

# A driver és szubklonális mutációk szerepe a primer mielofibrózis patogenezisében

MÓZES RÉKA<sup>1,2</sup>, GÁNGÓ AMBRUS<sup>2</sup>, BOHA ZSÓFIA<sup>2</sup>, CSOMOR JUDIT<sup>1</sup>, BÖDÖR CSABA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet; <sup>2</sup>MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

## Levelezési cím:

Dr. Mózes Réka, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26.  
Tel.: 06/20-825-0277, e-mail: mozesreka@yahoo.com

## Közlésre érkezett:

2016. január 17.

## Elfogadva:

2016. április 13.

A primer mielofibrózis (PMF) klonális, a Philadelphia-kromoszóma-negatív mieloproliferatív neopláziák csoportjába tartozó, hemopoetikus őssejt eredetű megbetegedés. Diagnózisra csontvelői morfológián alapszik, amely mellett major diagnosztikus kritérium a driver mutációk: a *JAK2 V617F* pontmutáció, az *MPL* és kalretikulin (*CALR*) génmutációk egyikének megléte. A mielofibrózis progressziójában szubklonális mutációk jelentős szerepet játszanak, amelyek közül a leglényegesebbek az *ASXL1*, *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *SRSF2* és *TP53* mutációi. A progresszió folyamatos, azonban esetenként eltérő időbeli lefutást mutat. Klinikai adatoktól független rizikófaktornak bizonyult az úgynevezett „tripla-negatív” genotípus, a magas molekuláris rizikócsoport (HMR, high molecular risk) és a *CALR*-/*ASXL1*+ genotípus, amelyek közül a legutóbbi önmagában indikálja a csontvelő-transzplantációt a jelenleg legelfogadottabb, klinikai adatokon alapuló rizikócsoport-besorolástól, a DIPSS-Plus rizikócsoporttól függetlenül. *Magy Onkol* 61:36–45, 2017

**Kulcsszavak:** primer mielofibrózis, magas molekuláris rizikó, *CALR*-/*ASXL1*+ genotípus, driver mutációk, szubklonális mutációk

*Primary myelofibrosis (PMF) is a Philadelphia chromosome negative, clonal myeloproliferative neoplasm characterised by a progressive nature. Morphologically, the bone marrow biopsy shows features of abnormal proliferation of terminally differentiated megakaryocytes and subsequent bone marrow fibrosis. The molecular landscape of PMF includes phenotypic driver mutations (JAK2 V617F, CALR and MPL) which represent major diagnostic criteria, and subclonal mutations that also occur in several other myeloid diseases, but have a prognostic value in disease progression of MF. The most important subclonal mutations affect the genes ASXL1, TET2, IDH1/2, EZH2 and TP53. Triple negative genotype and the high molecular risk genotype and CALR-/ASXL1+ are associated with adverse survival with the latest indicating stem cell transplantation independently of the DIPSS-plus score.*

*Mózes R, Gángó A, Boha Z, Csomor J, Bödör C. The role of driver and subclonal mutations in pathogenesis of primary myelofibrosis. Magy Onkol 61:36–45, 2017*

**Keywords:** primary myelofibrosis, high molecular risk, *CALR*-/*ASXL1*+ genotype, driver mutations, subclonal mutations

## BEVEZETÉS

A primer mielofibrózis (PMF) jellegzetesen a 6–7. évtizedben jelentkező, krónikus, progresszív, hemopoetikus őssejt eredetű neoplasztikus betegség. Százezer emberre vetítve évente 0,5–1,5 új eset kerül felismerésre, 40 éves kor előtt ritkán, gyermekkorban egy-egy irodalmi ritkaságot leszámítva praktikusán nem fordul elő. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) klasszifikációja alapján a Philadelphia-kromoszóma-negatív „klasszikus” mieloid neopláziák csoportjába tartozik a policitémia rubra vera (PV) és az esszenciális trombocitémia (ET) mellett. A betegség progresszív lefolyású, sejtdús fázissal kezdődik, amelyet fibrotikus, sejtzegény fázis követ, következményes extramedulláris hemopoézissel (EMH). A halálozás oka blasztos transzformáció, citopéniák következtében kialakuló súlyos anémia, infekció, tromboembóliás vagy transzplantációs szövődmények. A betegség progressziója egyénenként eltérő, ennek hátterében genetikai és epigenetikai eltérések állhatnak. A prognózis becslésére és a következményes kezelési stratégia felállításához különböző nemzetközi prognosztikai pontrendszereket használnak (International prognostic scoring system – IPSS, Dynamic international prognostic scoring system – DIPSS, DIPSS-plus), amelyek viszonylag pontosan becslik meg a betegséglefordulást, azonban bizonyos, a közleményben később részletezésre kerülő genetikai tényezők befolyásolják a kimenetelt ezektől a pontrendszerektől függetlenül.

## MORFOLÓGIA

### Csontvelő

A csontvelő-biopszia esszenciális a primer mielofibrózis diagnózisának felállításához, szükséges a morfológiai véleményalkotáshoz, a cellularitás, a fibrózis mértéke, és CD34 immunhisztokémiai reakcióval kiegészítve a blasztarány megállapításához. A morfológiai megjelenés azonban nagyban függ attól, hogy a kezdeti sejtdús vagy a késői fibrotikus stádiumról van szó, a WHO a megújított, 2017-ben kiadott diagnosztikus kritériumait külön-külön adja meg a két stádiumra. A diagnosztikus kritériumok az 1. táblázatban találhatóak. A sejtdús fázisban (1.a ábra) kétvonalas: a granulocita- és megakariocitavonalakat érintő hiperplázia látható, az eritropoézis relatív háttérbe szorulása mellett. A megakariociták változatos méretűek, szoros „klasztereket” képeznek, atípusos paratrabekuláris lokalizációban is megjelenhetnek, morfológiájuk kifejezetten atípusos: abnormális sejtmag/citoplazma arány jellemzi őket, sejtmagjuk hiperkróm, szabálytalan, hiper- vagy hipolobulált (1.b ábra). A granulo- és eritropoézis a végső szakasztól eltekintve szignifikáns diszpláziát, balra toltságot nem mutat. A csontvelői fibrózis kialakulása komplex folyamat eredménye: első lépésként a neoplasztikus mieloid sejtek növekedési faktorokat termelnek (pl. TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF), majd a strómasejteket aktiválják. A folyamat során a retikuláris sejtek és a hemopoetikus őssejtek száma emelkedik,

mindezek mellett deprimálódik a CXCL12/CXCR4 tengely, amelynek az őssejtek letelepedésében kiemelt szerepe lenne, hozzájárulva ezzel az őssejtek keringésbe jutásához, majd az esetleges későbbi extramedulláris hemopoézishez. Az alapbetegség ugyan monoklonális, a rosttermelésért felelős mezenhimális sejtek poliklonális szaporulatot mutatnak (1). A fibrózis mértékét gradáljuk, az európai konszenzus ajánlása alapján négyfokozatú skálán adjuk

