnel rendelkezik, amelyek közül a JH1-es katalitikus és JH2-es pszeudokináz domén kiemelt jelentőségű. A JH2-es domén autoregulatórikus szereppel rendelkezik, az aktiváló mutációk általában e domént érintik, amelyek következtében a fehérje inhibitoros funkciója kiesik (21; 22). A fehérjét a 9-es kromoszóma rövid karján (9p24) elhelyezkedő *JAK2* gén kódolja, amely összesen 25 exont tartalmaz.

A myeloproliferatív neopláziák egyik legfontosabb driver mutációját, a *JAK2* V617F mutációt 2005-ben írták le (2; 7; 8; 23). A mutáció egy szomatikus pontmutáció a 14-es exonban: a 1849-es pozícióban lévő guanin (G) bázis timinre (T) cserélődik, aminek következtében a 617-es pozícióban valin helyett fenilalanin épül be a fehérjébe. Az

aminosavcsere a JH2-es pszeudokináz domént érinti, ami a tirozin-kináz autoregulációját szabályozza. A mutáció következtében a JH2-es domén gátló/szabályozó funkciója károsodik, ezáltal konstitutív tirozin-kináz-aktivitás és a JAK-STAT jelátviteli út „downstream" elemeinek foszforilációja, aktivitása jön létre (7; 8; 11). A kontrollt vesztett jelút fokozott sejtproliferációt eredményez, entitás-függően egy- vagy több sejtvonalat érintve. A *JAK2* V617F mutáció a PV esetek 98%-ában, a PMF és ET esetek mintegy 55-60%-ában van jelen (2; 24-26). *JAK2* V617F mutációt nem hordozó PV esetek vizsgálata során 2007-ben A *JAK2* gén 12-es exonjában is írtak le különböző



mutációkat, amelyek lehetnek pontmutációk vagy inzerciók és deléciók (27-29). A 12-es exon mutációi a kizárólag PV-ben fordulnak elő, PMF-re és ET-re nem jellemzőek (27).

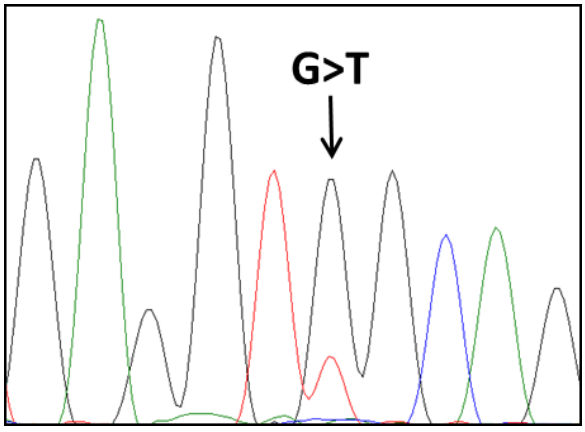
7. ábra: (A) Erythropoetin-receptor (EPO-R) sematikus működése. Vad típusú *JAK2* gén esetén ligand kapcsolódás nélkül nincs jeltovábbítás (balra), ligandkapcsolódás esetén a jelátviteli út aktívvá válik (középen). *JAK2* V617F mutáció esetén ligandkötődés nélkül is aktív jelátvitelt figyelhetünk meg (jobbra). **(B)** a JAK2 fehérje sematikus szerkezeti felépítése. A V617F pontmutáció hatására a pszudokináz domén gátló-funkciója kiesik, aminek köszönhetően kialakul a konstitutív aktiváció. **(C)** A *JAK2* V617F mutáció elektroferogramja. A 14-es exon 1849-es guanin → timin szubsztitúciója következtében a fehérje 617-es valin (V) aminosava fenilalaninra (F) cserélődik. (A felvétel a Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet molekuláris diagnosztikai laboratóriumának archívumából származik).

I.3.2 Az *MPL* mutációi

A trombopoetin-receptort (TPO-r) az 1-es kromoszóma rövid karján (1p34) elhelyezkedő, 12 exonból álló myeloproliferatív leukemia vírus (MPL) onkogén kódolja. A gén által kódolt fehérje a trombopoetin-receptor, egy olyan receptorfehérje, amely számos sejt – leginkább a megakaryocyták – fejlődésében játszik szerepet. A receptort fiziológiásan ligandja, a trombopoetin (TPO) kötődése aktiválja, a jeltovábbítás pedig a JAK-STAT jelátviteli úton történik (30).

Az MPL myeloproliferatív neopláziákban betöltött szerepét két kutatócsoport szinte egy időben közölte 2006-ban (3; 4). Az MPL-t érintő szomatikus mutációk többsége a 10-es exont érinti, ezzel aminosavcserét létrehozva az 505-ös vagy az 515-ös pozícióban. PMF-ben az 515-ös aminosav érintett, ahol az eredeti triptofán lizinre (MPL W515K), leucinre (MPL W515L) *(8. ábra)* vagy ritkábban egyéb aminosavra cserélődik a receptor membrán-közeli doménjében. Az 505-ös pozíció aminosavcseréjét familiáris ET-ben írták le (MPL S505N) (31), az aminosavcsere a receptor transzmembrán részét érinti azonban azóta ET-ben és PMF-ben is igazolódott patogenetikai szerepe (32; 33). A mutációk ritkán a receptor extracelluláris disztális citokin doménjét is érinthetik (33). Bárhol is legyen a mutáció, a mutáns fehérje konstitutívan aktív JAK-STAT jelútvonalat eredményez, ami abnormális szerkezetű megakaryocyták megjelenéséhez vezet, majd később csontvelői fibrózis kialakulását is eredményezheti.

Az MPL mutációi a másik két driver mutációhoz képest ritkák, ET-ben 1%, PMF-ben 3-5% az előfordulása, PV-ben gyakorlatilag nem fordulnak elő (3; 4). Egyéb nem MPN entitásokban előfordulásuk extrém ritka (3).



8. ábra: Az *MPL* W515L mutáció elektroferogramja. (*MPLW515L*) A 10-es exon 1544-es guanin → timin szubsztitúciója következtében a fehérje 515-ös triptofán (W) aminosava leucinra (L) cserélődik. (A felvétel a Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet molekuláris diagnosztikai laboratóriumának archívumából származik).

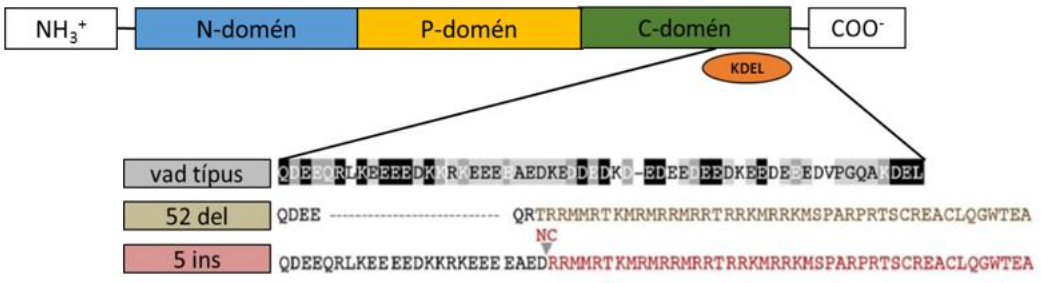
I.3.3 A Calreticulin mutációi

Időben harmadikként, két egymástól független kutatócsoport írta le a Calreticulin (CALR) mutációk patogén szerepét MPN-ekben 2013-ban (5; 6). Ez a felfedezés meglepetésszerű volt, ugyanis a *CALR* gén által kódolt calreticulin szerteágazó szerepe ugyan ismert volt, azonban ismereteink alapján nem volt várható, hogy szerepet játszhat az MPN-ek patogenezisében. A mérföldkő jelentőségű felfedezésig a Calreticulin más funkciók révén volt ismert: egyrészt a Ca^{2+} homeosztázis szabályozásában betöltött, és a lecitin-like chaperonként a glikoportein-foldingban játszott szerepét közölték az irodalomban (34-36). Ezek mellett több egyéb folyamatban is részt vesz: szerepe van az immunválaszban, ioncsatorna-szintézisben, fagocitózisban és az apoptózisban is (35).
A két említett munkacsoport a JAK2 és MPL negatív ET és PMF esetek 70-75%-ában azonosított CALR mutációkat exom szekvenálással (5; 6).A *CALR* mutáció diagnosztikus előnye, hogy szinte csak ET-ben és PMF-ben fordulnak elő (5; 6; 37). Alacsony arányban, PV-ben, és krónikus myelomonociter leukémiában (CMMoL), krónikus neutrofil leukémiában (CNL) (38) és a refrakter anémia ring szideroblasztokkal és trombocitózissal entitásban (RARS-T) is leírták, de más myeloid neopláziában, például myelodiszpláziás

szindrómában (MDS), akut myeloid leukémiában (AML), vagy nem myeloid tumorokban: lymphoid neopláziákban és szolid tumorokban eddig nem írták le előfordulásukat. (6)

A *CALR* gén a 19-es kromoszóma rövid karján (19p13.2) helyezkedik el, több, mint 60-féle mutációját írták le, amelyek mindegyike a 9-es exont érinti. (5; 6; 36; 39) Az 1-es típusú (ún. „type1") mutáció egy 52 bázispárnyi szakasz delécziójával jár (c.1092_1143del), míg a 2-es típusú (ún. „type 2"), 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 mutációk leolvasásikeret-eltolódással járó inzerciók vagy deléciók, általában heterozigóta formában jelennek meg (39).

A normál calreticulin fehérje egy meglehetősen konzervált szerkezetű, 46kDa nagyságú fehérje, amely három fő egységből, és az azok előtt elhelyezkedő 17 aminosavból felépülő szignálból áll. A globuláris N-terminális domén funkciója a lecitin-kötés, a középső prolin-gazdag domén magas affinitású, alacsony kapacitású Ca^{2+} kötőhelyeket, és a C-terminális domén alacsony affinitású, nagy kapacitású Ca^{2+} kötőhelyeket tartalmaz. (36) A vad típusú calreticulin fehérje C terminálisán található egy lyzin-asparaginsav-glutamát-leucin (KDEL) -szekvencia, amely a calreticulint az endoplazmás reticulumban tartja (retenciós szignál). A vad típusú protein C-terminálisa negatívan töltött, a töltésnek szerepe van a retencióban.



9. ábra: Calreticulin fehérje sematikus szerkezete. A C-terminális domén hordozza a funkció szempontjából kiemelten fontos kalciumkötő helyeket, és a fehérjét az endoplazmás reticulumban tartó KDEL retenciós szekvenciát. Az összes mutációtípusra jellemző a KDEL retenciós szekvencia elvesztése. (Guglielmelli, P. et al. Am J Hematol, 2014. 89(5):p. 453-6. alapján)

A CALR mutációk kialakulása során megváltozik az aminosav-szekvencia, de mivel a mutációk mindegyike +1 bázispár olvasási keret-eltolódást okoz, a mutáns protein egy része azonos marad, jellemzően ez a C-terminális 17 aminosav. Ezt a 17 aminosavat minimális konszenzus-szekvenciának hívjuk (36). A mutáns proteinek mindegyikére jellemző, hogy pozitívabban töltöttek, mint a vad calreticulin fehérje, azonban a töltöttség és a szerkezet a mutáns fehérjékben nem egységes (40). A szerkezet és a klinikai hatás alapján a ritka mutációk 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű és egyéb típusú mutációkra oszthatóak (40; 41). A vad calreticulin fehérje három rövid negatívan töltött aminosavból álló szakaszt tartalmaz, amelyeket I.-II. és III. jelzéssel láttak el. Az 1-es típus és 1-es típus-szerű mutációk esetén a II.-és III. szakasz esik ki; a 2-es típus és 2-es típus szerű mutációk esetén az előbb megnevezett szakaszok érintetlenek maradnak; egyéb típusú mutációk esetén csupán a III. szakasz esik ki. Így az 1-es típusú és 1-es típus-szerű mutációval rendelkező CALR fehérjék a legpozitívabban töltöttek, és a 2-es típusúak, és 2-es típus szerűek a legkevésbé pozitívan töltöttek.

A mutáns CALR onkogén szerepe nem kérdéses, azonban a pontos folyamat mai napig nem tisztázott. A JAK2, MPL és CALR mutációk egymást kölcsönösen kizárják, de a mutációk által kiváltott klinikai és biológiai hatások nagyban hasonlítanak. Az ismert, hogy a CALR mutációk daganatkeltő hatásukat a JAK-STAT úton fejtik ki (18; 34; 42) méghozzá MPL-függő módon (20). A calreticulin nem szignáltranszdukciós molekula, az onkogén transzformációhoz szükséges a fehérje C-terminálisának megváltozása: a KDEL-szekvencia és a negatív töltés elvesztése, a protein töltésének pozitívvá válása, amely miatt elveszik a Ca^{2+} kötés, amely intracitoszolikus Ca^{2+} emelkedéshez vezet, amely szintén hozzájárulhat az MPN-ek patogeneziséhez. A mutáns fehérje az MPL N-glikozilált EC-doménjéhez kötődik az endoplazmás retikulumban, majd a mutáns calreticulin chaperonként az MPL-t a sejtfelszínre kíséri. A calreticulin-MPL kötődést tovább erősíti a pozitívan töltött C-terminális, végül aktiválódik a receptor, és JAK szignálút aktiváció következik be. CALR mutáció hatására emelkedik a JAK2, az ERK1/2 és a STAT5 szintje akkor is, ha nem kötődik TPO a receptorhoz (20).

A mindennapokban a *CALR* mutációk meghatározása fluoreszcens fragmenthossz-meghatározással és szekvenálással történik a gyakorlatban, azonban az utóbbi években voltak próbálkozások arra, 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 (43). Később két másik munkacsoport limitált számú eseten és mutációtípuson validálta a CAL2 IHC használhatóságát (44-46), azonban a két leggyakoribb mutáción kívül csak néhány ritka CALR variáns fehérje-szintű vizsgálata történt meg.

I.3.4. A driver mutációk klinikai jelentősége Philadelphia negatív MPN-ben

A Philadelphia negatív MPN-ek esetében számos faktor befolyásolja a betegség fenotípusát illetve kimenetelét. Ilyen befolyásoló tényező lehet maga a driver mutáció típusa, vagy annak alléltömege (47-50), úgynevezett fenotípus-módosító mutációk jelenléte (51-56), vagy akár a mutációk kialakulásának sorrendje (57; 58).

A legjelentősebb befolyással azonban úgy tűnik, hogy a driver mutáció típusa bír, ugyanis más a betegség klinikuma és prognózisa attól függően, hogy a JAK2 V617F mutációt, az MPL mutációt vagy a CALR mutációit tudjuk kimutatni, vagy ha az adott eset tripla negatív.

Amennyiben a túlélést nézzük, PMF esetében a *CALR*-mutációval rendelkező esetek életkilátásai a legkedvezőbbek (17,7 év medián túléléssel), összehasonlítva a *JAK2* és *MPL* mutációkkal, amelyek intermedier prognózisúnak számítanak (9,2 és 9,1 év medián túléléssel). Legkedvezőtlenebb a tripla vad genotípusú csoport túlélése 3,2 év medián túléléssel (5; 6; 59; 60). ET esetében is a *CALR* mutációval rendelkező esetek rendelkeznek a legkedvezőbb túléléssel, ha 1-es típusú *CALR* mutációval rendelkeznek, amely csoportot követi a 2-es típusú *CALR* mutációval rendelkező csoport és a *JAK2* pozitív betegcsoport (6; 13). Érdekes azonban, hogy ET esetében a tripla negatív csoport nem a legrosszabb, hanem a legkedvezőbb túlélésű csoport (13), és a legkedvezőtlenebb életkilátással az *MPL* mutációt hordozó esetek rendelkeznek (13). ET esetében, ha nem a teljes túlélést, hanem a myelofibrotikus transzformáció, vagy a leukémiás progresszió mentes túlélést vizsgáljuk, más eloszlás figyelhető meg. A legmagasabb myelofibrotikus transzformációs rátát *MPL* mutáció esetében írták le (13; 61), és a legkedvezőbb a *CALR* mutáció esetén vagy tripla vad esetben. A leukémia mentes túlélés esetén azonban az *MPL* mutációval rendelkező betegcsoport esetén várható a legkedvezőbb a kimenetel, míg a 2-es típusú *CALR* mutációval rendelkezők esetében a legkedvezőtlenebb a várható kimenetel (13).