### 1. TÁBLÁZAT. A mielofibrózis diagnózisának WHO-kritériumai (32)

#### Prefibrotikus/korai primer mielofibrózis (pre PMF)

##### Major kritériumok

- 1) Atípusos megakariocita-proliferáció jelenléte retikulinfibrózis jelenléte nélkül >grade 1\*, az életkorra korrigált csontvelői cellularitás emelkedésével, granulopoetikus hiperpláziával és gyakran csökkent eritropoézissel
- 2) A BCR-ABL1+ CML, PV, ET, MDS vagy egyéb mieloid neopláziák WHO-kritériumainak nem felel meg
- 3) *JAK2*-, *CALR*- vagy *MPL*-mutációk egyikének jelenléte, ezek hiányában más klonális marker\*\* jelenléte. Klonális marker hiányában minor csontfibrózis reaktív okainak kizárása\*\*\*

##### Minor kritériumok

- a) Anémia
- b) Leukocitózis  $\geq 11$  G/l
- c) Tapintható szplenomegália
- d) Emelkedett LDH-szint

#### Manifeszt primer mielofibrózis

##### Major kritériumok

- 1) Atípusos megakariocita-proliferáció jelenléte retikulín- vagy kollagénfibrózis kíséretében [grade 2 vagy 3\*]
- 2) A BCR-ABL1+ CML, PV, ET, MDS vagy egyéb mieloid neopláziák WHO-kritériumainak nem felel meg
- 3) *JAK2*-, *CALR*- vagy *MPL*-mutációk egyikének jelenléte, ezek hiányában más klonális marker\*\* jelenléte. Klonális marker hiányában csontfibrózis reaktív okainak kizárása\*\*\*

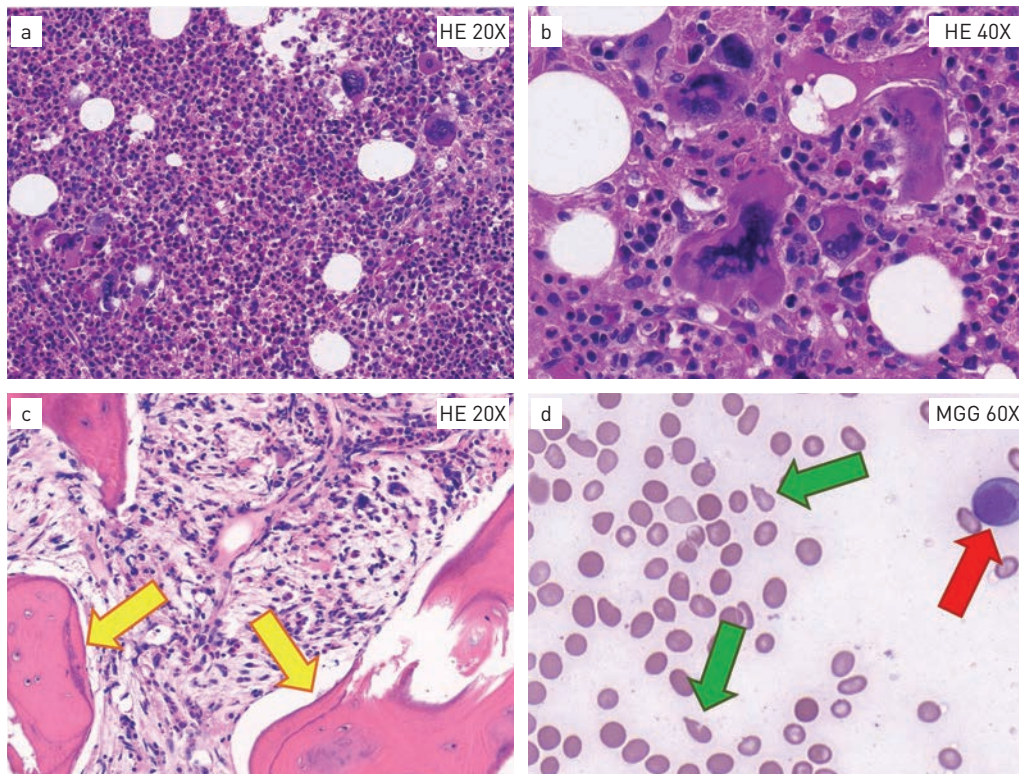
##### Minor kritériumok

- a) Anémia
- b) Leukocitózis  $\geq 11$  G/l
- c) Tapintható szplenomegália
- d) Emelkedett LDH-szint
- e) Leukoeritroblasztózis

\*Lásd a szemikvantitatív fibrózisbesorolást a 2. táblázatban.

\*\*A három major diagnosztikus kritériumként szereplő klonális mutációk hiányában a leggyakoribb kísérő szubklonális mutációk vizsgálata javasolt (ASXL1, EZH2, TET2, SRSF2, SF3B1) a betegség klonális természetének igazolására.

\*\*\*Reaktív csontfibrózis másodlagosan kialakulhat infekciókban, autoimmun kórképekben vagy más egyéb gyulladásozó állapotok hatására



**1. ÁBRA.** A mielofibrózis morfológiája. a) A sejtűs fázisban a jelentős granulopoetikus hiperplázia és az atípusos megakariociták láthatóak, az eritropoézis elemei viszonylagosan visszasorultak. b) Az atípusos megakariociták csoportja nagyobb nagyítással. c) Sejtszegény, fibrotikus fázis oszteoszklerózissal (sárga nyilak). d) Perifériás vér jellegzetes dakriocitákkal (zöld nyilak) és perifériás blaszttal (piros nyíl)

meg [2. táblázat]. A betegség előrehaladtával a fibrózis mértéke növekszik, a csontvelői szinuszok megnyílnak, a cellularitás csökken, a vérvépző elemeket a csontvelői fibrózis örvénylő sorokba rendezi [1. c ábra]. A szinuszokban vérvépző szigetek jelennek meg, utalva az extramedulláris vérvépzésre. Csontvelői aspirátum gyakran nem ürül, a betegség előrehaladtával a fibrózis miatt a csontvelő nem aspirálható (száraz punkció).

**2. TÁBLÁZAT.** A fibrózis mértékének megállapítása rostfestéssel [33]

Grade	
Grade 0	Foltos, egyenes, egymással nem kereszteződő retikulinoszt, normális
Grade 1	Laza retikulinhálózat fokális, főként perivaszkuláris interakcióval
Grade 2	Diffúz, egymással sűrűn kereszteződő retikulinhálózat fokális kollagénszaporulattal és/vagy oszteoszklerózissal
Grade 3	Diffúz, egymással sűrűn kereszteződő retikulinhálózat jelentős kollagénszaporulattal és/vagy oszteoszklerózissal

### Perifériás vér

A perifériás vérben a sejtűs fázisban észlelhető eltérések nem jellegzetesek, eleinte trombocitózis, esetleg igen enyhe granulocitózis észlelhető, azonban a fibrózis előrehaladtával leukoeritroblasztos vérvép látható, így a periférián blaszttok jelennek meg, amely mellett a vörösvértestek jellegzetesen könnycsepp alakúvá válnak [1. d ábra].

### GENETIKAI SAJÁTOSSÁGOK

#### Szomatikus driver mutációk

A mielofibrózisban szenvedő betegek 90%-ában megtalálható az esetek túlnyomó többségében egymást kölcsönösen kizáró *JAK2* V617F (55–60%), *MPL*- (6–7%), ill. *CALR*-mutációk (20–25%) valamelyike [2]. A mutációk valamelyikének megléte major diagnosztikus kritérium. A fennmaradó, körülbelül 10%-ot úgynevezett „tripla-negatív” genotípusnak hívjuk. A tripla-negatív csoport genetikai hátterében álló esetleges driver mutációk felfedezése várta magára.

A driver mutációk klinikai jelentősége a diagnosztikus értékükön túl abban áll, hogy a különböző mutációkat hordozó betegek kórlefolysa különbözik egymástól. A *CALR*-mutációval rendelkező betegek életkilátásai sokkal kedvezőbbek (17,7 év medián túlélés), összehasonlítva a *JAK2*- és *MPL*-mutációkkal, amelyek intermedier prognózisúnak számítanak

(9,2 és 9,1 év medián túléléssel) [3]. A legkedvezőtlenebb a tripla-negatív csoport túlélése mindössze 3,2 éves medián túléléssel [3, 4].

#### *JAK2 V617F mutáció*

A Janus kináz 2 (JAK2) a Janus kináz család tagja, amely egy non-receptor tirozinkináz. A JAK kinázok esszenciális szerepet töltenek be a citokin-jelátvitelben. JAK2 a család egyetlen tagja, amely az EPO-receptorral (EPOR) kapcsolódva részt vesz a szignáltranszdukcióban, emellett a TPO-receptorból (MPL) és a granulocita-kolóniastimuláló faktor receptorból (G-CSFR) érkező szignálokat is továbbítja. A 9-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő gén által kódolt JAK2 protein számos doménnel rendelkezik, melyek közül a JH1-es katalitikus és a JH2-es gátló pszeudokináz domén kiemelt jelentőségű. Vainchenker és munkatársai 2005-ben írták le a mutáció patogenetikai szerepét PV-ben [5]. A felfedezés forradalmi jelentőségűnek bizonyult, hiszen a JAK2 V617F mielofibrózisos betegek 55–60%-ában is megtalálható, ezzel a leggyakoribb driver mutáció, amely a gén 14-es exonját érinti, amely fehérjeszinten egy aminosavcsere okoz a 617-es pozícióban. A JAK2 V617F mutáció következtében a gátló hatású JH2-es domén funkciója kiesik, ezzel összességében funkciónyeres jön létre. A mutáció által keletkezett konstitutívan aktív JAK2 a citokinreceptorhoz kötődve kostimulálhat egyéb jelátviteli utakat is. A PV-ben leírt, a gén 12-es exonját érintő mutációnak sem PMF-ben, sem ET-ben nincs szerepe.

A JAK2 V617F mutáció alléltömegét (azaz a mutáns allél mennyiségét, ún. „mutant allele burden”) összefüggésbe hozták a mieloproliferatív betegség fenotípusával, magasabb alléltömeg jelenlétében PV kialakulása, míg alacsonyabb alléltömeg esetén ET vagy MF kialakulása valószínűbb, illetve szintén érdekes megfigyelés, hogy az alléltömeg összefüggést mutat a mielofibrózisos betegek lépnagyságával is [6]. Az alléltömegnek azonban diagnosztikus jelentősége is lehet, hiszen kvalitatív módszerrel az igen alacsony alléltömegben jelen lévő JAK2 V617 mutáció nem mutatható ki, a lelet ál-negatív lehet. Mivel a driver mutációk egymást kölcsönösen kizárják, így a beteg hamisan a tripla-negatív csoportba kerülhet. Ezt elkerülendő ma már lehetőség van a JAK2 V617F mutáció kvantitatív meghatározására is, amely valós-idejű PCR-rel történik, ahol a ciklusszámokból objektíven lehet következtetni a mutáns alléltömegre. A módszer érzékenysége (~0,1%) miatt a JAK2-inhibitorokkal történő célzott terápia esetén a minimális reziduális betegség kimutatására is lehetőséget nyújt [6, 7]. Intézetünkben a JAK2-mutáció mennyiségi kimutatására alkalmas módszer már elérhető.