A túlélési mutatókon túl morbiditási adatok és bizonyos laboratóriumi- vagy klinikai paraméterek is összefüggést mutatnak a driver mutációkkal mind PMF mind ET esetében. A *CALR* mutáns betegek a *JAK2* mutáns betegekkel összehasonlítva általában fiatalabbak, alacsonyabb a fehérvérsejtszámuk, alacsonyabb a transzformációs ráta mind myelofibrózisba, mind akut leukémiába. Magasabb ugyan a thrombocyta-szám, de paradox módon a thrombózis-rizikó mégis alacsonyabb. A hemoglobin szint alacsonyabb, mint a *JAK2* pozitív vagy *MPL* pozitív eseteké. (6; 37; 62; 63) PMF-ben alacsonyabb a fehérvérsejtszám és magasabb a thrombocytaszám, a *JAK2* mutációval rendelkezőkhöz képest, (6; 37; 54). (*6. táblázat*)

6. táblázat: A CALR mutáció esetén tapasztalható klinikai különbségek egyéb driver mutációkhoz vagy a tripla negatív esetekhez viszonyítva (5; 6; 13; 36; 37; 60; 64-66).

Laboratóriumi paraméter/ klinikai adat	*CALR* mut esetén	Mely driver mutációhoz hasonlítva	Forrás
Esszenciális Thrombocytaemia (ET)			
Haemoglobin-szint	alacsonyabb	*JAK2, MPL*	Nangalia et al, Rotunno et al
Fehérvérsejtszám	alacsonyabb	*JAK2*	Nangalia et al, Broséus et al, Rotunno et al
Trombocyta-szám	magasabb	*JAK2*	Nangalia et al, Rotunno et al
Thrombózis rizikó	alacsonyabb	*JAK2, MPL*	Nangalia et al, Klampfl et al, Broséus et al, Finazzi et al,
Myelofibrózis transzformáció	alacsonyabb	*JAK2*	Rumi et al
Leukémiás transzformáció	alacsonyabb	*JAK2*	Rumi et al
Erythropoetin-szint	magasabb	*JAK2*	Rotunno et al
Életkor	alacsonyabb	*JAK, MPL*	Finazzi et al
Túlélés	jobb	*JAK2*	Klampfl et al
Primar Myelofibrosis (PMF)			
Fehévérsejt-szám	alacsonyabb	*JAK2*	Nangalia et al, Broséus et al, Tefferi e al
Trombocyta-szám	magasabb	*JAK2*	Nangalia et al, Broséus et al, Tefferi et al
Túlélés	jobb	*JAK2*	Nangalia et al, Klampfl et al, Guglielmelli et al
DIPSS+ score független túlélés	jobb	*JAK2, MPL,* tripla vad	Tefferi et al

Az előbbiekben már részben említésre került, hogy számos *CALR* mutáció típus létezik, és a mutációk hatása nem teljesen egyforma. A fentiekben ismertetett kedvező klinikum: a jobb túlélés, az alacsonyabb DIPSS+ „score", a magasabb hemoglobin-szint, alacsonyabb fehérvérsejt-szám és az alacsonyabb keringő blasztarány tekintetében az 1-es típusú (és az 1-es típus-szerű) mutációknál érvényesül. (40; 67) A 2-es típusú (és 2-es típus-szerű) mutációk klinikuma kedvezőtlenebb: gyakoribb *EZH2* mutációval, magasabb keringő blaszt-számmal, gyakoribb splenomegáliával, magasabb fehérvérsejtszámmal. (40; 65) (*7. táblázat*). A *CALR* mutációk típusát vizsgálva, a 2-es típusú (és 2-es típus-szerű) mutációk PMF-ben sokkal ritkábbak, mint ET-ben, gyakorlatilag alig-alig fordul elő. Ezek alapján elmondható, hogy az 1-es típusú (és 1-es típus-szerű) mutációk myelofibrózis-szerű proliferatív fenotípust, míg a 2-es típusú (és 2-es típus szerű) mutációk ET-szerű trombotikus fenotípust hoznak létre. Végül, az életkorban is van eltérés a mutáció típusok között, a 1-es típusú mutációt hordozó betegek fiatalabbak, mint a 2-es típusú mutációval rendelkező betegek. (40)

7. táblázat: *CALR* mutáció típusok befolyása a klinikumra (34; 40; 41; 65; 67).

Laboratóriumi paraméter/ klinikai adat	Type 1	Type2	Forrás
Trombocyta szám	alacsonyabb*	magasabb	Chi et al
Fehérvérsejt szám	alacsonyabb	magasabb	Pietra et al, Rotunno et al
Haemoglobin-koncentráció	magasabb	alacsonyabb	Pietra et al, Tefferi et al
Keringő blaszt-arány	alacsonyabb	magasabb	Pietra et al
Betegek életkora	fiatalabb	nincs különbség JAK2 mutációhoz képest	Chi et al
Subklonális mutációk	gyakoribbak összességében	EZH2- mutáció gyakoribb	Pietra et al, Wojtaszewska et al
Fenotípus	PMF-szerű, proliferatívabb	ET-szerű	Pietra et al
Splenomegália	ritkább	gyakoribb	Pietra et al
Túlélés	jobb	nincs különbség JAK2 mutációhoz képest	Pietra et al, Tefferi et al
Diagnózis	PMF-ben kb 30%-ban	PMF-ben elvétve	Pietra et al

I.3.5 A mutáns alléltömeg jelentősége MPN-ekben

Napjainkban a mutációk minőségi kimutatásán túl azok mennyiségi meghatározása, azaz a mutáns alléltömeg vizsgálata is egyre nagyobb jelentőséggel bír. Ez a jelentőség diagnosztikus, hiszen alacsony alléltömegnél egy nem jól megválasztott vizsgálattal könnyen negatív eredményre juthat a vizsgáló, holott egy érzékenyebb vizsgálattal ki lehet mutatni a mutációt. Az érzékeny kimutatásnak a betegség korai stádiumában is jelentősége van, amikor is típusos klinikum vagy morfológia nélkül akár az MPN diagnózisára utalhat a mutáció korai kimutatása. Ha az MPN már megállapításra került, az alléltömeg meghatározása a betegség rizikóbecslése és követése szempontjából is jelentőséggel bírhat (68; 69).

JAK2 V617F mutáció esetén az alléltömegének részben patogenetikai jelentősége is van, több munkacsoport is összefüggésbe hozta a kialakult betegség fenotípusával (47-49; 70). Magasabb alléltömeg esetén inkább PV, alacsonyabb alléltömeg esetén PMF kialakulása valószínűbb, míg a legalacsonyabb *JAK2* V617F alléltömeg az ET-re jellemző. Ezek mellett prognosztikai jelentőséggel is bír. Ismert, hogy az alléltömeg összefüggést mutat a myelofibrózisos betegek lépnagyságával (71), és a csontvelői fibrózis mértékével (72). ET-ben a trombózisrizikóval függ össze (73) és PMF-ben az 50%-nál magasabb mutáns alléltömeg esetén progresszívebb betegséglefolyás várható (74). Ahhoz, hogy ne csak kvalitatív, hanem mennyiségi adatokhoz is jussunk a mindennapokban, mennyiségi real-time PCR-rel vagy digitális droplet PCR-rel történik a *JAK2* V617F mutáció meghatározása.

Újabban néhány munkacsoport tanulmányozta a CALR variáns allélfrekvencia befolyását a klinikumra, és azt találták, hogy a JAK2 mutációhoz hasonlóan PMF-re magasabb variáns allélfrekvencia (VAF) jellemző, mint ET-re. (75-80), azonban a PMF két stádiumának tekintetében a prefibrotikus és a manifeszt fibrotikus stádium között nem találtak szignifikáns eltérést (81).

A CALR mutációs terhelés összefüggését a betegek klinikai paramétereivel és a betegség lefolyásával mindezidáig alig vizsgálták. Mindössze az ismert, hogy a magasabb alléltömeg mellett alacsonyabb hemoglobin-szint jellemző, azonban a gén- és/vagy fehérje szinten meghatározott CALR mutáns alléltömeg hatása az ET-ben és MF-ben szenvedő betegek várható kórlefolyására még nem ismert (78).

II. 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.

III. Módszerek

III.1 Molekuláris genetikai módszerek

III.1.1 Beteganyag

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz 652 Philadelphia negatív myeloproliferatív neoplazmával 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 (82). A tanulmány a Helsinki 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.

8. táblázat: A tanulmányba bevont betegek alap paraméterei

Diagnózis	esetszám	esetszám férfi/nő	életkor (év) átlag (range)	követési idő (hó) átlag (range)
ET	n=425	131 294	59 (4-97)	62 (13-444)
PMF	n=227	112 115	67 (23-93)	42 (12-276)

A diagnóziskor feljegyzett laborparamétereket retrospektív módon gyűjtöttük be. A követés során gyűjtöttük össze a szükséges klinikai adatokat, beleértve a leukémiás vagy fibrotikus transzformációt, a major trombotikus eseményeket (83), esetleges citoreduktív terápia használatát, illetve a halálozást.

III.1.2 DNS izolálás

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.

III.1.3 A *JAK2* V617F mutáció kimutatása valósidejű PCR-rel

A JAK2 V617F mutáció kimutatásához Larsen és munkatársai által leírtak alapján összeállított (84) 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. Az általunk használt primerek adatai a 9. táblázatban láthatóak.

9. táblázat. JAK2 valósidejű PCR-hez felhasznált primerek adatai

Lokalizáció	típus	Primer szekvencia
14. exon	reverz-vad	5'-GTA GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA TAC-3'
	reverz V617F	5'-GTA GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA TAA-3'
	forward	5' CTT TCT TTF AAG CAG CAA GTA TGA-3'
	TaqMan	6-FAM-TGA GCA AGC TTT ACA AGC ATT TGG TTT-TAMRA

A PCR mixet 96-lyukú plate-re osztottuk szét, egy-egy well-be 23 µl mix és 2 µl DNS-templát került. A reakció 50 cikluson keresztül zajlott Quantstudio3 PCR készüléken (Life Technologies). A PCR mix összetétele a 10. és 11. táblázatokban látható.

10. táblázat. A PCR mix összetétele – vad típus

Komponens	Bemérés
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5µl
Forward primer (3µl)	2,5µl
Reverz- vad típus primer (3µl)	2,5µl
TaqMan próba (5µl)	1µl
Steril víz	4,5µl
DNS templát	2µl

11. táblázat. A PCR mix összetétele V617F mutáns

Komponens	Bemérés
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5µl
Forward primer (3µl)	2,5µl
Reverz- mutáns primer (3µl)	2,5µl
TaqMan próba (5µl)	1µl
Steril víz	4,5µl
DNS templát	2µl

A PCR reakciót követően a variáns allélfrekvenciát a következő képlet segítségével számoltuk ki, ahol a vad, illetve a vad és a mutáns típusú allél összegének hányadosát határoztuk meg:

$$VAF = \frac{\Delta CT_{V617F}}{\Delta CT_{WT} + \Delta CT_{V617F}} * 100$$

III.1.4 *CALR* mutációk analízise

III.1.4.1 *CALR* polimeráz láncreakció (PCR)

A *CALR* gén 9-es exonját amplifikáltuk AmpliTaqGold™ (Life Technologies) DNS-polimeráz enzimmel 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 vizsgálandó mintákat jelöletlen forward (5'-AGTTTGGCAACGAGACGTG-3', Tm=59,9 ºC) és reverz (5'-GAGTCTCACAGAGACATTATTTGG-3', Tm=57,1 ºC) primerekkel amplifikáltuk *(12. táblázat).*

12. táblázat. A felhasznált primerek adatai

Lokalizáció	Primer szekvencia	Olvadáspont (˚C)
CALR	5'-AGTTTGGCAACGAGACGTG-3'	59,9 (˚C)
	5'-GAGTCTCACAGAGACATTATTTGG-3'	57,1 (˚C)

A PCR mix végtérfogata 25 µl, a templát DNS mennyisége csövenként 100 ng volt. Az AmpliTaqGold™ összetétele: 10x PCR puffer, 10 mM dNTP mix, 25 mM $MgCl_2$, AmpliTaqGold™ DNA Polymerase (5 U/µl). A reakció 35 cikluson keresztül zajlott a PE 2720 Gene Amp (Perkin-Elmer, USA) PCR-készülékben. A PCR mix összetétele a *13. táblázatban* látható, a reakció hőprofilja a *14. táblázatban* látható:

13. táblázat: A PCR mix összetétele

Komponens	Bemérés
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5µl
Forward primer (3µl)	2,5µl
Reverz primer (3µl)	2,5µl
TaqMan próba (5µl)	1µl
Steril víz	4,5µl
DNS templát	2µl

14. táblázat: A PCR reakció hőprofilja

Lépés	hőmérséklet/	Idő	
Kezdeti denaturáció	95˚C	5min	
Denaturáció	95˚C	30s	35 ciklus
Anelláció	58˚C	30s	
Extenzió	72˚C	30s	
Végső extenzió	72˚C	5min	

Az amplifikációt követően a PCR-termék jelenlétét agaróz gélelektroforézissel detektáltuk 2 v%-os agaróz gélben (2,6 g agaróz, 125 ml 1x TAE puffer), GelRed™ (Biotium) fluoreszcens jelöléssel. 1x TAE puffert használtunk futtató pufferként (a 10x TAE törzsoldat összetétele: 0,4 M TRIS, 0,2 M ecetsav, 0,01 M EDTA). A direkt szekvenálásra szánt mintákat a gélelektroforézist követően tisztítottuk: a termék mellett szennyezőként jelenlévő, fel nem használt dezoxinukleotid-trifoszfátokat (dNTP) és

primereket ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Affymetrix) segítségével távolítottuk el a gyártó utasításai szerint. A fragmensanalízisre szánt mintákon nem végeztünk tisztítást.

III.1.4.2 *CALR* fragmensanalízis

A fragmensanalízist ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) segítségével végeztük 96 lyukú plate-en. 1-1 well összetétele a következő volt: 8,8 µl Hi-Di™ Formamide (Life Technologies), 0,2 µl GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Life Technologies) és 1 µl PCR-termék. A denaturálást 3 percen át végeztük 95 °C-on. A kapilláris elektroforézis során a DNS-fragmensek méret szerint válnak el egymástól és fluoreszcenciájuk alapján azonosíthatók. Az elektroferogramok kiértékelését GeneMapper™ v5 software (Life Technologies) alkalmazásával végeztük.

III.1.4.3 CALR szekvenciaanalízis

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. A reakcióelegy összetétele a *15. táblázatban* látható, a reakció hőprofilja a *16. táblázatban* látható.

15. táblázat: A szekvenáló reakció összetétele

Bemérés	**Bemérés**
BigDye™ Terminator v3.1	0,25µl
BigDye™ 5X Sequencing buffer	1,875µl
Primer (10µM)	0,5µl
Steril víz	10µl-ig
Tisztított PCR termék	1µl

16. táblázat: A szekvenáló reakció hőprofilja

Lépés	**hőmérséklet/**	**Idő**	
Kezdeti denaturáció	95˚C	2min	
Denaturáció	95˚C	30s	25 ciklus
Anelláció	51˚C	15s	
Extenzió	60˚C	4min	

A szekvenálást követően a terméket Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio) géloszlopon tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. A tisztított termékhez 10 µl steril vizet adtunk, majd 20 µl Hi-Di Formamide^{TM}-dal egészítettük ki az elegyet 40 µl végtérfogatra. A denaturálást 95 °C-on végeztük 3 percen keresztül. A szekvencia-analízist ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) segítségével, a kapott szekvenciák kiértékelését Sequencing Analysis SeqA6 (Life Technologies) programmal végeztük.

A *CALR* variáns allélfrekvenciát az alábbi módon határoztuk meg:

$$CALR\ VAF = \frac{Fragmensmagasság\ CALR\ mut}{Fragmensmagasság\ CALR\ vad + Fragmensmagasság\ CALR\ mut} * 100$$

III.1.5 *MPL* szekvenciaanalízis

Az *MPL* gén 10-es exonjának szekvenciaanalízise 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'.

III.2 Immunhisztokémia

III.2.1 Beteganyag

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a mintákat a disszertáció IV.1.1 részében részletezett 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. Az immunhisztokémiai analízissel vizsgált minták betegadatainak összefoglalása a *17. táblázatban* látható.