#### *Trombopoetinreceptor (MPL)*

A trombopoetinreceptort az 1. kromoszóma rövid karján elhelyezkedő, 12 exonból álló mieloproliferatív leukémia vírus (MPL) onkogén kódolja. A trombopoetinreceptor egy olyan receptorfehérje, amely számos sejt, leginkább a megakariociták sejtosztódás-szabályozásában játszik szerepet,

fiziológiásan a trombopoetin-trombopoetinreceptor kötődés aktiválja, amely a JAK-STAT jelátviteli úton továbbítja a szignált. MPN-ben időrendben a másodikként, két független kutatócsoport által szinte egy időben, 2006-ban leírt [8, 9], az MPL-t érintő szomatikus driver mutációk túlnyomó többsége a gén 10-es exonját érinti, ezzel aminosavcsere létrehozva az 505-ös vagy 515-ös aminosav-pozíciókban. PMF-ben az MPL W515-ös aminosav-pozíció érintett, ahol az eredeti triptofán lizinre (MPL W515K), leucinre (MPL W515L), vagy ritkábban egyéb aminosavakra cserélődik ki. Az MPL S505N mutáció kizárólag ET-ben fordul elő. A képződött mutáns fehérje konstitutív JAK-STAT aktivációt eredményez, ami abnormális szerkezetű megakariociták megjelenéséhez vezet, majd később csontvelői fibrózist indukál.

#### *Kalretikulinmutáció*

A JAK2- és MPL-mutációt nem hordozó MPN-ekben írta le két munkacsoport 2013 decemberében a kalretikulin (CALR) gén mutációit [10, 11]. A 19-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő CALR gén által kódolt kalretikulin konzervált szerkezetű multifunkcionális fehérje, amely az endoplazmás retikulumban lokalizálódik, más sejtalkotórészekben is megtalálható, számos fiziológiás funkcióban részt vesz, többek között glikoproteinek feltekeredésében (folding), a Ca<sup>2+</sup>-homeosztázisban, a sejtproliferációban és az apoptózisban. A fehérje szerkezetiileg három doménből áll: N-terminális lektinkötő doménből, a prolingazdag P-doménből és a kalciumkötő helyeket és ER-retenciós szignált tartalmazó C-terminális doménből. A mieloproliferatív neopláziákban eddig leírt CALR-mutációk mindegyike a gén 9-es exonját kódoló, leolvasási kereteltolódást okozó deléció és/vagy inszerció. A mutáns fehérje egy rövidebb C-domént tartalmaz, amelyen az ER-retenciós szignál nem található meg, így kikerül az endoplazmás retikulumból a citoplazmába. A JAK2- és MPL-mutációkhoz hasonlóan a JAK-STAT jelátviteli út konstitutív aktiválásán keresztül vezet kontrollálatlan sejtproliferációhoz, egy friss tanulmány alapján a trombopoetinreceptoron keresztül hatva [12]. Az eredeti közleményekben leírt CALR-mutáció típusok száma mára a hatvanat is meghaladta és számuk egyre bővül. A leggyakrabban előforduló két mutáció az 52 bázispáros deléció (ún. 1-es típusú mutáció, c1092\_1143del, L367fs\*46) és az 5 bázispáros inszerció (ún. 2-es típusú mutáció, c1154\_1155insTTGTC, K385fs\*47). A CALR-mutációt hordozó betegek kórlefolyását meghatározza az általuk hordozott mutáció típusa. Az 1-es típusú mutációt hordozó betegek túlélése kedvezőbb, mint a 2-es típusú, vagy a JAK2 V617F mutációt hordozó eseteké [10,3 év, 3,1 év és 4 év a fenti sorrendben]. A ritkábban előforduló 2-es típusú mutáció esetén magasabb a betegek DIPSS-plus pontszáma, gyakoribb körükben az EZH2-mutáció és magasabb a periférián keringő blasztok száma, mint az 1-es típust hordozó betegek esetén [13]. A ritkán előforduló mutációk nagy része az általuk kódolt kalretikulin fehérje C-terminálisának szerkezete alapján 1-es vagy 2-es típus-szerű csoportba sorolható [14, 15]. Az 1-es

típusú/1-es típus-szerű mutációt hordozó betegek medián túlélése 13,7 év, míg a 2-es típusú/2-es típus-szerű mutációt hordozó eseteké 3,5 év, tehát a *CALR*-mutáció kedvező prognosztikus hatása csak az 1-es típusú/1-es típus-szerű mutációt hordozók esetében érvényesül [14].

### Szubklonális mutációk

A driver mutációk mellett az MF-es betegek kb. 20–30%-ában addicionális, nem a teljes tumorsejt-populációt érintő mutációk is létrejönnek, amelyek jelentősen befolyásolják a prognózist [4]. Ezek az úgynevezett fenotípus-módosító mutációk nem specifikusak az MF-re, még csak a mieloproliferatív neopláziákra sem, egyéb betegségekben is leírt patogén vagy betegségfolyást befolyásoló szerepük. A szubklonális mutációk a sejtfolyamatokat szabályozó gének széles skáláját érinthetik, a jelátviteltől indulva az epigenetikai regulációban részt vevő géneken át, a „spliceoszóma” (az RNS érésében szerepet játszó molekuláris komplexum) és a transzkripció szabályozás génjei is érintettek lehetnek. A 3. táblázat foglalja össze az MF-ben leírt jelentősebb géneket érintő mutációkat. A folyamatok egymáshoz való viszonyát és a főbb jelátviteli utakat a 2. ábra mutatja be.

#### A JAK-STAT jelátvitel egyéb érintett génjei

Két hasonló funkciót ellátó, a JAK-STAT jelátviteli útban részt vevő gén, az *SH2B3* (más néven LNK) és a *CBL* szubklonális érintettségét írták le mieloid neopláziákban [16, 17]. Mindkét gén által kódolt fehérje adapter funkciót lát el a receptorok és a jelút downstream elemei között annyi különbséggel, hogy míg az LNK csak a trombopoetinreceptor jeleit továbbítja a JAK-kinázok felé, a CBL a TPOR mellett az EPOR jeleit is továbbítja, amely mellett ubiquitin-ligázként is hatva koordinálja a jelátvitelt. Mindkét gént összefüggésbe hozták MPN-ek leukémiás transzformációjának esetleges emelkedett rizikójával.

#### Epigenetikai szabályozók mutációi

DNS-metiláció, DNS-metiltransferáz (DNMT) enzimek  
A DNS-metilációért három enzim felelős: a főként fenntartó funkciókat ellátó DNMT1 és a kettős funkciójú, részben fenntartó, részben *de novo* metilációt is végző DNMT3a és DNMT3b enzimek. A metiltransferázok révén a DNS-metiláció citozinbázisok 5. szénatomján jön létre CpG dinukleotidokon, 5-metil-citozint (5mC) hozva létre ezzel. A létrejövő 5mC a kromatin adott szakaszának represszióját, csendesítését okozza. Mieloid neopláziákban a *DNMT3A* gén mutációit írták le, elsőként AML-ben, majd hamarosan bizonyossá vált, hogy érintettsége rossz prognosztikus jel [16]. MF-es betegek körülbelül 10%-ában írták le, PV-ben és ET-ben alacsonyabb arányban van jelen (7% és 3%) a mutáció. A *DNMT3A*-mutációk jelenléte összefüggést mutat a leukémiás transzformációval, továbbá a betegek gyakran további szubklonális mutációkat is hordoznak az *IDH1/2*, *TET2* vagy *ASXL1* géneken.

DNS-hidroxi-metiláció, TET enzimek

Az eredetileg stabilnak gondolt DNS-metiláció mellett egy másik mechanizmust is felismertek a Ten-Eleven-Translocation (TET) enzimek felfedezésével. Mindegyik TET enzim (TET1-3)  $\alpha$ -ketoglutarát és  $Fe^{2+}$ -függő dioxigenáz enzim, amelyek az 5mC oxidációját katalizálva szekvenciálisan 5-hidroximetil-citozint (5hmC), 5-formilmetil-citozint (5fC) és 5-karboxi-citozint (5caC) hoznak létre. A létrejövő származékok aktív résztvevői a transzkripció szabályozásnak, az 5mC mellett kromatinregulátorok, többek között a Polycomb Repressive Complexhez (PRC) való kötődés és modulálás révén. Mieloid neopláziákban patogén szerepe csupán a *TET2* mutációinak van, a mutáció nem PMF-specifikus, leírták akut mieloid leukémiában (AML), krónikus mielomonociter leukémiában (CMML), mielodiszpláziás szindrómákban (MDS) is [16]. Ortmann és munkatársai egy 2015-ös tanulmányban a *TET2* és a *JAK2* gének mutációinak sorrendjét vizsgálták MPN-ekben [18]. Arra a megállapításra jutottak, hogy a két gén mutációjának sorrendje befolyásolja a mieloproliferatív betegség fenotípusát és kimenetelét, mivel a *TET2* a DNS metiláltsági fokát befolyásolhatja, ezért a transzkripció is megváltozhat. Azok a betegek, akiknél a *JAK2*-mutáció megelőzte a *TET2*-mutációt, fiatalabbak voltak, gyakrabban fordultak elő tromboembóliás szövődmények, magasabb volt a *JAK2*V617F alléltömege, és ezeknél a betegeknél PV magasabb gyakorisággal fordult elő, mint ET vagy MF. Ezzel szemben azok a betegek, akiknél a *TET2*-mutáció alakult ki hamarabb, idősebbek voltak, kisebb *JAK2*-mutációs alléltömeget, és kisebb volt a PV-s betegek aránya, az ET és a MF volt gyakoribb. Lundberg és munkatársai által közölt adatok szerint MF-ben a *TET2*-mutáció rossz prognosztikus jelnek és a leukémiás transzformáció egyik előfutárának tekinthető [19]. Érdekesség, hogy a *TET2*-mutáció idősebb egyénekben mieloid betegség nélkül is előfordulhat [17].

IDH1 és -2 enzimek, kapocs az epigenetika és a metabolizmus között

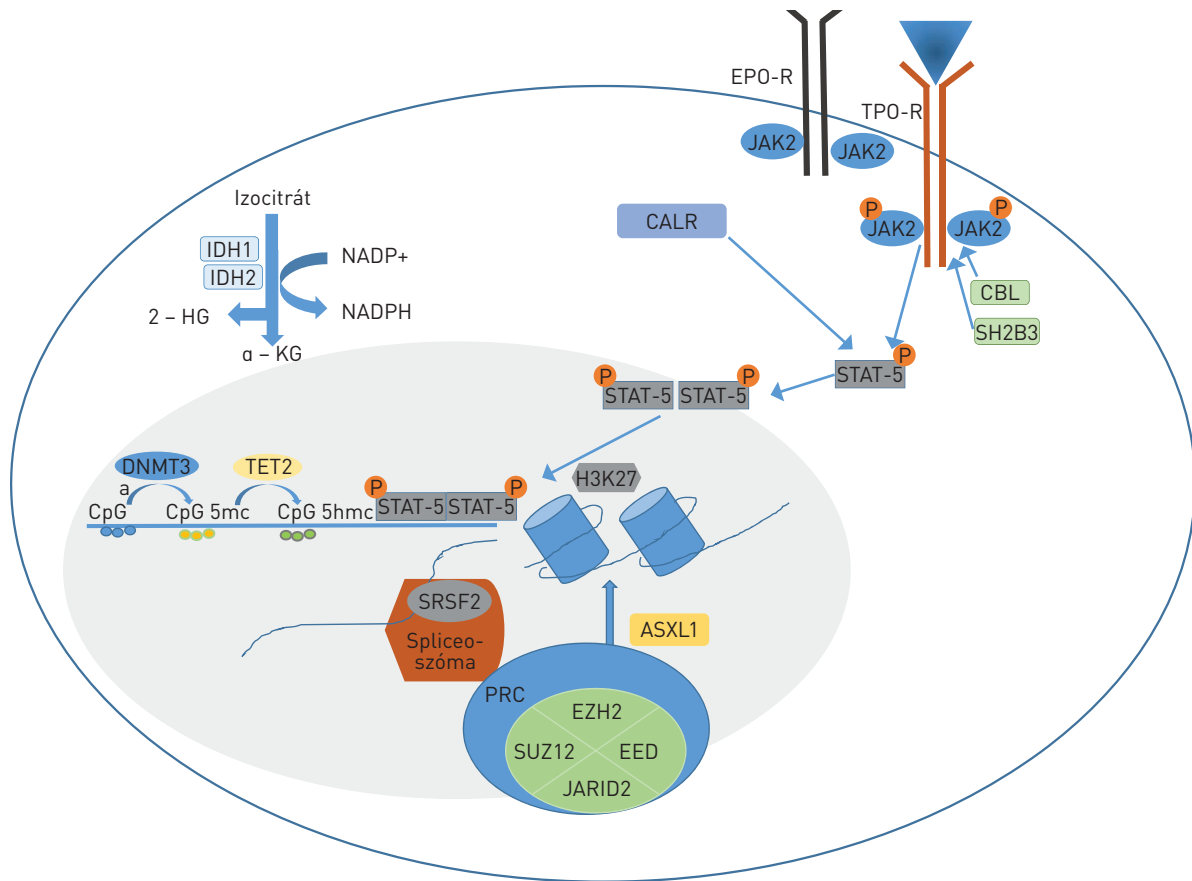
Az izocitrát-dehidrogenáz 1 és 2 (IDH1/2) enzimek az izocitrát –  $\alpha$ -ketoglutarát átalakulást katalizálják [16]. A két enzim leggyakoribb mutációi (*IDH1*R132 és *IDH2*R140, R172) következtében az enzimaktivitás megváltozásával egy aberráns onkometabolit, a 2-hidroxi-glutarát (2-HG) szaporodik fel a citoplazmában, amely az  $\alpha$ -KG strukturális analógja, így az  $\alpha$ -KG és  $Fe^{2+}$ -függő demetilázok funkcióját gátolják. Az *IDH*-mutációk alacsony arányban MF-ben primeren is előfordulhatnak, de blasztos transzformációban szerepük jelentős lehet [19, 20]. A *TET*- és az *IDH1/2* mutációk egymást kölcsönösen kizárják [21].