17. táblázat: Az immunhisztokémiai analízisbe bevont betegek adatai

Diagnózis	esetszám	esetszám CALR+/kontroll	életkor (év) átlag (range)
ET	n=69	55 14	58,85 (4-84)
PMF	n=48	36 12	65,13 (31-90)

III.2.2 CAL2 immunhisztokémia

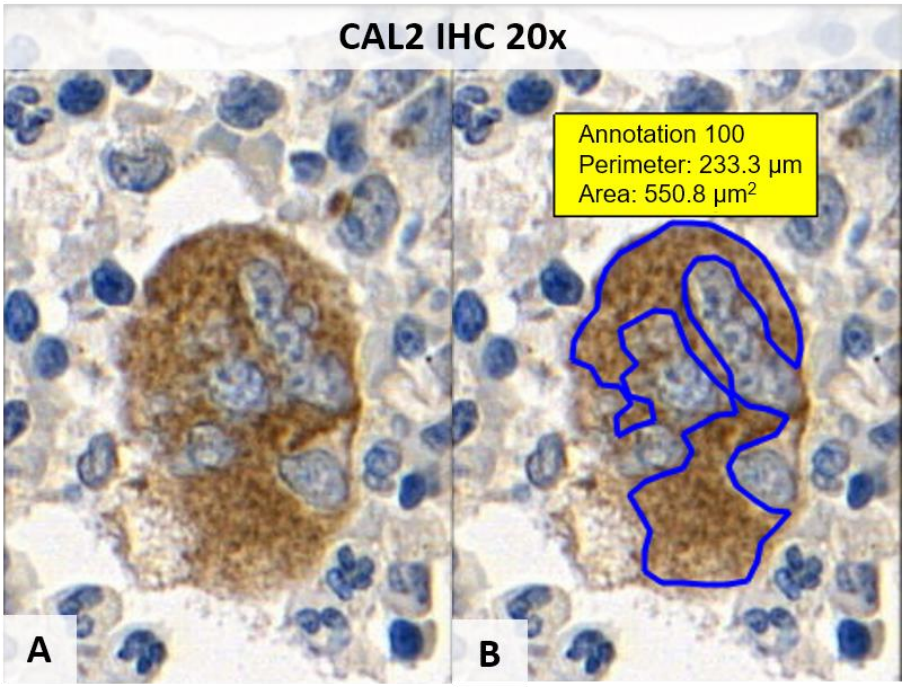
A dekalcinált, formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkokból 4 μm vastag metszeteket készítettünk xylánnal borított tárgylemezekre. A deparaffinálás xylol segítségével történt, majd leszálló alkoholsorral rehidráltuk, végül desztillált vízzel öblítettük a metszeteket. Az endogén peroxidáz aktivitás gátlásának céljából 1,5%-os H_2O_2 metanolos 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 hematoxilin 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.

III.3 Digitális képanalízis

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

III.3.1 A metszetek értékelése

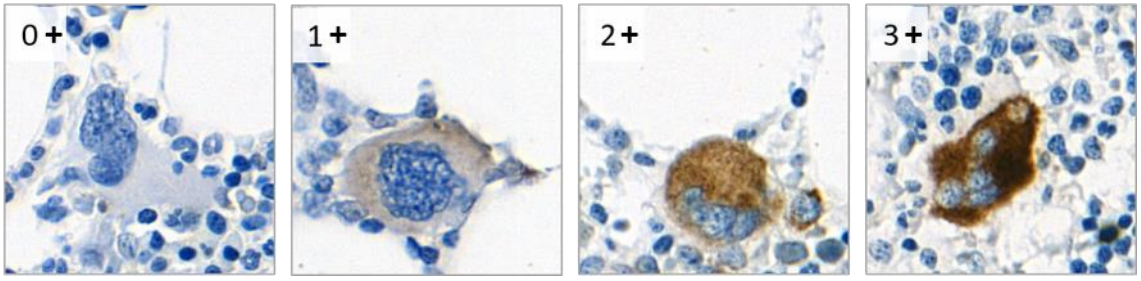
A metszeteken számos paraméter meghatározásra került. A CAL2 antitest specifikusan a megakaryocyták citoplazmáját jelöli, ezért minden metszeten 100 random megakaryocyta citoplazmát annotáltunk (*10. ábra*).



10. ábra: Intenzív CAL2 jelölődést mutató megakaryocyta, és körülötte CAL2 negatív vérképző sejtek láthatóak. (A) Megakaryocyta a kijelölés előtt, (B) annotált megakaryocyta. A megakaryocyta citoplazmáját manuálisan jelöltük ki caseviewer szoftver (3DHISTECH) alkalmazása segítségével. Látható, hogy a lobulált sejtmag nem képezi a kijelölés és a későbbi kiértékelés tárgyát. (saját felvétel)

Az annotált megakaryocyták intenzitását negatívtól 3+ pozitivitásig adtuk meg. Negatívnak az immunreakciót nem mutató sejteket, 3+ pozitívnak az erős, intenzív IHC reakciót mutató sejteket tekintettük. A köztes 1+ és 2+ pozitivitás 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 nonmegakaryocyta sejtek arányát is rögzítettük minden esetnél. A metszeteket két független patológus nézte át (Dr. Kajtár Béla és Dr. Mózes Réka)



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

III.3.1.1 Manuális H score (H_{man} score)

Az összesen esetenként 100 kijelölt megakaryocyta citoplazmáját értékeltük 4 fokozatú skálán (0-3+-ig) (*11. ábra*). A manuális H-score-hoz n=100 sejtekhez tartozó értékeket összeadtuk, így egy 0-300 közötti értéket kaptunk.

III.3.1.2 Automatikus H score (H_{auto} score)

Az annotált megakaryocyták citoplazmájának CAL2 intenzitását a 3DHISTECH DensitoQuant moduljával is értékeltük. A számítás a manuális H-score-hoz hasonló, azonban a számítás nem sejt, hanem pixel alapú, az esetenként 100 megakaryocyta citoplazmájának kijelölt régióiban lévő összes pixel került értékelésre. Az H_{auto} score-t a következőképpen határoztuk meg: (a gyenge pozitivitást mutató pixelek aránya) + 2x (a közepes intenzitású pixelek aránya) + 3x (az erős intenzitású pixelek aránya). Az eredmény szintén egy 0-300 terjedő skálán lévő érték.

III.4 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.

Specificitás és szenzitivitás számításához, illetve a negatív prediktív érték (NPÉ) és pozitív prediktív érték (PPÉ) meghatározásához az alábbi képleteket használtuk:

Specificitás: $$\frac{Valódi\ pozitív\ esetek}{valódi\ pozitív\ esetek + fals\ negatív\ esetek} X100$$

Szenzitivitás: $$\frac{Valódi\ negatív\ esetek}{valódi\ negatív\ esetek + fals\ pozitív\ esetek} X100$$

NPÉ: $$\frac{Valódi\ negatív\ esetek}{valódi\ negatív\ esetek + fals\ negatív\ esetek} X100$$

PPÉ: $$\frac{Valódi\ pozitív\ esetek}{valódi\ pozitív\ esetek + fals\ pozitív\ esetek} X100$$

IV. Eredmények

IV.1 A driver mutációk megoszlása a vizsgált betegcsoportban

Az ET esetek hátterében 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 hátterében 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 (*18. táblázat*).

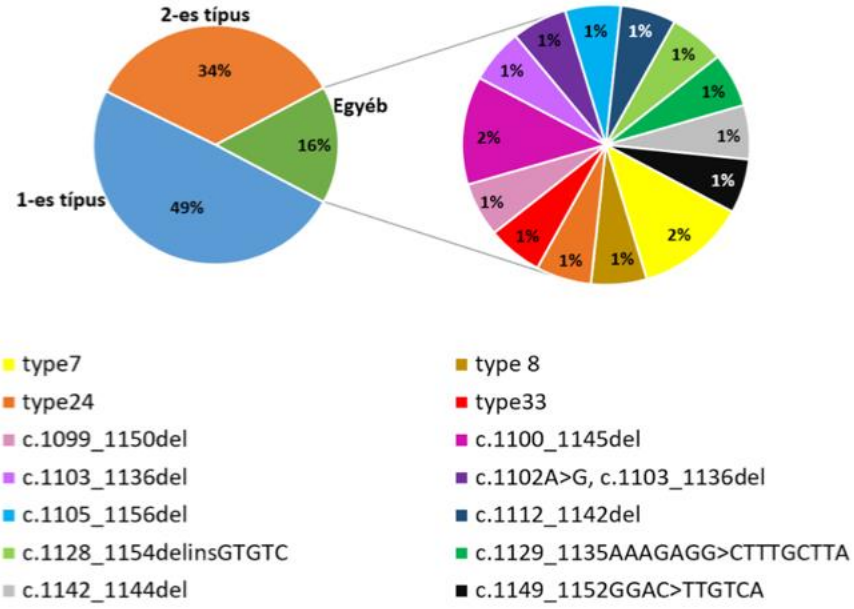
18. táblázat: A *JAK2, CALR* és *MPL* driver mutációk eloszlása a vizsgált mintában

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

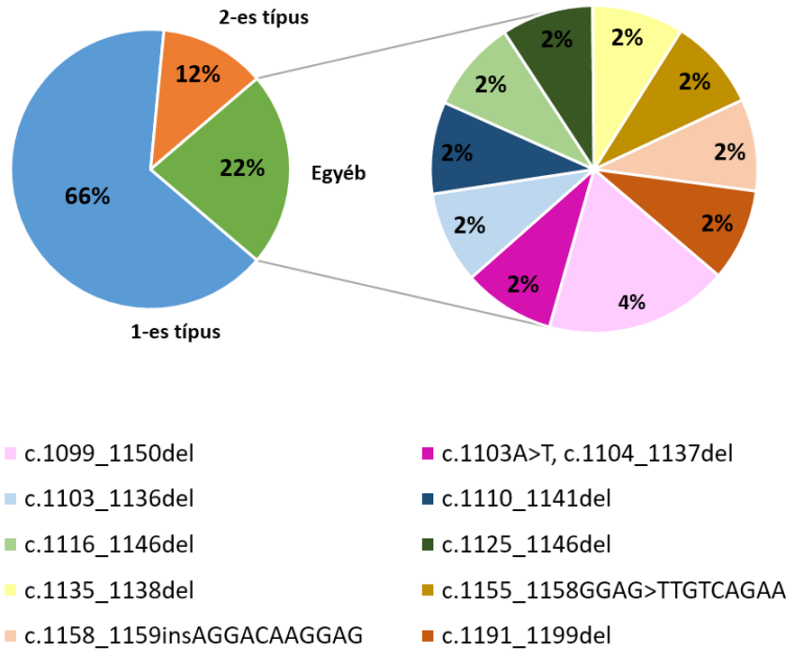
IV.1.1 A *CALR* mutációk megoszlása a betegcsoportban

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 (c1142_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). A betegcsoportban azonosított *CALR* mutációk részletei a *19. táblázatban* láthatóak.

ET-ben és PMF-ben a mutációk eloszlása eltérőnek bizonyult. Az 1-es és 2-es típusú *CALR* mutációk aránya PMF-ben szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint ET-ben (PMF: 66/12% vs. ET: 49/34%; p =0,007). Az 1-es típus-szerű és 2-es típus-szerű mutációk aránya - a 1-es típus/2-es típus arányhoz hasonlóan - PMF-ben szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint ET-ben: (ET 60% / 37% vs. PMF: 75% / 18%; p =0,02). A mutációk megoszlását ET-ben a 12-es, PMF esetén a 13-as ábra szemlélteti.



12. ábra: a *CALR* mutációk megoszlása ET-ben (n=105). ET-ben a leggyakoribb *CALR* mutáció 49%-kal az 1-es típusú mutáció volt, amelyet a 2-es típusú mutáció követett 34%-kal. ET-ben 17% volt a ritka mutációk aránya, amely összesen 15 féle, n=17 ritka *CALR* mutációból adódott össze.



13. ábra: a *CALR* mutációk megoszlása PMF-ben (n=51). PMF-ben a leggyakoribb *CALR* mutáció az 1-es típusú mutáció 66%-kal, a második leggyakoribb a 2-es típusú mutáció 12%-kal. A ritka mutációk teszik ki a fennmaradó 22%-ot, összesen 10 féle, n=11 ritka mutációval.

19. táblázat: A betegcsoportban azonosított CALR mutációk. Összesen 24 különböző CALR mutációt azonosítottunk n=156 betegből

Nukleotid változás	Típus	Aminosav változás	Fehérje	Kategória	Mely MPN
c.1092_1143del	**1-es típus**	**L367fs*46**	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1099_1150del	új	L367fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1100_1145del	COSM2270995	L367fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1102_1153del	7-es típus	K368fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1103_1136del	COSM3355755	K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET, PMF
c.1102A>G, C1103_1136del	új	K368E+K368fs*51	AAEKQMKDKQDEEQRLGRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1103A>T, c1104_1137del	új	K368M+ E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLMRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	PMF
c.1105_1156del	új	E369fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLKRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1104_1137del	8-as típus	E369fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	1-es típus-szerű	ET
c.1110_1141del	új	E371sf*6	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEGRGQGG-	egyéb	PMF
c.1112_1142del	COSM5703407	E371fs*49	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEGQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	ET
c.1116_1146del	COSM3733222	D373fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEERTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	PMF
c.1120_1138del	24-es típus	K374fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	ET
c.1128_1154delinsGTGTC	új	K375fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	ET
c.1125_1146del	COSM3734993	K375fs*48	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	PMF
c.1129_1135AAAGAGG>CTTT	új	K377fs*54	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRLCLRRRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	ET
c.1135_1138del	új	E379fs*50	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKERRQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	egyéb	PMF
c.1149_1152GGACTTGTCA	új	E383fs*45	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEADCQRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	2-es típus-szerű	ET
c.1154_1155insTTGTC	**2-es típus**	**K385fs*47**	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDNCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	2-es típus-szerű	ET, PMF
c.1155_1158GGAG>TTGTCAC	új	K385fs*47	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDNCQKRRRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	2-es típus-szerű	PMF
c.1154_1155insATGTC	33-as típus	E385fs*46	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDKCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	2-es típus-szerű	ET
c.1185_1159insAGGACAAGG	új	D387fs*44	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDKERTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA-	2-es típus-szerű	PMF
c.1142_1144del	új	E381del	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDKEDDEDKDEDEEDEEDKEEDEEEDVPGQAKDEL-	in-frame	ET
c.1191_1199del	COSM5715390	E398_D400del	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDKEDDEDKDEDEEDKEEDEEEDVPGQAKDEL-	in-frame	PMF
Referencia szekvencia			AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEAEDKEDDEDKDEDEEDEEDKEEDEEEDVPGQAKDEL-		
Negatívan töltött szakaszok			I II III		

IV.2 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése

ET és PMF esetében is megvizsgáltuk a *JAK2* és *CALR* mutációs státusz hatását a klinikai paramétekre. Az alacsony mutációs gyakoriság miatt az *MPL* mutációk hatását a klinikumra nem vizsgáltuk.

IV.2.1 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése ET-ben

ET-ben az életkor tekintetében a tripla negatív csoport (medián életkor 52 év, tartomány: 7 - 83) szignifikánsan fiatalabbnak bizonyult mind a *JAK2* mutáns (medián életkor: 62 év, tartomány 18-97 év, (p =0,002), mind a *CALR* mutációt hordozó betegcsoporthoz (medián életkor: 58; tartomány: 4 - 89 év, p =0,09) képest. A *JAK2* pozitív és *CALR* pozitív csoportok között ET-ben szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.
A *JAK2* V617F mutációval rendelkező csoport fehérvérsejtszáma (mediánérték: 10,5 G/l, tartomány: 2,9 - 26,9 G/L) szignifikánsan (p <0,001) magasabbnak bizonyult a *CALR* mutációval rendelkezőkhöz (mediánérték: 8,5 G/L, tartomány: 3,8 – 28 G/L) és a tripla negatív csoporthoz (mediánérték: 8,4 G/L, tartomány 4,3 - 135,1 G/L); p <0,001) képest. A CALR mutáns csoport és a tripla negatív csoport között a fehérvérsejtszám tekintetében nem volt szignifikáns különbség.
A *CALR* mutáns csoport thrombocyta száma (951 G/L, tartomány: 524 - 2605 G/L) szignifikánsan (p <0,001) magasabb volt, mint a *JAK2* pozitív (755 G/L, tartomány: 124 - 2350 G/L) vagy a tripla negatív csoporté (571 G/L, tartomány: 57 - 1820 G/L; p <0,001). A tripla negatív csoport és a JAK2 pozitív csoport thrombocytaszáma közötti különbség szintén szignifikánsnak (p <0,001) bizonyult.
A tripla negatív csoport szérum LDH szintje (376 NE/L, tartomány: 150 - 620 NE/L) szignifikánsan (p =0,01) alacsonyabb volt, mint a *CALR*+ csoport LDH szintje (439,5 NE/L, tartomány: 137 - 999 NE/L), a *JAK2* V617F mutációval rendelkezőké a kettő között helyezkedett el (397 NE/L, tartomány: 126 - 1380 NE/L). A *JAK2* V617F mutáns csoportban szignifikánsan (p =0,04) gyakrabban fordult elő (25%) splenomegália, mint a tripla negatív csoportban (11%), azonban a *CALR* mutáns csoportban tapasztalt gyakoriság (21%) nem különbözött szignifikánsan egyik csoporttól sem.