Hisztionmodifikációk

A különböző típusú hisztionmodifikációk a poszttranszlációs módosulások egyik jelentős csoportját képezik, amelyeknek a kromatinszerkezet dinamikus szabályozásán keresztül kulcsszerepük van a génexpresszió szabályozásában. A hisz-

**3. TÁBLÁZAT.** A mielofibrózis patogenezisében részt vevő driver és szubklonális mutációk

Szimbólum	Gén neve	Lokalizáció	Exon	Funkció	MF-gyakoriság	Transzformációs gyakoriság
<b>Driver mutációk</b>						
<i>JAK2</i>	Janus-kináz 2	9q24	14-es exon		55-60%	
<i>CALR</i>	Kalretikulin	19p13.2	9-es exon		25%	
<i>MPL</i>	Mieloproliferatív leukémiavírus onkogén	1q34	10-es exon		6-7%	
<b>Szubklonális mutációk</b>						
<b>Szignáltranszdukció</b>						
<i>SH2B3</i>	SH2B adaptor protein 3	12q24.12	2-es exon		<1%	10%
<i>CBL</i>	Casitas B cell lymphoma	11q23.3	8/9-es exon	E3 ubikvitin-ligáz	4%	<1%
<b>Epigenetika</b>						
<b>DNS-modifikáció</b>						
<i>TET-2</i>	Ten-eleven Translocation-2	4q24	bármelyik exon érintett lehet	DNS-demetiláció	17%	17%
<i>DNMT3a</i>	DNS citozín-metil-transzferáz	2p23		DNS-metiláció	7%	
<b>Metabolizmus</b>						
<i>IDH1</i>	Izocitrát-dehidrogenáz 1	2q33.3	4-es exon	izocitrát-aKG konverzió	4%	22%
<i>IDH2</i>	Izocitrát-dehidrogenáz 2	15q26.1		izocitrát-aKG konverzió		
<b>Hisztionmodifikáció</b>						
<i>EZH2</i>	Enhancer of Zeste 2	7q36.1	számtalan exon érintett lehet	H3K27-trimetiláció	7%	
<i>ASXL1</i>	Additional sex-combs-like 1	20q11.1	12-es exon	epigenetikai szabályozás	13%	18%
<b>RNS-splicing</b>						
<i>SRSF2</i>	Szerin/arginin gazdag splicing faktor2	17q25.1	2-es exon	RNS-érés	17%	
<i>SF3B1</i>	Splicing faktor 3B alegység	2q33.1	14/15-ös exon	RNS-érés	7%	
<b>Transzkripciós szabályozás</b>						
<i>TP53</i>	Tumorprotein P53	17p25.1	4-9-es exon	sejtciklust szabályozó tumorszuppresszor	4%	17%
<i>IKZF1</i>	IKAROS family zinc finger 2	7p12	általában intragéni-kus deléción	transzkripciós szabályozó faktor	<1%	19%



2. ÁBRA. A mielofibrózis patogenezisében és progressziójában szerepet játszó legfontosabb folyamatok egymáshoz való viszonya

tonmodifikációk mechanizmusainak tárgyalása meghaladja a közlemény terjedelmét, azonban a PMF progressziójában jelentős szerepet játszó *EZH2*- és *ASXL1*-mutációk részletezésre kerülnek az alábbiakban.

***EZH2*:** A később részletezésre kerülő magas molekuláris rizikó génjei közül az egyik tag. Az Enhancer of Zeste homolog 2 (*EZH2*) az *EZH1*-gyel, az *EED*-vel, és a *SUZ12*-vel együtt a Polycomb Repressive Complex 2 (*PRC2*) törzsét alkotják. Az *EZH2* a komplex enzimatis tagjaként *H3K27* hiszton-metiltransferáz-aktivitással rendelkezik, normális funkciója esetén a metiláció folyamatos fenntartásával az érintett génszakasz represszált állapotba kerül. Hematológiai betegségekben az *EZH2* a polycomb csoport leggyakrabban érintett tagja, mutációja rossz prognosztikus értékkel bír [22, 23]. Nemcsak mieloid betegségekben (*CMML*, *MDS* és *MPN*), hanem B-sejtes limfómákban és szolid tumorokban is leírták patogenetikai szerepét [24]. A komplex más törzstagjainak jelentősége csekély mieloid betegségekben [25].

***ASXL1*:** Az additional sex comb like1 (*ASXL1*) gén által kódolt *ASXL1* fehérje koaktivátorként szintén a *PRC2* tagja, normális funkciója a kromatinállomány metilációs szabályozása. Funkcióvesztő mutációja a *PRC2* komplex *H3K27*-metiláció globális csökkenésén és a transzkripció egyensúly elvesztésén keresztül fejt ki hatását [16]. Tefferi és munkatársai 2014-ben megjelent közleményükben azt az 570 MF-es betegen vizsgált megfigyelésüket írták le, amely szerint a *CALR*-mutációt és az *ASXL1*-mutációt együtt vizsgálva egy *DIPSS*-plusz-független besorolást kaptak [26]. Két centrum betegei közül az egyiket (Mayo klinika) vizsgálati mintaként, a másik centrum betegeit (Firenze) validációs kohorszként használva a két mutáció jelenléte és/vagy hiánya alapján a betegeket négy csoportra osztották: *CALR*+/*ASXL1*-, *CALR*+/*ASXL1*+, *CALR*-/*ASXL1*- és *CALR*-/*ASXL1*+, majd összevetették a klinikai információkkal. A túlélés, a komplikációk és klinikai paraméterek alapján három csoport különült el élesen egymástól; a kettős pozitív és a kettős negatív csoportok nagyon hasonló túlélést mutattak, azokat összevonták. A *CALR*-/*ASXL1*+ csoport szig-

**4. TÁBLÁZAT.** A *CALR* és *ASXL1* gének túlélésben játszott szerepe (medián túlélési adatok)

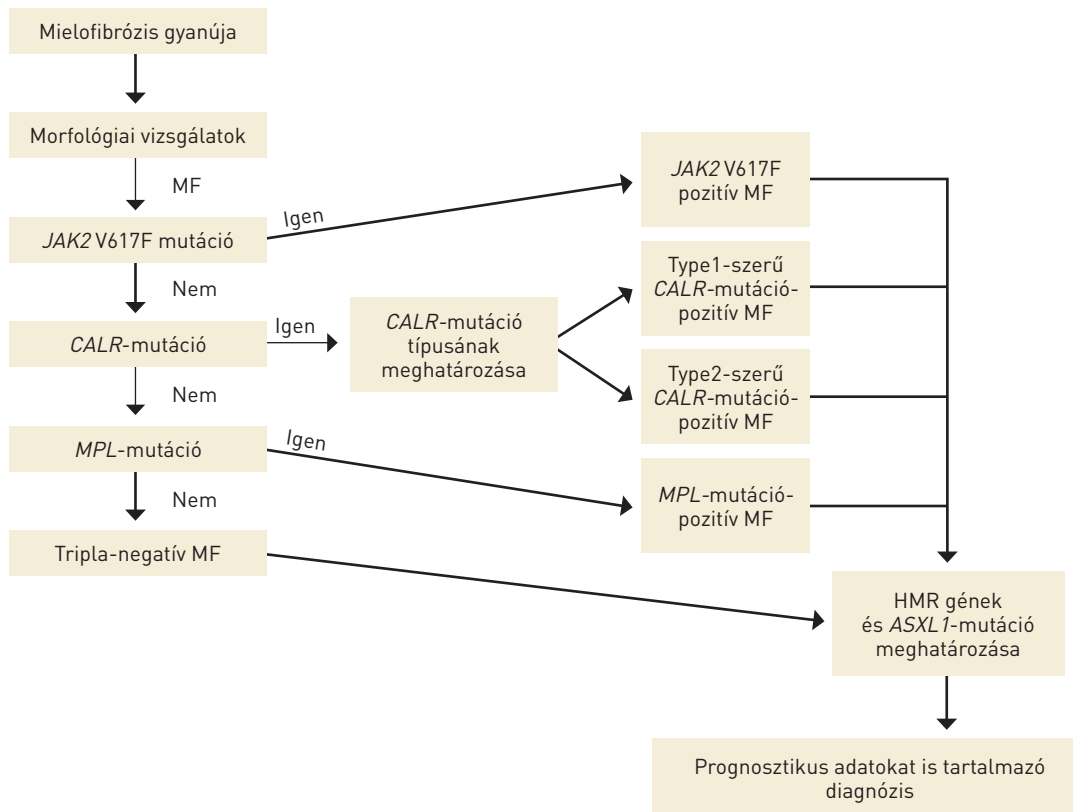
	<i>CALR</i> -/ <i>ASXL1</i> +	<i>CALR</i> +/ <i>ASXL1</i> +, <i>CALR</i> -/ <i>ASXL1</i> -	<i>CALR</i> +/ <i>ASXL1</i> -
Összes beteg (Mayo)	2,3 év	5,8 év	10,4 év
DIPSS-plus alacsony-intermedier1	4 év	9 év	20 év
DIPSS-plus intermedier2-magas	2,3 év	4,1 év	4,8 év
Összes beteg (Firenze)	3,9 év	11,5 év	>20 év

nifikánsan magasabb keringő blasztaránnyal, leukémiás transzformációs rátával és halálozási aránnyal rendelkezett, illetve magasabb volt a későbbiekben részletezésre kerülő spliceoszómát érintő mutációk aránya is, következésképp a túlélés is szignifikánsan rövidebb volt (medián 2,3 év) a kettős pozitív vagy kettős negatív csoporthoz (medián 5,8 év) és a *CALR*+/*ASXL1*- csoporthoz képest (medián 10,4 év).

A túlélési görbék elemzését DIPSS-plus rizikócsoportokra bontva is élesen szétváltak a csoportok az alacsony, vagy intermedier-1 csoportba sorolt betegekénél is, a *CALR*-/*ASXL1*+ genotípusú betegek medián túlélése szignifikánsan rövidebb volt (medián 4 év) a másik két csoporthoz (medián 9 és 20 év) képest. A tanulmányban szereplő medián túlélési adatokat a 4. táblázat foglalja össze. Tefferi és munkatársai egy későbbi közleményükben a *CALR*-/*ASXL1*+ genotípust a túlélés legszignifikánsabb befolyásoló faktoraként említi, és felveti az őssejt-transzplantáció szükségességét függetlenül a DIPSS-plus rizikócsoporttól, tehát akár alacsony DIPSS-plus rizikóbesorolás esetén is [27].