A myelofibrotikus transzformációs ráta a *CALR* mutáns csoportban volt a leggyakoribb (12%), amely szignifikánsan (p =0,04) magasabb volt a tripla negatív csoporthoz képest (2%). A *JAK2* V617F mutáns csoportban 7% volt a MF transzformációs ráta, amely szignifikánsan nem tért el egyik csoporttól sem.

Citoreduktív terápiára legnagyobb arányban a *JAK2* V617F mutáns csoport tagjai szorultak (86%), azonban a *CALR* mutáns csoport tagjainál is magas arányban alkalmazták ezt a modalitást (78%), a citoreduktív terápiát kapó betegek aránya nem különbözik szignifikánsan a két előbbi csoportban. Azonban a tripla negatív csoportban 47%-ban volt szükség sejtszám-csökkentő terápiára, ami p <0,001 szignifikancia szinttel szignifikánsan alacsonyabb arány a két előbbi csoporthoz képest.

A diagnózist megelőző thrombotikus események hasonló gyakorisággal fordultak elő a *JAK2* V617F csoportban (21%) és a tripla negatív csoportban (23%), míg a *CALR* mutáns csoportban szignifikánsan (p =0,04) ritkábban fordultak elő (11%). A követés ideje alatti thrombotikus eseményráta, az AML transzformációs ráta és a hemoglobin koncentráció tekintetében nem volt szignifikáns különbség a különböző mutációs státuszú csoportok között. Az fenti összefüggések a *20. táblázatban* találhatóak összefoglalva.

20. táblázat: Főbb klinikai és laboratóriumi paraméterek ET-ben.

Driver mutációs státusz	**(A)** ***JAK2*** **V617F +** **n=237**	**(B)** ***CALR*** **n=104**	**(C)** ***MPL*** **n=7**	**(D)** **Tripla-negativ** **n=76**	**Összehasonlítások (*P*-érték)**		
					(A) vs. (B)	**(A) vs. (D)**	**(B) vs. (D)**
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	62 (18-97)	58 (4-89)	76 (43-81)	52 (7-83)	0.15	**0.002**	*0.09*
Hemoglobin, g/l, median (tartomány)	137 (58-192)	130 (61-175)	131 (99-149)	133 (75-180)	0.15	0.15	0.75
Fehérvérsejt szám, x10^9/L, median (tartomány)	10.5 (2.9-26.9)	8.5 (3.8-25.0)	10.8 (6.3-11.7)	8.4 (4.3-135.1)	**<0.001**	**<0.001**	0.84
TCT szám, x10^9/L, median (tartomány)	755 (124-2350)	951 (524-2605)	918 (686-1295)	571 (57-1820)	**<0.001**	**<0.001**	**<0.001**
Szérum LDH, NE/L, median (tartomány)	397 (126-1380)	439.5 (137-999)	523 (216-1236)	376 (150-620)	0.12	0.11	**0.01**
Thrombotikus események - diagnózis előtt (esetszám, %)	35/165 (21%)	7/66 (11%)	0/4 (0%)	12/52 (23%)	**0.04**	0.85	*0.08*
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	44/174 (25%)	16/83 (19%)	2/5 (40%)	16/59 (27%)	0.34	0.86	0.31
Splenomegália (esetszám, %)	39/159 (25%)	14/66 (21%)	3/7 (43%)	6/55 (11%)	0.73	**0.04**	0.15
AML-transformáció (esetszám, %)	3/176 (2%)	3/77 (4%)	0/5 (0%)	0/58 (0%)	0.37	0.58	0.26
MF-transformáció (esetszám, %)	13/176 (7%)	9/78 (12%)	0/5 (0%)	1/58 (2%)	0.33	0.20	**0.04**
Cytoreduktív therápia (esetszám, %)	150/176 (85%)	64/82 (78%)	3/7 (43%)	27/58 (47%)	0.16	**<0.001**	**<0.001**

IV.2.2 A mutációs státusz és a klinikum összefüggése PMF-ben

A PMF esetében is megvizsgáltuk a legfontosabb klinikai- és laborparaméterek összefüggéseit a *JAK2* és *CALR* gének mutációs státuszával, amely eredmények összefoglalása a *21. táblázatban* látható.

A legmagasabb hemoglobin koncentráció a *JAK2* V617F mutáns csoportot jellemezte (mediánérték: 120 g/l, tartomány: 4,2 - 197 g/l), amely szignifikánsan (p =0,05) magasabbnak bizonyult a *CALR* mutáns populáció hemoglobin koncentrációjánál (mediánérték:113 g/l, tartomány: 21 - 154 g/l), mind a tripla negatív esetek (mediánérték: 94 g/l, tartomány: 66 - 142 g/l) haemoglobin-szintjénél (p =0,005). A *CALR* pozitív és tripla negatív csoportok között nem volt szignifikáns különbség hemoglobin koncentráció tekintetében.

A *CALR* mutáns csoportnál diagnóziskor szignifikánsan (p=0,006) magasabb TCT-szám jellemző (mediánérték: 645 G/L, tartomány: 97 - 1998 G/L), mint a tripla negatív csoportnál (mediánérték: 150 G/L, tartomány 5 - 1021 G/L). A tripla negatív csoport TCT-száma a *JAK2* V617F mutáns csoporténál is (495,5 G/L tartomány: 27 - 1776 G/L) szignifikánsan (p=0,03) alacsonyabb.

A *JAK2* mutáns esetek 80%-ánál alakult ki splenomegalia, ami szignifikánsan magasabb arány, mint amit a *CALR* mutáns (58%, p = 0,02) vagy tripla negatív (47%, p = 0,007) csoportban figyeltünk meg.

A tripla negatív csoportban a betegek 32%-ának volt szüksége transzfúzióra, amely szignifikánsan (p = 0,04) magasabb arány, mint a *CALR* mutáns (6%) csoportban tapasztalható, a *JAK2* mutáns csoporténál pedig tendenciózusan magasabb (p = 0,19) (16%) arány.

Citoreduktív terápiára legnagyobb arányban (83%) a *JAK2* mutáns populáció tagjai szorultak, amely a *CALR* mutáns esetekhez képest (65%) és a tripla negatív esetekhez képest (50%) is szignifikánsan (p = 0,05 és p = 0,003) magasabb arány.

Nem találtunk szignifikáns különbséget az életkor, a fehérvérsejtszám, a szérum LDH szint, a thrombotikus események gyakorisága vagy az AML transzformációs ráta tekintetében a különböző mutációs státuszú csoportok között (21. táblázat).

21. táblázat: Főbb klinikai és laboratóriumi paraméterek PMF-ben

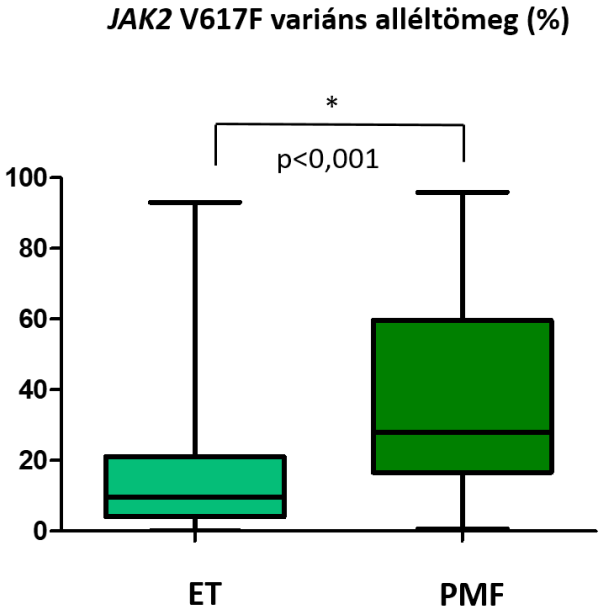
Driver mutációs státusz	(A) *JAK2* V617F + n=133	(B) *CALR* n=49	(C) *MPL* n=16	(D) Tripla-negatív n=27	Összehasonlítások (*P* -érték) (A) vs. (B)	(A) vs. (D)	(B) vs. (D)
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	67 (23-87)	64 (29-81)	73 (47-86)	66 (33-84)	0.15	0.82	0.40
Hemoglobin, g/dl, median (tartomány)	12.2 (4.2-19.7)	11.3 (2.1-15.4)	10.2 (7.7-11.7)	9.4 (6.6-14.2)	**0.05**	**0.005**	0.17
Fehérvérsejt szám, x10^9/L, median (tartomány)	13.0 (0.5-86.0)	10.4 (2.8-20.0)	14.8 (4.2-47.0)	11.7 (2.2-71.8)	*0.09*	0.55	0.45
TCT szám, x10^9/L, median (tartomány)	495.5 (27-1776)	645 (97-1998)	430 (126-1287)	150 (5-1021)	0.17	**0.03**	**0.006**
Szérum LDH, IU/L, median (tartomány)	592 (257-3300)	757 (202-1774)	838 (297-3369)	436 (152-2285)	0.28	0.26	0.22
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	18/65 (28%)	5/26 (19%)	1/8 (13%)	2/14 (14%)	0.59	0.50	1.00
Splenomegália (esetszám, %)	72/90 (80%)	22/38 (58%)	7/13 (54%)	9/19 (47%)	**0.02**	**0.007**	0.57
AML-transformáció (esetszám, %)	4/77 (5%)	1/32 (3%)	2/16 (13%)	2/14 (14%)	1.00	0.50	1.00
MF-transformáció (esetszám, %)	11/68 (16%)	2/31 (6%)	3/11 (27%)	6/19 (32%)	0.22	0.19	**0.04**
Cytoreduktív therápia (esetszám, %)	65/78 (83%)	22/34 (65%)	8/11 (73%)	11/22 (50%)	**0.05**	**0.003**	0.40

IV.3 A mutáns allélfrekvencia és a klinikum összefüggése

IV.3.1. *JAK2* V617F VAF hatása a klinikai paraméterekre

A mutáns alléltömeg (amit a variáns allélfrekvenciával-VAF számszerűsítettünk) PMF-ben magasabbnak bizonyult, mint ET-ben (31,4% vs. 9,7%, p <0,001) (*14. ábra*).

A mutáns alléltömeg és a klinikum összefüggések vizsgálatának céljából a populációt a medián érték mentén alacsony és magas alléltömeggel bíró csoportokra osztottuk. Nem minden beteg esetében sikerült valamennyi klinikai és laboratóriumi paramétert összegyűjteni, ezért paraméterenként vizsgálva a populációt más-más medián VAF értékeket kaptunk (*23. táblázat*).



14. ábra. *JAK2* V617F variáns alléltömeg megoszlása a vizsgált populációban ET (n=233) és PMF (n=133) esetében. PMF esetén szignifikánsan (p <0,001) magasabb alléltömeg figyelhető meg mindkét vizsgált driver 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 szérum 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 hemoglobin-koncentráció tekintetében, az AML- vagy myelofibrotikus transzformációs ráta gyakoriságában, vagy a citoreduktív terápia szükségességének gyakoriságában (22. táblázat) a mediánértéknél magasabb és alacsonyabb mutáns *JAK2* alléltömegű csoportok között. A PMF eseteknél nem tudtunk megfigyelni egyik vizsgált paraméter esetén sem szignifikáns különbséget a mediánnál alacsonyabb és magasabb mutáns *JAK2* burden esetén sem (23. táblázat).

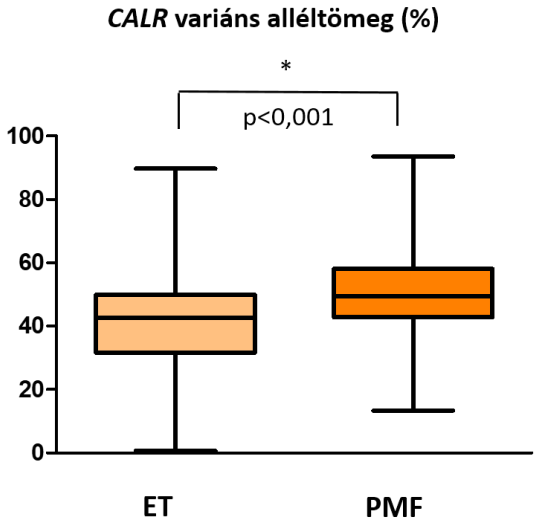
22. táblázat: A *JAK2* V617F mutáns alléltömeg összefüggése a legfontosabb laboratóriumi és klinikai paraméterekkel ET-ben és PMF-ben.

	ET n=233			**PMF** n=133		
***JAK2* V617F mutáns alléltömeg**	< medián	> medián	mediánérték (%)	< medián	> medián	mediánérték (%)
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	60.5 (23-88)	63 (18-89)	9.7	66 (40-87)	68 (25-85)	31.4
	P =0.21			*P* =0.45		
Hemoglobin, g/dl, medián (tartomány)	13.8 (7.3-18.8)	13.7 (6.2-19.2)	9.2	11.6 (4.2-16)	10.6 (7.1-19.7)	26.4
	P =0.51			*P* =0.58		
Fehérvérsejtszám, G/L, medián (tartomány)	9.6 (3.7-25.5)	10.8 (6.1-22.2)	9.2	13.4 (0.5-86)	12.9 (6.5-54)	26.2
	***P* =0.04**			*P* =0.58		
TCT szám, G/L, medián (tartomány)	695.5 (405-1839)	814 (312-2224)	9.2	368 (27-1776)	324 (53-1750)	26.4
	***P* =0.004**			*P* =0.59		
Szérum LDH, IU/L, medián (tartomány)	360 (205-1310)	403 (126-1314)	9.6	685 (280-2344)	585.5 (257-2384)	26.5
	***P* =0.03**			*P* =0.79		
Thrombotikus események - diagnózis előtt (esetszám, %)	11/62 (18%)	15/62 (24%)	9.7	Nem történt adatgyűjtés		
	P =0.51					
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	9/65 (14%)	21/65 (32%)	9.6	3/26 (12%)	5/27 (19%)	26.2
	***P* =0.02**			*P* =0.70		
AML-transzformáció (esetszám, %)	0/82 (0%)	2/83 (2%)	9.3	3/27 (11%)	1/27 (4%)	32.6
	P =0.50			*P* =0.61		
MF-transzformáció (esetszám, %)	2/64 (3%)	4/64 (6%)	9.6	-		
	P =0.68					
Cytoreductív therápia (esetszám, %)	48/59 (81%)	51/60 (85%)	9.3	20/23 (87%)	21/23 (91%)	29.3
	P =0.63			*P* =1.00		

A medián értékek különbözősége abból adódik, hogy nem minden beteg esetében volt minden paraméter elérhető.

IV.3.2 *CALR* variáns allélfrekvencia és a klinikum összefüggése

A *JAK2* mutáns alléltömeghez hasonlóan, PMF-ben a variáns CALR alléltömeg szintén magasabb, mint ET-ben (49,6% vs. 42,5%, p <0,001). Hasonlóképpen a *JAK2* burden kapcsán tapasztaltakhoz, a *CALR* variáns allélfrekvencia PMF (mediánérték: 49,6%, tartomány: 13,4-93,5%) esetében szignifikánsan (p <0,001) magasabb, mint ET (mediánérték: 42,5%, tartomány: 0,7-89,7%) esetében. (*15. ábra*)



15. ábra. *CALR* variáns alléltömeg megoszlása a vizsgált populációban ET (n=104) és PMF (n=49) esetében. PMF esetén szignifikánsan (p <0,001) magasabb alléltömeg figyelhető meg.

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 mediánnál magasabb *CALR* VAF értékek esetén szignifikánsan (p =0,01) magasabb szérum LDH értékeket tapasztaltunk, mint a mediánnál alacsonyabb *CALR* VAF esetén (510 vs. 351 NE/l,), emellett a mediánnál 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 szignifiknánsnak (p =0,18).

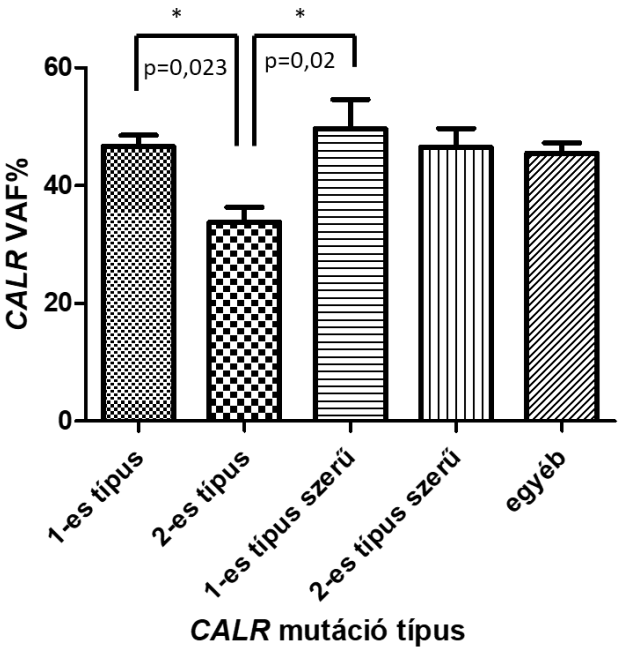
PMF esetén nem találtunk olyan klinikai paramétert, amely a medián *CALR* VAF értékek mentén ketté választva a populációt szignifikánsan különbözött volna. Az adatok összegzése a *23. táblázatban* látható.

23. táblázat: A mutáns *CALR* alléltömeg összefüggése a legfontosabb laboratóriumi és klinikai paraméterekkel ET-ben és PMF-ben.

	ET n=104			**PMF** n=49		
***CALR* mutáns alléltömeg**	< medián	> medián	mediánérték (%)	< medián	> medián	mediánérték (%)
Életkor diagnóziskor, év medián (tartomány)	58 (24-89)	55 (4-82)	42.7	64.5 (37-81)	61 (29-79)	49.6
	P =0.65			*P* =0.71		
Hemoglobin, g/dl, medián (tartomány)	13.6 (8.3-15.7)	12.0 (6.1-17.5)	44.0	11.4 (2.1-15.4)	11.2 (5.6-14.9)	49.9
	P=0.07			*P* =0.47		
Fehérvérsejtszám, G/L, medián (tartomány)	8.4 (4.5-19.6)	8.7 (3.8-25)	44.0	10.9 (3.8-18.9)	9.6 (2.8-20)	49.9
	P =0.94			*P* =0.89		
TCT szám, G/L, medián (tartomány)	970.5 (524-2248)	916 (540-2605)	42.7	625 (97-1791)	598 (112-1998)	49.9
	P =0.83			*P* =0.84		
Szérum LDH, IU/L, medián (tartomány)	351 (185-632)	510 (137-999)	43.8	576.5 (202-1774)	874.5 (414-1475)	50.0
	***P* =0.01**			*P* =0.52		
Thrombotikus események - diagnózis előtt (esetszám, %)	2/36 (6%)	5/37 (14%)	32.9	Nem történt adatgyűjtés		
	P =0.43					
Thrombotikus események - diagnózist követően (esetszám, %)	5/39 (13%)	11/44 (25%)	42.6	1/14 (7%)	4/18 (22%)	49.6
	P =0.18			*P* =0.36		
AML-transzformáció (esetszám, %)	1/47 (2%)	2/48 (4%)	43.1	0/22 (0%)	1/22 (5%)	50.0
	P =1.00			*P* =1.00		
MF-transzformáció (esetszám, %)	2/39 (5%)	7/37 (19%)	44.0	-		
	P=0.08					
Cytoreductív therápia (esetszám, %)	30/42 (71%)	35/41 (85%)	44.5	9/13 (69%)	12/14 (85%)	50.0
	P =0.18			*P* =0.38		

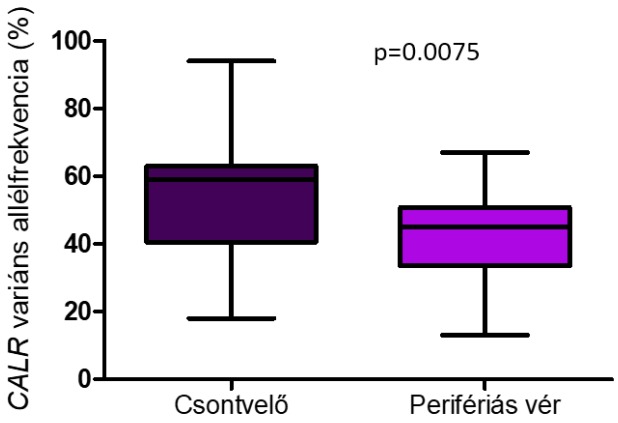
A medián értékek különbözősége abból adódik, hogy nem minden beteg esetében volt minden paraméter elérhető.

A különböző *CALR* mutáció típusokat összehasonlítottuk a variáns allélfrekvencia tekintetében. A 2-es típusú *CALR* mutáció esetében a variáns alléltömeg szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az 1-es típusú (33,75% vs. 47,41% p =0,023) vagy az 1-es típus-szerű mutációk esetében (33,75% vs. 49,66%, p =0,02), azonban a többi mutáció típustól szignifikánsan nem különbözött. Az egyéb típusok között sem fedeztünk fel szignifikáns különbséget (*16. ábra*).



16. ábra. A különböző *CALR* mutáció típusok és a *CALR* VAF összefüggése. A legalacsonyabb VAF értékekkel a 2-es típusú *CALR* mutációval rendelkező esetek rendelkeztek, 33,75%-os átlagértékkel, amely szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az 1-es típusú *CALR* mutációval rendelkezőkhöz (átlag 47,41%, p = 0,023) és az egyes típusú-szerű *CALR* mutációval rendelkezőkhöz képest (átlag: 49,66%, p =0,02). Az összehasonlításokat egyutas ANOVA analízissel végeztük, Tukey post-hoc teszttel.

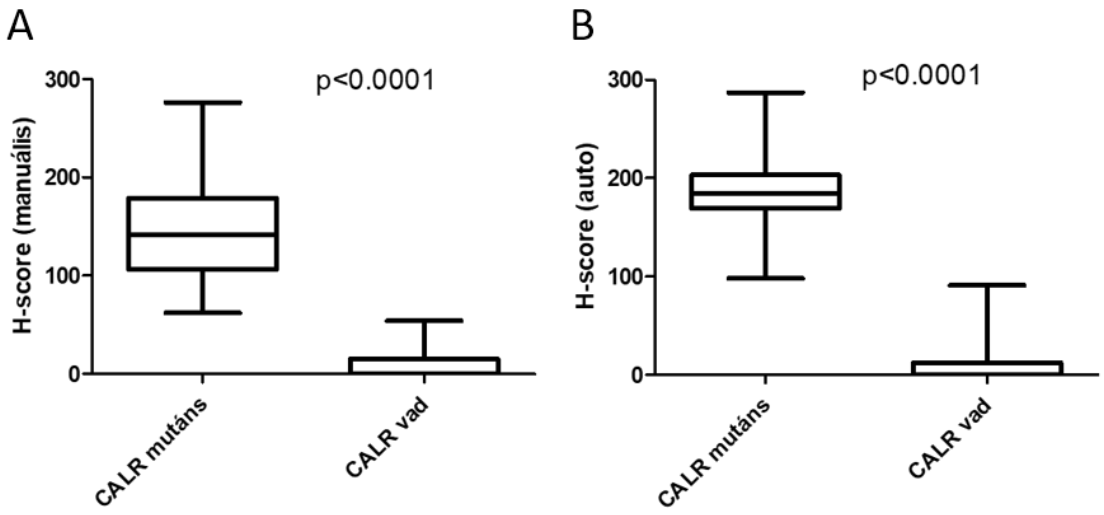
Érdekesség, hogy a csontvelői mintából izolált DNS-ből mért *CALR* VAF értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak, mint a perifériás vérből izolált DNS-ből mért VAF értékek (53,6% vs. 42,7%, p = 0,0075), bár azt fontos megjegyezni, hogy a vizsgált csontvelői és vérminták nem párosított minták voltak, különböző betegektől származtak (*17. ábra*). Ezt az eredményt később párosított mintákon is ellenőrizni szeretnénk. A későbbiekben a dolgozatban leírásra kerül, hogy a *CALR* variáns allélfrekvencia befolyással van több klinikai paraméterre, és a progresszivitással összefügg, ezért ha a mintavétel helye kihatással lehet a VAF értékre, ezt bele kell számolni.



17. ábra. A csontvelőből (n=16) meghatározott *CALR* VAF értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a perifériás vérben (n=75) (53,56% vs. 42,72%, p = 0,007) mérthez képest.

IV.4 CALR mutációk fehérje-szintű analízise

A CALR mutációk fehérjeszintű analíziséhez a kereskedelmi forgalomban kapható CAL2 (Dianova, Hamburg, Németország) monoklonális antitestet használtuk. 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_{man}) értékének átlaga 8,6 (tartomány: 0-54), az automatikus képanalízissel nyert intenzitási score (H_{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_{man} score értékek a CAL2 pozitív esetek esetében 62-276 közötti tartományba estek, átlaguk 144,5 (*18/A. ábra*); míg a H_{auto} score-ok a 98-287 közötti tartományba estek, a score-ok átlagértéke 186,5 volt (*18/B ábra*). A manuális H_{man} és az automatizált analízisből származó H_{auto} score-ok egymással szignifikánsan ($p < 0,001$) és erősen ($r=0,8576$) korreláltak.



18. ábra A CALR mutáns és vad típusú esetek a manuális H score (H_{man}) (A) és az automatikus képanalízissel nyert H score (H_{auto}) (B) alapján is megbízhatóan elkülöníthetőek a CAL2 antitest alkalmazásával.

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. A ritka mutációk között 1-es típus-szerű, 2-es típus-szerű és egyéb típusú mutációk is voltak, ahogy az előbbiekben is említésre került, mindegyikük CAL2 pozitívnak bizonyult. Külön érdekesség, hogy a kutatócsoportunk által leírt egyik ritka, korai stop kodon miatt fehérje-trunkációval járó *CALR* mutáns eset is (c.1110_1141del, E371fs*6) jelölődött a CAL2 antitesttel, szintén érdekesség, hogy a *JAK2 V617F* és *CALR* dupla mutáns esetben teljesen pozitív és teljesen negatív megakaryocytákat is azonosítottunk (*19. ábra*). A *24. táblázatban* látható az összes mutáció-típus, amelyen CAL2 IHC analízist végeztünk. Kutatócsoportunk 16 különböző típusú ritka CALR mutáció esetében elsőként demonstrálta a CAL2 immunhisztokémia alkalmazhatóságát a CALR mutációs státusz meghatározásában.

24. táblázat: Az azonosított *CALR* mutációk típusai és jelölődésük a CAL2 anitesttel

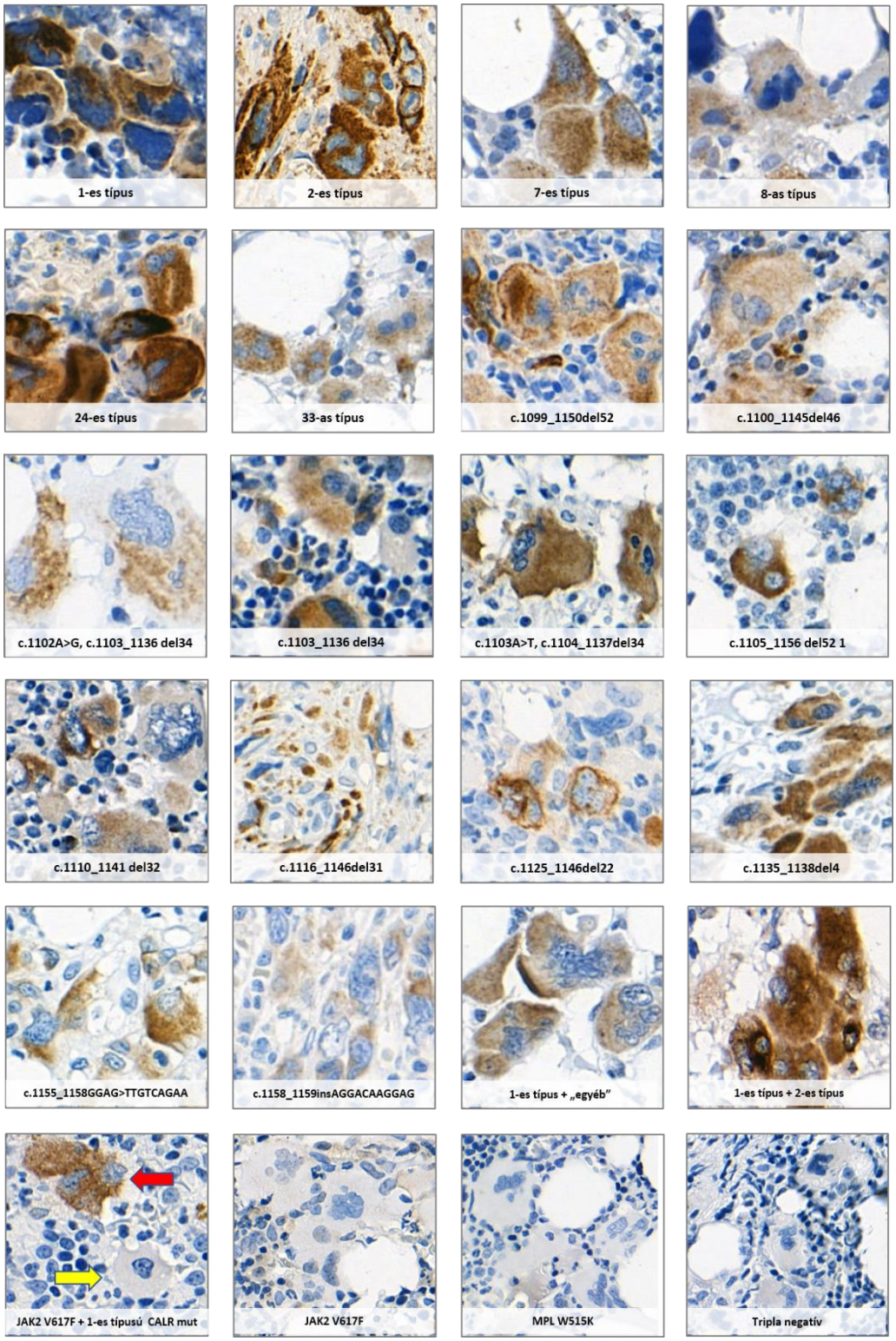
CALR mutáció	Leírás	Kategória	össz (n)	ET (n)	PMF (n)	CAL2 IHC+
Type 1	c.1092_1143del	Type 1-szerű	47	26	21	**47/47**
Type 2	c.1154_1155insTTGTC	Type 2-szerű	23	19	4	**23/23**
Type 7	c.1102_1153del	Type 1-szerű	2	2	0	**2/2**
Type 8	c.1104_1137del	Type 1-szerű	1	1	0	**1/1**
Type 24	c.1120_1138del	Egyéb	1	1	0	**1/1**
Type 33	c.1154_1155insATGTC	Type 2-szerű	1	1	0	**1/1**
"egyéb"	c.1099_1150del52	Type 1-szerű	2	0	2	**2/2**
"egyéb"	c.1100_1145del46	Type 1-szerű	1	1	0	**1/1**
"egyéb"	[c.1102A>G, c.1103_1136del34]	Type 1-szerű	1	1	0	**1/1**
"egyéb"	c.1103_1136del34	Type 1-szerű	1	1	0	**1/1**
"egyéb"	[c.1103A>T, c.1104_1137del34]	Type 1-szerű	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1105_1156del52	Type 1-szerű	1	1	0	**1/1**
"egyéb"	c.1110_1141del32	Type 1-szerű	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1116_1146del31	Type 1-szerű	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1125_1146del22	Egyéb	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1135_1138del4	Egyéb	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1155_1158GGAG>TTGTCAGAA	Type 2-szerű	1	0	1	**1/1**
"egyéb"	c.1158_1159insAGGACAAGGAG	Type 2-szerű	1	0	1	**1/1**
Kombinált mutációk						
Type 1 + Type 2	c.1092_1143del + c.1154_1155insTTGTC	n.a.	1	0	1	**1/1**
Type1 + egyéb	c.1092_1143del + c.1149_1152GGAC>TTGTCA	n.a.	1	0	1	**1/1**
JAK2 V617F + Type1	c.1092_1143del	n.a.	1	1	0	**1/1**

Negatív kontrollok

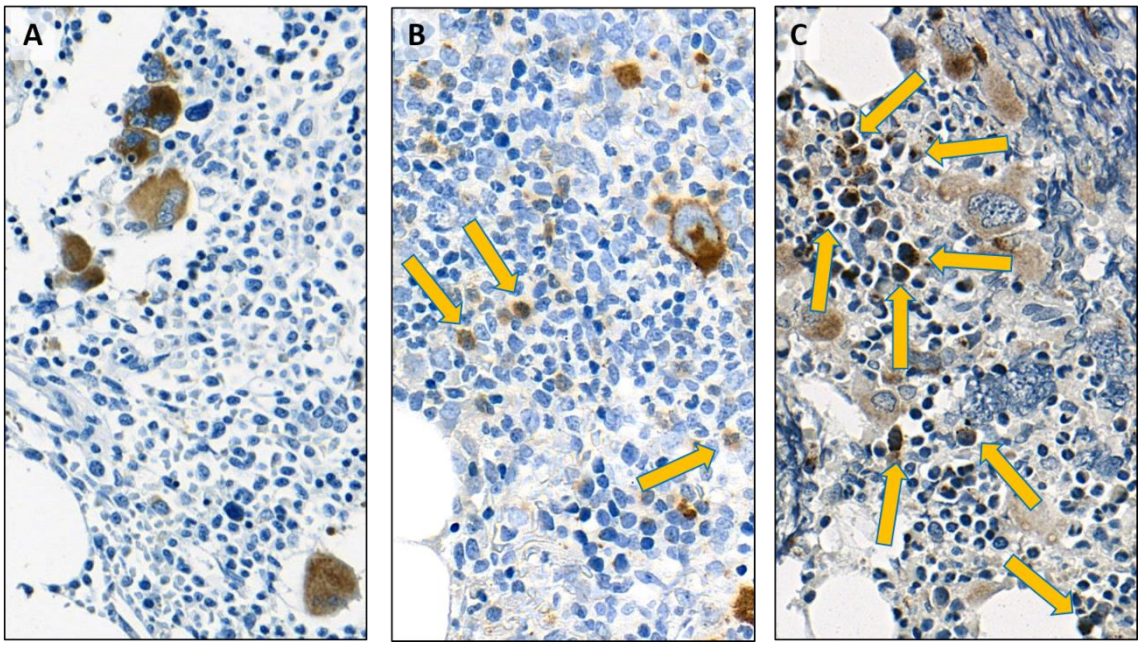
Genotípus	össz(n)	ET (n)	PMF (n)	CAL2 IHC+
Tripla negatív	14	8	6	**0/14**
JAK2 V617F mut	7	4	3	**0/7**
MPL W515K/L mut	4	2	2	**0/4**
MPL W515K/L mut	1	0	1	**0/1**

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 *19. ábrán* mutatunk be reprezentatív felvételeket.

A vizsgált *CALR* mutáns esetek 46%-ában (42/91) a non-megakaryocyta sejtekben is megfigyeltünk CAL2 jelölődést, főként a granulopoetikus prekurzorokban. A pozitív non-megakaryocyta sejtek aránya 0-65%-os tartomány között változott, de jellemzően, alacsonyabb arányban voltak megfigyelhetőek (1-5%). A non-megakaryocyta sejtek CAL2 pozitivitásáról néhány reprezentatív felvétel a *20. ábrán* látható.



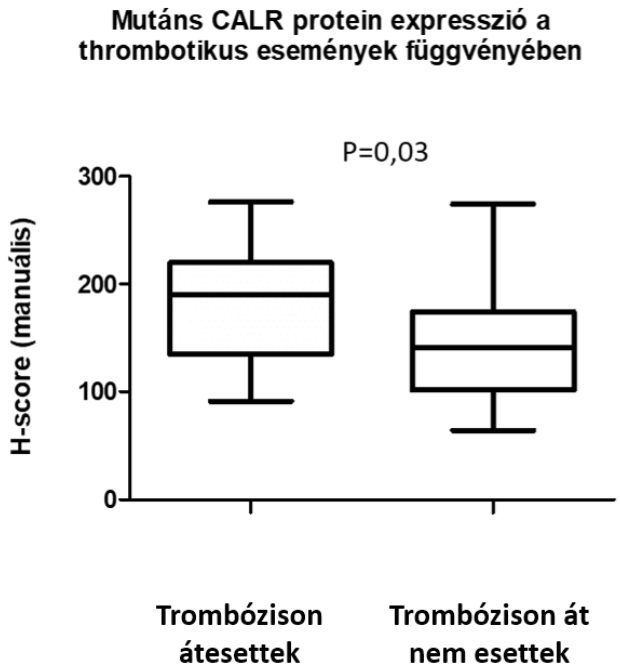
19. ábra: CAL2 monoklonális antitesttel pozitívan jelölődő különböző *CALR* mutációk bemutatása, amely mellett a *CALR* negatív kontrollok CAL2 negatívak. Egy *CALR*/ *JAK2* V617F dupla mutáns eset is látható, amelyben egy pozitív (piros nyíl) és egy negatív (sárga nyíl) megakaryocyta is látható.



20. ábra: A non-megakaryocyta sejtek CAL2 pozitivitásának heterogén megjelenése. (A) nincsenek CAL2 pozitív non-megakaryocyta sejtek, (B) kevés, gyenge CAL2 pozitivitást mutató granulopoetikus prekurzor sejt (sárga nyilak); (C) sok, erős CAL2 pozitivitást mutató non-megakaryocyta sejt (nyilak), amelyek jelölődési intenzitása a mintában látható megakaryocytákét is meghaladja.

IV.5 A kvantitatív IHC adatok és a klinikum összefüggése

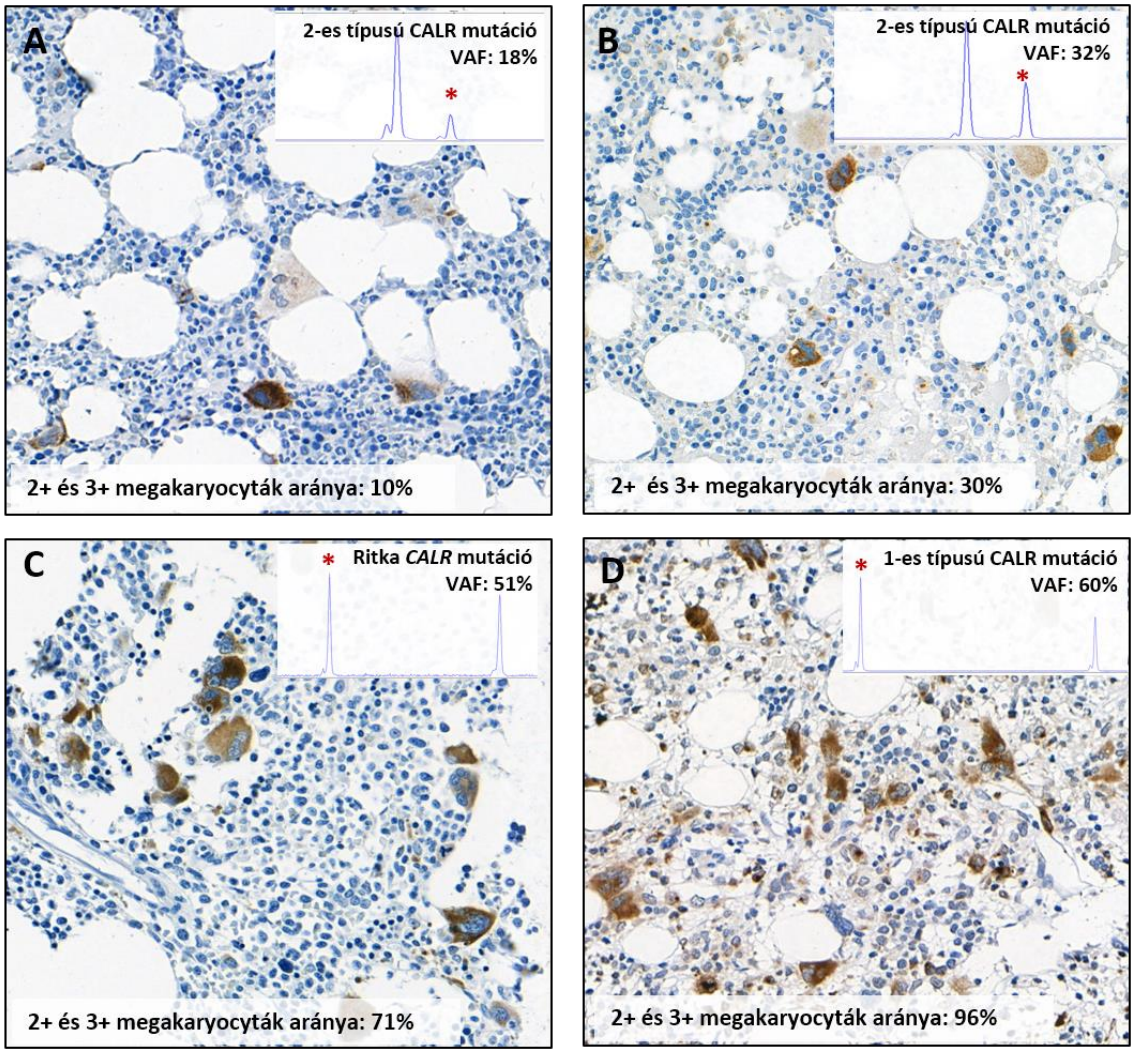
Az IHC-vel meghatározott festődési intenzitási score-okat (H_{man} és H_{auto}), a 2+ és 3+ pozitív sejtek arányát és a non-megakaryocyta sejtek arányát is megvizsgáltuk, mutatnak-e összefüggést a betegek bármilyen klinikai paraméterével. Sem a H_{man} és H_{auto} score-ok, sem a közepesen és erős intenzitással jelölődő sejtek aránya, sem a CAL2+ non-megakaryocyta 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_{man}-score volt megfigyelhető ($p = 0,03$) szemben azokkal a betegekkel, akiknél major thrombotikus eseményeket nem dokumentáltak (*21. ábra*).



21. ábra: A major thrombotikus eseményeken átesett betegekben (n=9), amelyek artériás trombózisokat (artéria poplitea occlusio, acut myocardialis infarctus, ischaemiás stroke) és vénás trombózisokat (pulmonális embólia, v. femoralis trombózis, v. hepatica trombózis, és v. portae trombózis) foglalnak magukba, szignifikánsan magasabb Hman score-t figyeltünk meg a thrombotikus eseményeken át nem esett betegekhez (n=43) képest (p =0,03).

IV.6 Fehérjeszintű és molekuláris eredmények összevetése

A *CALR* variáns alléltömeg nem mutatott összefüggést az IHC intenzitásból nyert adatainkkal (H_{auto} és H_{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. A 21. ábrán a közepes és erős pozitív CAL2 reakciót adó megakaryocyták aránya és a *CALR* VAF összefüggése látható.



22. ábra: A közepes (2+) és erős (3+) CAL2 IHC jelölődést mutató megakaryocyták arányának demonstrációja az adott eset *CALR* variáns allélfrekvenciájának (VAF) ismeretében. (A) (B) (C) és (D) panelek reprezentatív eseteket mutatnak be a megfigyelt trendről. (A piros csillagok az elektroferogramokon a mutáns *CALR* csúcsot jelölik.)

V. Megbeszélés

A myeloproliferatív neopláziák diagnosztikája, rizikóbecslése és kezelése is forradalmi változásokon ment keresztül az elmúlt évtizedben. A kizárólag patológiai jellemzők és klinikai paraméterek alapján diagnosztizált betegségcsoport mára egy genetikai alapon definiált betegségcsoporttá vált, amely diagnosztikus algortimusában mára major kritériumként szerepel a 2005 és 2013 között felfedezett driver mutációk (*JAK2, CALR* és *MPL*) meghatározása. A *JAK2, CALR* és *MPL* mutációs státusz prognosztikus jelentőséggel is bír, hiszen ugyanazon entitás más-más háttérben álló driver mutációval eltérő lefolyással és prognózissal jellemezhető. Manapság a mutációk minőségi kimutatása mellett a driver mutációk kvantitatív meghatározása is egyre nagyobb szerepet kap, hiszen az úgynevezett mutáns allélterhelés is klinikai jelentőséggel bír (78). A *JAK2* V617F variáns allélfrekvencia számos klinikai paraméterrel összefügg, sőt akár a JAK2 inhibitorok hatásosságának felmérésére, vagy a minimális reziduális betegség monitorozására is alkalmazható a haemopoetikus őssejt-transzplantációt követően. A betegségcsoportban a fő driver gének mutációs státuszának klinikumot befolyásoló hatása már ismert néhány éve, ahogyan a *JAK2* mutáns alléltömeg és a klinikum korrelációja (47-49) is ismertek egy ideje, azonban a *CALR* VAF klinikumot befolyásoló jelentőségéről ez idáig átfogó tanulmány nem készült.

Munkánk során egy nagyszámú hazai MPN betegcsoport estében meghatároztuk a *JAK2*, *CALR* és *MPL* gének mutációs státuszát, majd a JAK2 V617F és CALR mutáns allélterhelés összefüggését elemeztük a különböző klinikai paraméterekkel gén- és fehérjeszinten.

A fő driver gének eltéréseit tekintve a *JAK2* V617F mutáció bizonyult 55-60%-kal a leggyakoribbnak, a *CALR* mutáció 20-25%-kal a második leggyakoribb és az *MPL* mutáció 1-7%-kal a harmadik leggyakoribb driver mutáció. Az irodalomban több munkacsoport is hasonló megoszlást állapított meg az általuk vizsgált populációban (5; 6; 41; 58; 60; 63; 65; 75; 85).

Sanger szekvenálással 12 új *CALR* mutációt azonosítottunk, amelyeket az alapján, hogy a képződött mutáns CALR proteinben mekkora méretű régió veszik el, 1-es típus-szerű (n=4), 2-es típus szerű (n=3), in-frame (n=1), egyéb (n=4) típusú csoportokba soroltunk. Mindegyik mutációnál +1bp olvasási kereteltolódás észlelhető, amely egy közös új

peptidszekvenciát eredményezett a C-terminális régióban. Az új szekvencia következtében a proteint az endoplazmás retikulumban benntartani hivatott retenciós szignál KDEL motívum elvész. A kereteltolódás következtében a bázikus aminosavak kerülnek túlsúlyba, holott a funkcionáló fehérjhez savas össztöltöttség szükséges (5; 36; 40). Az általunk azonosított mutációk között egy ritka in-frame eltérés is megfigyelhető volt, amely következtében képződött fehérje savas karakterű marad a C-terminális régióban. Mivel a CALR onkogenitásának kifejtéséhez bázikus kémhatás szükséges, ezért feltehetően ez a mutáció nem feltétlenül vesz részt az MPN onkogenezisben. Másrészt azonban in-frame *CALR* mutációk és a JAK-STAT úton más mutáció együttes jelenlétét már leírták (86).

A *CALR* mutáció típusok megoszlása eltérőnek bizonyult ET és PMF esetén betegcsoportunkban, az 1-es/2-es típus arány PMF-ben magasabb, mint ET-ben (PMF: 66% vs. 12%; ET: 49% vs. 34%), amely alátámasztja azt az elméletet, hogy a különböző típusú mutációk játszhatanak szerepet a különböző fenotípusok létrehozásában. Míg az 1-es típus a myelofibrotikus fenotípussal asszociál gyakrabban, és esetén magasabb a MF transzformációs ráta aránya, addig a 2-es típusú mutáció főként ET-ben fordul elő, és egy sokkal indolensebb lefolyást vetít előre kisebb MF transzformációs rátával és thrombotikus eseményrátával (40; 87).

A CALR és JAK2 mutációs státusz valamint a klinikum összefüggését vizsgálva ET-ben a JAK2 V617F mutációval rendelkező betegeknél volt a leggyakoribb a splenomegália és a diagnózist megelőző trombotikus ráta, míg a CALR mutációval rendelkezőknél találtuk a legmagasabb thrombocyta számot a legmagasabb fehérvérsejt számot és a legmagasabb MF transzformációs rátát. A *CALR* mutációt hordozó ET esetekben a thrombotikus ráta alacsonyabbnak bizonyult a *JAK2 V617F* mutáns esetekhez képest, amely vélhetően inkább a *JAK2* mutáció hiányának, mintsem a *CALR* mutáció jelenlétének köszönhető (88; 89). PMF-ben a CALR mutáció asszociált a legmagasabb TCT- és LDH szinttel, míg a JAK2 mutációval rendelkezőknél figyeltük meg a legmagasabb splenomegalia arányt.

Ahogyan a *CALR* mutáció típusoknak, a *CALR* variáns allélfrekvenciának is jelentősége lehet az MPN fenotípusának kialakulásában. Betegcsoportunkban a *CALR* VAF szignifikánsan magasabbnak bizonyult PMF-ben, mint ET-ben (49,6% vs. 42,5%, p <0,001). *JAK2* V617F mutáció esetében is hasonló, talán még erőteljesebb különbséget figyeltünk meg (PMF: 31,4% vs. ET: 9,7%, p <0,001). A két MPN közötti *JAK2* V617F

mutáns alléltömeg különbséget már előzőleg több munkacsoport is leírta (75; 90), és ez alátámasztja a gén-dózis hipotézist, amely egy lehetséges magyarázat az MPN-ek patogenezisére (91).

A különböző CALR mutáció típusok variáns allélfrekvenciáját összehasonlítva, az 2-es típusú esetek alléltömege volt a legalacsonyabb (33,75%), amely szignifikánsan (p =0,023 alacsonyabb volt, mint az 1-es típusú mutációval rendelkező eseteké (47,41%) és szintén szignifikánsan (p =0,02) alacsonyabb volt az 1-es típus-szerű mutációval rendelkező esetekhez képest (49,68%). Ez új felismerés a Cabagnols és munkatársai által leírtakhoz képest, a munkacsoportjuk sem az 1-es/ 2-es típusú mutációk között, sem az ET-PMF között nem talált eltérést a variáns allélfrekvenciában (87). Így nem csupán a mutációtípusnak, hanem a variáns allélfrekvenciának és a mutáció típusnak együttes hatása is lehet az 2-es típusú esetek és az alacsonyabb allélfrekvencia felül-reprezentáltsága ET-ben. A *CALR* variáns allélfrekvencia összefüggést mutatott a perifériás vérben az LDH szinttel, és tendenciózusan alacsonyabb haemoglobin szinttel rendelkeztek a magas *CALR* alléltömegű csoportban lévő esetek (12,0 vs. 13,6g/dl p =0,07), amely eredmény Andrikovics és munkatársai által találtakkal (75) egybecseng, azonban sem a thrombocytákkal, sem a fehérvérsejtekkel nem találtunk összefüggést.

A mutáns *CALR* alléltömeg szignifikánsan különbözőnek bizonyult a csontvelői és a perifériás vérből izolált DNS-ek esetében (53,56% vs. 42,72%, p = 0,007), azonban meg kell jegyezni, hogy nem ugyanazon betegekből származó, minta-párokról volt szó. Ezt az megfigyelést érdemes volna párosított mintákon, esetleg nagyobb populáción ellenőrizni, hiszen amennyiben megerősíthető az észrevétel, diagnosztikai és prognosztikai jelentősége lehet a későbbiekben. Larsen és munkatársai 2008-ban párosított mintákon nézték a perifériás vérből és a csontvelőből származó minták *JAK2* V617F mutáns alléltömegét, és nem találtak szignifikáns eltérést a perifériás vér illetve a csontvelői minták között (92), azonban ők kis esetszámmal, főként PV esetekkel dolgoztak, szemben az általunk vizsgált ET és PMF esetekkel.

Ahogyan a magas *JAK2* V617F alléltömeggel járó PV esetek (47), úgy a kohortunkban szereplő magas mutáns *CALR* alléltömeggel járó ET esetek is proliferatívabb fenotípusúnak bizonyultak az alacsony mutáns *CALR* alléltömeggel rendelkezőkhöz képest. A magasabb LDH-szint és a gyakrabban előforduló splenomegalia a citoreduktív terápia (nagyobb) szükségességét jelzi, és egyben emelkedett hajlamot a myelofibrotikus

transzformációra. Ezen megfigyelések támogatják a proliferatívabb fenotípussal való összefüggést, még ha némelyik megfigyelés nem is éri el a szignifikáns szintet, csupán tendenciózus.

A mutáns *JAK2* alléltömeg nagyban befolyásolta a perifériás vérsejtek számát. Kittur és mtsai-hoz hasonlóan (93) kohortunkban is a magasabb *JAK2* V617F allélterhelés magasabb fehérvérsejtszámmal (p =0,04) és thrombocyta számmal (p =0,004) járt ET-ben. A *JAK2* V617F mutáció megakaryopoezisre kifejtett hatása ellentmondásos. Míg munkacsoportunk és más csoportok direkt összefüggést figyeltek meg a thrombocyta-szám és a magas *JAK2* VAF között, addig más munkacsoportok rágcsáló-modellben homozigóta *JAK2* V617F mutáció megakaryocyta elégtelenséghez vezető (94-97) hatásait írták le, illetve csökkent thrombocytaszámot a mutáns *JAK2* alléltömeg emelkedésével (90; 98).

A genetikai léziók fehérjeszinten történő kimutatásának lehetősége, monoklonális antitestet használva, egyszerűbbé és költséghatékonyabbá teheti a molekuláris diagnosztikát. Például a *BRAF* V600E mutáció kimutatása fehérjeszinten immunhisztokémiával megkönnyítette és meggyorsította a hajassejtes leukémia diagnózisát, és olyan diagnosztikus centrumokban is elérhetővé tette azt, ahol limitált a molekuláris módszerekhez való hozzáférés. Ennek analógiájára, a Stein és munkacsoportja által tervezett CAL2 antitest megkönnyítheti az MPN diagnosztikát azáltal, hogy előszűrésként immunhisztokémiát használunk FFPE anyagokon a *CALR* mutáció kimutatására. Vizsgálatunk reprezentálja az eddigi legnagyobb esetszámú *CALR* pozitív MPN kohortot, amelynél a CAL2 IHC került alkalmazásra. Tanulmányunkban mind a 91 *CALR* mutáns eset, összesen 21 féle *CALR* mutációval, köztük 19 ritka mutációval, bizonyult CAL2 antitesttel és a kontroll esetek mind negatívnak bizonyultak, ezzel 100%-os konkordanciát figyeltünk meg a molekuláris és fehérje szintű mutációs-státusz meghatározás között. A vizsgált 19 ritka *CALR* mutáció közül tizenhatot elsőként vizsgáltunk meg a CAL2 antitesttel, köztük egy olyan mutációt hordozó esetet, ahol korai stop kodon miatt proteintrunkáció is kialakult. A különböző *CALR* mutációt hordozó esetek között nem tapasztaltunk jelölődésbeli különbségeket, így a különböző *CALR* mutációk elkülönítésére nem alkalmas. A folyamatosan csökkenő árak mellett a molekuláris módszerek alkalmazása mellett szól az is, hogy a mindennapi gyakorlatban perifériás vérből történik a *CALR* mutációk kimutatása.

Munkánk során kvantifikáltuk a CAL2 IHC reakció intenzitását, aminek során megalkottuk a H_{man} és H_{auto} score-okat, amelyek alkalmazásával kiválóan elkülönültek a CALR negatív és pozitív esetek egymástól. Ezt követően próbáltunk összefüggést találni a gén- és fehérjeszintű CALR allélterhelés között, azonban a *CALR* VAF és az IHC intenzitási adatok alapján kapott H_{man} és H_{auto}-score-ok nem mutattak korrelációt. Ha csak a közepesen és az erősen jelölődő, tehát a 2+ és 3+ pozitív megakaryocytákat elemeztük, akkor tendenciózus összefüggés mutatkozott a variáns allélfrekvencia és a 2+/3+ pozitív megakaryocyták aránya között, de szignifikáns összefüggést itt sem tudtunk megfigyelni. A CAL2 expresszió mértéke, sem a H_{man}, sem a H_{auto}, sem a 2+/3+ megakaryocyták aránya nem mutattak összefüggést az általunk vizsgált klinikai paraméterek többségével, így az LDH-szinttel, thrombocyta számmal, vörösvértest-számmal, fehérvérsejt-számmal, haematokrittal vagy a hemoglobin-koncentrációval. Azonban a thrombotikus eseményeken átesett esetek H_{man} score-ja szignifikánsan magasabbnak bizonyult a thrombotikus eseményektől mentes szubpopulációhoz képest (H_{man} score: 182,1 vs. 142,6 p =0,03).

A CAL2 pozitivitás elsősorban a megakaryocytákban volt megfigyelhető, ahogy ezt az előző tanulmányokban is leírták (44-46), habár egyikük sem kvantifikálta az IHC alapján a jelölődött sejtek arányát, sem a jelölődött sejtek intenzitását, és nem hozták összefüggésbe ezt a klinikai vagy genetikai paraméterekkel. IHC tanulmányunkban a *CALR*+ esetek 46%-ában a non-megakaryocyta sejtekben is tapasztaltunk CAL2 pozitivitást, amely főként a myeloid prekurzorokat jelentette, esetenként akár a sejtek 65%-ában is tapasztaltunk pozitivitást. Mivel a *CALR* mutáció igen korai esemény az MPN-ek patogenezisében, érinthet olyan korai progenitort, amely képes erythroid vagy myeloid irányba differenciálódni (5). Hogy mégis miért expresszálódik predominánsan a megakaryocytákban, azt azzal lehet feloldani, hogy a megakaryocytákban a mutáns CALR protein overexpressziója kifejezettebb a normál CALR fehérjéhez képest (43; 45; 99).

A *CALR* mutációk diagnosztikájában az előbb leírtak miatt több szinten lehet érdekes a genetikai eltéréssel kapcsolatos információ. Először is fontos információ az, hogy van-e *CALR* mutáció (mivel önmagában a *CALR* mutáció jelenléte jobb prognózist jelent PMF-ben, bár ET-ben nem). Ha jelen van *CALR* mutáció, akkor mekkora a mutáns alléltömeg vagy más néven a variáns allélfrekvencia (VAF), és milyen típusú *CALR* mutáció van

jelen (1-es típus, 2-es típus1-es típus-szerű, 2-es típus szerű, in-frame). Ugyan a CAL2 immunhisztokémiával nem kapunk minden kérdésünkre választ, de mégis hasznos eszköz lehet az MPN diagnosztikában, főként olyan diagnosztikai laboratóriumok számára, ahol nem elérhető a mindennapokban a molekuláris diagnosztika. Ezekben az esetekben a CAL2 egyfajta előszűrőként is működhet. Mindazonáltal a mindennapi gyakorlatban fontosnak és szükségesnek tartjuk a *CALR* mutációk kimutatását molekuláris módszerrel. JAK2 és CALR mutációk gén- és fehérje szintű minőségi- és mennyiségi analízisét végeztük el nagy létszámú magyar betegcsoporton, melynek eredményeként részben az irodalomban eddig ismertekkel összecsengő megfigyeléseket, részben új megfigyeléseket tettünk.

VI. Következtetések

Munkánk során a JAK2 és CALR gének mutációinak mennyiségi analízisét 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 thrombocytemiaban szignifikáns összefüggést mutatott a magasabb LDH-értékkel, thrombocyta számmal és fehérvérsejt számmal.
- Esszenciális thrombocytemiaban 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 protein-expresszióból származtatott számszerűsített paraméterek közül a Hman score-ban a thrombotikus eseményen átesett és át nem esetek szignifikánsan elkülönültek egymástól esszenciális thrombocytemiaban és primer myelofibrózisban egyaránt.

VII. Összefoglalás

A Philadelphia negatív myeloproliferatív neopláziák hátteréről a *JAK2* V617F mutáció 2006-os felfedezését követően az elmúlt szűk másfél évtizedben számos olyan felfedezés látott napvilágot, amely a betegségcsoport pontosabb megismerésében jelentős szerepet játszott. A mérföldkő jelentőségű driver mutációk, a *JAK2* V617F az *MPL* és *CALR* mutációk megismerése mellett fény derült egyéb jelentős felismerésekre: a variáns allélfrekvencia, illetve addicionális fenotípus-módosító szubklonális mutációk jelenlétének vagy hiányának jelentőségére az MPN-ek klinikumát, kórlefolyását illetően. Mindezeknek köszönhetően egy igazán színes, összetett kép rajzolódott ki a szemünk előtt a betegség-csoportot illetően.

Munkacsoportunk célul tűzte ki a Philadelphia negatív MPN-ek hátterében álló driver mutációk minőségi és mennyiségi analízisét, majd összevetését a laboratóriumi és klinikai paraméterekkel. Az azonosított *CALR* mutációt hordozó mintákon fehérje szintű minőségi és mennyiségi analízist tűztünk ki célul immunhisztokémiai analízissel a CALR mutáció-specifikus CAL2 antitestet alkalmazva.

A variáns allélfrekvencia befolyással bírt a klinikumra mind a *JAK2* V617F mind a *CALR* esetében. A gén-dózis hipotézist saját eseteinkre nézve is megfigyelhettük, a PMF esetek szignifikánsan magasabb alléltömeggel bírtak, mint az ET esetek, *JAK2* és *CALR* mutáció esetében is. Továbbá, a magasabb alléltömeg mindkét esetben proliferatívabb fenotípussal is járt. Munkánk során összesen 21 féle (n=91) *CALR* mutáns csontvelői mintán sikeresen beállítottuk a CAL2 immunhisztokémiai vizsgálatot, majd immunreakció erőssége alapján kvantifikáltuk azt. A mennyiségi fehérjeszintű adatok, szignifikáns összefüggést mutattak a thrombotikus események kialakulásával. A CAL2 immunhisztokémiai reakció rendkívül specifikus és szenzitív módon azonosította valamennyi, általunk vizsgált CALR mutációt, így akár előszűrő szerepe is lehet az MPN-ek diagnosztikájában. Ugyanakkor, pozitív esetben a genetikai prognosztikus többlet információ miatt a molekuláris módszerek.

VIII. Summary

Our understanding of the pathogenesis of Ph-negative MPNs massively evolved over the past 14 years. Since the discovery of the JAK2 V617F mutation in 2005, further key aberrations have been identified including mutations in the thrombopoietin receptor (*MPL*) gene and distinct mutations of the *CALR* gene. Alongside these main driver mutations, other important factors have been discovered such as variant allele frequency (VAF) of the different mutations and additional phenotype-modifying subclonal mutations; leading to a complex and colorful genomic landscape of MPNs.

Aims of our study were to asses qualitative and quantitative information about the distribution of the genetic driver mutations in a Hungarian cohort of Ph- MPN patients, and to examine the correlation between clinical or laboratory parameters and genetic data. Additionally, we aimed to perform a qualitative and quantitative analysis of CALR mutations at protein-level with immunohistochemistry (IHC) using the mutation-specific CAL2 antibody on formalin-fixed paraffin embedded bone marrow samples specimens.

JAK2 and *CALR* VAFs had an influence on the MPN phenotype. PMF cases had significantly higher VAF (both *JAK2* and *CALR*) compared to the ET cases. Higher VAFs correlated with a more proliferative phenotype: several clinical parameters including serum LDH levels, white blood cell count platelet count or ratio of thrombotic event were influenced by *JAK2* V617F VAF. We performed CAL2 IHC on n=91 CALR positive MPN samples with 21 different types of CALR mutations, and developed a quantitative score to assess the CAL2 staining intensity. The CAL2 IHC was highly specific and sensitive in identifying the various CALR mutations, and the mutant CAL protein expression showed a statistically significant correlation with the occurrence of thrombotic events. Although a pre-screening for CALR mutations using the CAL2 antibody may have a potential role in the diagnostic algorithm of MPNs, in case of a positive reaction, the additional prognostic value of the molecular information makes the molecular genetic testing of CALR mutations inevitable.

IX. Irodalomjegyzék

1. Nowell PC, Hungerford DA. (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J Natl Cancer Inst 25:85-109
2. Vainchenker W, Constantinescu SN. (2005) A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. Hematology Am Soc Hematol Educ Program:195-200
3. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood 108:3472-3476
4. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 3:e270
5. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJP, Harrison CN, Cross NCP, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med 369:2391-2405
6. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanesi C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schonegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-

Furga G, Cazzola M, Kralovics R. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 369:2379-2390

7. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434:1144-1148
8. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 352:1779-1790
9. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Vannucchi AM, Tefferi A. (2016) The 2016 revision of WHO classification of myeloproliferative neoplasms: Clinical and molecular advances. Blood Rev 30:453-459
10. 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 127:2391-2405
11. Shammo JM, Stein BL. (2016) Mutations in MPNs: prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decisions. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016:552-560
12. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, Gangat N, Fjerza R, Belachew AA, Lasho TL, Ketterling RP, Hanson CA, Rambaldi A, Finazzi G, Thiele J, Barbui T, Pardanani A, Vannucchi AM. (2014) Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood 124:2507-2513; quiz 2615
13. Elala YC, Lasho TL, Gangat N, Finke C, Barraco D, Haider M, Abou Hussein AK, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. (2016) Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. Am J Hematol 91:503-506
14. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. (2018) Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. Blood Cancer J 8:2

15. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, Dupriez B, Levine RL, Passamonti F, Gotlib J, Reilly JT, Vannucchi AM, Hanson CA, Solberg LA, Orazi A, Tefferi A, International Working Group for Myelofibrosis R, Treatment. (2008) Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Leukemia 22:437-438
16. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. (2005) European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Haematologica 90:1128-1132
17. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. (2015) Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Exp Hematol 43:599-608
18. Vainchenker W, Kralovics R. (2017) Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood 129:667-679
19. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. (2017) Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. Haematologica 102:7-17
20. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, Gryshkova V, Defour JP, Vertenoeil G, Ngo A, Koay A, Raslova H, Courtoy PJ, Choong ML, Plo I, Vainchenker W, Kralovics R, Constantinescu SN. (2016) Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. Blood 127:1325-1335
21. Sanz Sanz A, Niranjan Y, Hammaren H, Ungureanu D, Ruijtenbeek R, Touw IP, Silvennoinen O, Hilhorst R. (2014) The JH2 domain and SH2-JH2 linker regulate JAK2 activity: A detailed kinetic analysis of wild type and V617F mutant kinase domains. Biochim Biophys Acta 1844:1835-1841
22. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjan Y, Young C, Jensen ON, Xu CF, Neubert TA, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O. (2011) The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. Nat Struct Mol Biol 18:971-976
23. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR, Cancer

Genome P. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 365:1054-1061

24. Kralovics R, Skoda RC. (2005) Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. Blood Rev 19:1-13
25. Hsu HC. (2007) Pathogenetic role of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. J Chin Med Assoc 70:89-93
26. Nangalia J, Green AR. (2017) Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. Blood 130:2475-2483
27. Scott LM, Beer PA, Bench AJ, Erber WN, Green AR. (2007) Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera. Br J Haematol 139:511-512
28. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. (2008) Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. Blood 111:1686-1689
29. Kouroupi E, Zoi K, Parquet N, Zoi C, Kiladjian JJ, Grigoraki V, Vainchenker W, Lellouche F, Marzac C, Schlageter MH, Dosquet C, Scott LM, Fenaux P, Loukopoulos D, Chomienne C, Cassinat B. (2008) Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. Br J Haematol 142:676-679
30. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, Abdelouahab H, Lacout C, Pasquier F, Willekens C, Rameau P, Lecluse Y, Micol JB, Constantinescu SN, Vainchenker W, Solary E, Giraudier S. (2014) JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. Blood 124:2104-2115
31. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. (2004) Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. Blood 103:4198-4200
32. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. (2008) MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. Blood 112:141-149
33. Spivak JL. (2017) Myeloproliferative Neoplasms. N Engl J Med 377:895-896

34. Chi J, Nicolaou KA, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou A, Pierides C, Manoloukos M, Barbouti K, Melanthiou F, Prokopiou C, Vassiliou GS, Costeas P. (2014) Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. Leukemia 28:1152-1154
35. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J 344 Pt 2:281-292
36. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. (2014) CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. Am J Hematol 89:453-456
37. Broseus J, Lippert E, Harutyunyan AS, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L, Milosevic JD, Haferlach T, Germing U, Luno E, Schnittger S, Kralovics R, Girodon F. (2014) Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. Leukemia 28:1374-1376
38. Lasho TL, Elliott MA, Pardanani A, Tefferi A. (2014) CALR mutation studies in chronic neutrophilic leukemia. Am J Hematol 89:450
39. Luo W, Yu Z. (2015) Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). Stem Cell Investig 2:16
40. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, Sant'Antonio E, Abbonante V, Moccia F, Casetti IC, Bellini M, Renna MC, Roncoroni E, Fugazza E, Astori C, Boveri E, Rosti V, Barosi G, Balduini A, Cazzola M. (2016) Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Leukemia 30:431-438
41. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, Finke C, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Wolanskyj AP, Maffioli M, Casalone R, Pacilli A, Vannucchi AM, Passamonti F. (2014) Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. Am J Hematol 89:E121-124
42. Wojtaszewska M, Iwola M, Lewandowski K. (2015) Frequency and molecular characteristics of calreticulin gene (CALR) mutations in patients with JAK2 - negative myeloproliferative neoplasms. Acta Haematol 133:193-198
43. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugei G, Carrai V, Balliu M, Mannarelli C, Pacilli A, Calabresi L, Fjerza R, Pieri L, Bosi A, Manfredini R,

Guglielmelli P. (2014) Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. Leukemia 28:1811-1818

44. Andrici J, Farzin M, Clarkson A, Sioson L, Sheen A, Watson N, Toon CW, Koleth M, Stevenson W, Gill AJ. (2016) Mutation specific immunohistochemistry is highly specific for the presence of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. Pathology 48:319-324
45. Nomani L, Bodo J, Zhao X, Durkin L, Loghavi S, Hsi ED. (2016) CAL2 Immunohistochemical Staining Accurately Identifies CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. Am J Clin Pathol 146:431-438
46. Stein H, Bob R, Durkop H, Erck C, Kampfe D, Kvasnicka HM, Martens H, Roth A, Streubel A. (2016) A new monoclonal antibody (CAL2) detects CALRETICULIN mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded bone marrow biopsies. Leukemia 30:131-135
47. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC. (2007) The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. Eur J Haematol 79:508-515
48. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, Antonioli E, Bosi A, Vannucchi AM. (2009) JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. Haematologica 94:144-146
49. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM, Myeloproliferative Disorders Research C. (2008) Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. Haematologica 93:41-48
50. Silver RT, Vandris K, Wang YL, Adriano F, Jones AV, Christos PJ, Cross NC. (2011) JAK2(V617F) allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. Leuk Res 35:177-182
51. Fong CY, Morison J, Dawson MA. (2014) Epigenetics in the hematologic malignancies. Haematologica 99:1772-1783
52. Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, Zoi K, Ernst T, Stegelmann F, Dohner K, Chase A, Cross NC. (2012) Inactivation of

polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood 119:1208-1213

53. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, Belachew AA, Pancrazzi A, Wassie EA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Vannucchi AM. (2014) CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. Leukemia 28:1494-1500

54. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A. (2014) CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 28:1472-1477

55. Them NC, Kralovics R. (2013) Genetic basis of MPN: Beyond JAK2-V617F. Curr Hematol Malig Rep 8:299-306

56. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boultwood J, Grand FH, Cross NC. (2010) Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet 42:722-726

57. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Dohner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi A, Campbell PJ, Green AR. (2015) Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 372:601-612

58. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, Girsberger S, Lehmann T, Passweg J, Stern M, Beisel C, Kralovics R, Skoda RC. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood 123:2220-2228

59. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Vannucchi AM. (2015) What Do Molecular Tests Add to Prognostic Stratification in MF: Is It Time to Add These to Our Clinical Practice? Curr Hematol Malig Rep

60. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, Casetti I, Colomer D, Pieri L, Pratcorona M, Rotunno G, Sant'Antonio E, Bellini M,

Cavalloni C, Mannarelli C, Milanesi C, Boveri E, Ferretti V, Astori C, Rosti V, Cervantes F, Barosi G, Vannucchi AM, Cazzola M, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I. (2014) Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. Blood 124:1062-1069

61. Alvarez-Larran A, Martinez D, Arenillas L, Rubio A, Arellano-Rodrigo E, Hernandez Boluda JC, Papaleo N, Caballero G, Martinez C, Ferrer-Marin F, Mata MI, Perez-Encinas M, Duran MA, Alonso JM, Carreno-Tarragona G, Alonso JM, Noya S, Magro E, Perez R, Lopez-Guerra M, Pastor-Galan I, Cervantes F, Besses C, Colomo L, Rozman M. (2018) Essential thrombocythaemia with mutation in MPL: clinicopathological correlation and comparison with JAK2V617F-mutated and CALR-mutated genotypes. J Clin Pathol 71:975-980
62. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, Carobbo A, Barbui T. (2007) Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. Haematologica 92:135-136
63. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Elena C, Casetti IC, Milanesi C, Sant'antonio E, Bellini M, Fugazza E, Renna MC, Boveri E, Astori C, Pascutto C, Kralovics R, Cazzola M, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I. (2014) JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. Blood 123:1544-1551
64. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Gangat N, Wolanskyj AP. (2014) Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. Leukemia 28:2300-2303
65. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, Fanelli T, Bosi A, Vannucchi AM, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative I. (2014) Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. Blood 123:1552-1555
66. Finazzi G, Carobbio A, Guglielmelli P, Cavalloni C, Salmoiraghi S, Vannucchi AM, Cazzola M, Passamonti F, Rambaldi A, Barbui T. (2014) Calreticulin

mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. Blood 124:2611-2612

67. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani AD. (2014) The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. Blood 124:2465-2466

68. Vannucchi AM, Verstovsek S, Guglielmelli P, Griesshammer M, Burn TC, Naim A, Paranagama D, Marker M, Gadbaw B, Kiladjian JJ. (2017) Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. Ann Hematol 96:1113-1120

69. Barosi G, Klersy C, Villani L, Bonetti E, Catarsi P, Poletto V, Campanelli R, Impera S, Latagliata R, Viarengo G, Carolei A, Massa M, Musso M, Crescimanno A, Gale RP, Rosti V. (2016) JAK2(V617F) allele burden 50% is associated with response to ruxolitinib in persons with MPN-associated myelofibrosis and splenomegaly requiring therapy. Leukemia 30:1772-1775

70. Hussein K, Bock O, Theophile K, von Neuhoff N, Buhr T, Schlue J, Busche G, Kreipe H. (2009) JAK2(V617F) allele burden discriminates essential thrombocythemia from a subset of prefibrotic-stage primary myelofibrosis. Exp Hematol 37:1186-1193 e1187

71. Deininger M, Radich J, Burn TC, Huber R, Paranagama D, Verstovsek S. (2015) The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. Blood 126:1551-1554

72. Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Palumbo GA, Breccia M, Sabattini E, Villari L, Riminucci M, Valli R, Catani L, Alimena G, Ottaviani E, Fama A, Martinelli G, Perricone M, Spinsanti M, Cavo M, Vianelli N, Palandri F. (2018) Comparison of JAK2(V617F) -positive essential thrombocythaemia and early primary myelofibrosis: The impact of mutation burden and histology. Hematol Oncol 36:269-275

73. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Dellacasa CM, Salmoiraghi S, Delaini F, Rambaldi A, Barbui T. (2009) JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. Exp Hematol 37:1016-1021

74. Barosi G, Massa M, Campanelli R, Fois G, Catarsi P, Viarengo G, Villani L, Poletto V, Bosoni T, Magrini U, Gale RP, Rosti V. (2017) Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease. Leuk Res 60:18-23
75. 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. (2014) Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. Haematologica 99:1184-1190
76. Kjaer L, Cordua S, Holmstrom MO, Thomassen M, Kruse TA, Pallisgaard N, Larsen TS, de Stricker K, Skov V, Hasselbalch HC. (2016) Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. PLoS One 11:e0165336
77. Cavalloni C, Rumi E, Ferretti VV, Pietra D, Roncoroni E, Bellini M, Ciboddo M, Casetti IC, Landini B, Fugazza E, Troletti D, Astori C, Cazzola M. (2017) Sequential evaluation of CALR mutant burden in patients with myeloproliferative neoplasms. Oncotarget 8:33416-33421
78. Oh Y, Song IC, Kim J, Kwon GC, Koo SH, Kim SY. (2018) Pyrosequencing-based quantitative measurement of CALR mutation allele burdens and their clinical implications in patients with myeloproliferative neoplasms. Clin Chim Acta 483:183-191
79. Anelli L, Zagaria A, Coccaro N, Tota G, Minervini A, Casieri P, Impera L, Minervini CF, Brunetti C, Ricco A, Orsini P, Cumbo C, Specchia G, Albano F. (2016) Droplet digital PCR assay for quantifying of CALR mutant allelic burden in myeloproliferative neoplasms. Ann Hematol 95:1559-1560
80. Li N, Yao QM, Gale RP, Li JL, Li LD, Zhao XS, Jiang H, Jiang Q, Jiang B, Shi HX, Chen SS, Liu KY, Huang XJ, Ruan GR. (2015) Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations. Leuk Res 39:510-514
81. Kuo MC, Lin TH, Sun CF, Lin TL, Wu JH, Wang PN, Huang YJ, Chang H, Huang TY, Shih LY. (2018) The clinical and prognostic relevance of driver mutations in 203 Taiwanese patients with primary myelofibrosis. J Clin Pathol 71:514-521

82. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 114:937-951

83. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T. (2007) Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood 110:840-846

84. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. (2007) The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. Br J Haematol 136:745-751

85. Chao MP, Gotlib J. (2014) Two faces of ET: CALR and JAK2. Blood 123:1438-1440

86. Lim KH, Chang YC, Gon-Shen Chen C, Lin HC, Wang WT, Chiang YH, Cheng HI, Su NW, Lin J, Chang YF, Chang MC, Hsieh RK, Kuo YY, Chou WC. (2015) Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. Blood Cancer J 5:e295

87. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, Girodon F, Alexandre JH, Mansier O, Viallard JF, Lippert E, Murati A, Mozziconacci MJ, Saussoy P, Vekemans MC, Knoops L, Pasquier F, Ribrag V, Solary E, Plo I, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W, Marzac C, Bluteau O. (2015) Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. Leukemia 29:249-252

88. Falchi L, Kantarjian HM, Verstovsek S. (2017) Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era. Leukemia 31:1845-1854

89. Torregrosa JM, Ferrer-Marin F, Lozano ML, Moreno MJ, Martinez C, Anton AI, Rivera J, Vicente V. (2016) Impaired leucocyte activation is underlining the lower thrombotic risk of essential thrombocythaemia patients with CALR mutations as compared with those with the JAK2 mutation. Br J Haematol 172:813-815
90. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. (2008) Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. Leukemia 22:1299-1307
91. Campbell PJ, Green AR. (2006) The myeloproliferative disorders. N Engl J Med 355:2452-2466
92. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC. (2008) Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow. Leukemia 22:194-195
93. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, Li CY, Wu W, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. (2007) Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. Cancer 109:2279-2284
94. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. (2006) JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 108:1652-1660
95. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. (2006) Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 107:4274-4281
96. Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, Patel N, Hu Y, Li S, Van Etten RA. (2006) Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. PLoS One 1:e18
97. Bumm TG, Elsea C, Corbin AS, Loriaux M, Sherbenou D, Wood L, Deininger J, Silver RT, Druker BJ, Deininger MW. (2006) Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. Cancer Res 66:11156-11165
98. Ha JS, Kim YK, Jung SI, Jung HR, Chung IS. (2012) Correlations between Janus kinase 2 V617F allele burdens and clinicohematologic parameters in myeloproliferative neoplasms. Ann Lab Med 32:385-391
99. Salati S, Prudente Z, Genovese E, Pennucci V, Rontauroli S, Bartalucci N, Mannarelli C, Ruberti S, Zini R, Rossi C, Bianchi E, Guglielmelli P, Tagliafico E,

Vannucchi AM, Manfredini R. (2017) Calreticulin affects hematopoietic stem/progenitor cell fate by impacting erythroid and megakaryocytic differentiation. Stem Cells Dev

XI. Saját publikációk jegyzéke

XII.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: 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. A driver és szubklonális mutációk szerepe a primer myelofibrózis patogenezisében. Magyar Onkológia. 2017, 61 :36-45.

XI.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.**

XII. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bödör Csabának, aki a jelen dolgozat alapjául szolgáló témát és kutatásokat vezette és koordinálta, akihez mindig tudtam kérdéssel vagy nehézségekkel fordulni.

Külön köszönet illeti Dr. Gángó Ambrust, akihez mind elméleti, mind technikai jellegű kérdéseimmel bármikor fordulhattam, azokat szinte azonnal, a legnagyobb körültekintéssel válaszolta meg.

Köszönettel tartozom a kutatások során nyújtott segítségért: Dr. Kajtár Bélának, és Dr. Vida Liviának a pécsi Patológia Intézetből, Dr. Reiniger Lillának és Dr. Krenács Tibornak és Boha Zsófia TDK hallgatónak, az 1. sz. Patológia Intézetből.

Dr. Rajnai Hajnalkának szeretném kifejezni külön köszönetemet a gyors és precíz bírálatért, amit házi bírálóként végzett. Munkájával a dolgozat szakmai színvonalát jelentősen emelte és építő kérdéseivel további megfontolandó pontokra mutatott rá.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak, hogy felvett a vezetése alatt álló intézetbe 2012-ben rezidensnek, és ennek köszönhetően egy inspiráló környezetben, kiváló munkahelyen dolgozhatok, olyan munkát végezhetek a haematopatológia területén, amire máshol nem volna lehetőségem.

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

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak: édesanyámnak, Proszonyák Idának, akitől a kitartó szorgalmas munka erényét tanulhattam meg, a férjemnek, Bencze Bálintnak, aki azokban az időszakokban, amikor írtam a disszertációt, addig nevelte és szórakoztatta a kisfiunkat, és emellett a háztartást is rábízhattam. Köszönet illeti a férjem édesanyját, Bencze Gáborné Évát és édesapját Dr. Bencze Gábort, akiknél mindig szerető, biztos karokban tudhattam a kisfiam, amíg a cikkekkel vagy a disszertációval foglalatoskodtam.