*A spliceoszóma mutációi*

Az RNS splicing-ot érintő mutációk szerepe MDS-ben ismert, MPN-ekben alacsony arányban fordul elő a spliceoszóma egymást kölcsönösen kizáró mutációjának valamelyike. A *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3A1* gének mutációi közül az *SF3B1* mutációi a leggyakoribbak, PMF-ben 4–6%-ban fordulnak elő, azonban nem mutatnak összefüggést kedvezőtlen kimenetellel. Az *SRSF2* mutációi magas arányban fordulnak elő poszt-MF AML-ben (18,9%). A transzformációt megelőző és



**3. ÁBRA.** Javasolt diagnosztikus algoritmus MF-ben. HMR gének: *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2* és *SRSF2*



azt követő mintapárok vizsgálata kimutatta az összefüggést az *SRSF2* gén mutációja és a leukémiás transzformáció között (28). Az *U2AF1* és *ZRSR2* mutációi kifejezetten alacsony arányban fordulnak elő MPN-ekben (<2%) (17).

### Egyéb, a leukémiás progresszióban részt vevő mutációk

A transzkripciós faktorok a génexpresszió szabályozásának fontos elemei, néhányuk mutációit megfigyelték MPN-ekben, melyek inkább a progresszióban, mintsem a patogenezisben játszanak szerepet. Az *IKZF1*, az *ETV6* és a *FOXP1* transzkripciós faktorok szerepét írták le a progresszióban (29).

### TP53

A 17-es kromoszóma rövid karján elhelyezkedő „genom őrének” mutációi MPN-ek esetén főként a progresszióval hozhatók összefüggésbe (19). A *TP53* mutációja heterozigóta formában már a blasztos fázis előtt megjelenhet, ekkor a klonális expanzióval nem mutat összefüggést (19). A heterozigótáság elvesztésével azonban a leukémiás transzformáció hamar megjelenik, ezért a *TP53*-mutációt hordozó betegek magas rizikójú betegeknek tekinthetők. A *TP53*-mutáció bizonyos esetekben csak alacsony allélfrekvenciával van jelen, ezért kimutatása hagyományos eljárással nehézségekbe ütközik, detektálásához érzékeny módszer, például újgenerációs szekvenálás szükséges (29).

### Magas molekuláris rizikó

Az előzetesen részletezésre került, szubklonális mutációkat hordozó gének közül öt kiemelt jelentőséggel bír (30): az *ASXL1*, az *EZH2*, az *SRSF2*, az *IDH1* és -2. Hasonlóan a *CALR/ASXL1* vizsgálathoz (26) egy tesz- (Firenze) és egy validációs kohort (Mayo klinika) túlélési adatait vizsgálták klinikai adatok és az öt gén mutációs státuszának tükrében (30). Arra a megállapításra jutottak, hogy ha az említett öt gén közül bármelyikben mutáció található, az szignifikánsan rontja mind a teljes, mind pedig a leukémiamentes túlélést, ezért nevezték el a csoportot magas molekuláris rizikójú csoportnak („high molecular risk”, HMR). Azon betegeket, akikben több génben is találtak mutációt, nagyon magas molekuláris rizikójú csoportnak („very high molecular risk”, VHMR), akikben a gének vad típusa fordul elő, alacsony molekuláris rizikójú csoportnak nevezték el („low molecular risk”, LMR).

### Kariotípus-vizsgálatok jelentősége MF-ben

A citogenetikai vizsgálatokat mieloproliferatív betegségeknél két kiténtetett alkalommal szoktuk elvégezni rutinszerűen: a diagnózis felállításakor, hiszen a Philadelphia-kromoszóma hiánya fő kritérium, illetve a betegség progressziója esetén. A +8, -7/7q, i(17q), inv(3), -5/5q-, -12p, a 13q del, a 20q del vagy 11q23 átrendeződés fordulnak elő MF-ben. A kariotipizálás a klonalitás bizonyításán túl prognosztikus értéket is adhat a diagnózishoz, hiszen az eltérések közül a 13q deléciója a leggyakoribb, és önmagában is rossz prognosztikus jel.

Gyakoriságban a 20q-deléció követi, ami azonban nem hordoz prognosztikus értéket. A komplex kariotípuseltérések kedvezőtlen kimenetelt jelentenek (27).

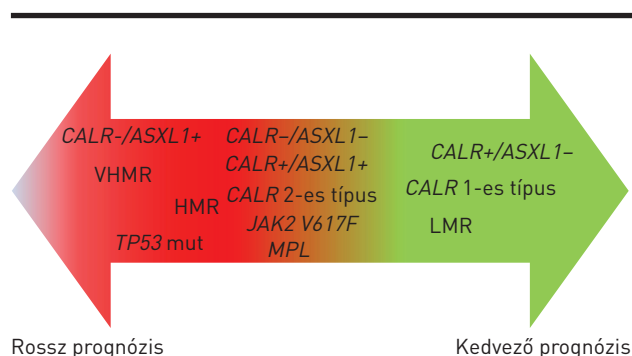
### ÖSSZEFOGLALÁS

Mit tehet a diagnosztika a betegek érdekében?

A mielofibrózis egy progresszív krónikus mieloproliferatív betegség, amelynek létrejöttében driver és szubklonális mutációknak egyaránt szerepe van. Az egyénekenként eltérő kórlefolásban a heterogén genetikai háttérnek is lehet szerepe a betegek klinikai állapotán túl.

Mivel MF-ben a driver mutációk egy-egy irodalmi ritkáságtól eltekintve egymást kizárják, vizsgálatukat célszerű egymást követően, a gyakoriságnak megfelelően végezni (szekvenciális algoritmus, 3. ábra). A három, fentebb részletezett driver mutációnak szerepe van a prognosztikában is, hiszen az 1-es típusú-szerű *CALR*-mutációval rendelkező MF-es betegek prognózisa sokkal jobb a 2-es típusú-szerű *CALR*-mutációval, és az egyéb driver mutációval (*JAK2* és *MPL*) rendelkezőkhöz képest. Az úgynevezett tripla-negatív genotípusú, azaz egyik driver mutációt sem hordozó betegek túlélése alulmarad bármely driver mutációval rendelkezővel szemben, így a driver mutációk vizsgálata fontos.

A driver mutációk vizsgálatán túl a szubklonális mutációk közül a HMR csoport génjei (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1* és -2) kiemelt jelentőségűek. A felsorolt gének bármelyikének mutációja a vad típusú gént hordozó betegeknél sokkal rosszabb prognózisú betegséggel jár. A HMR-gének többszörös mutációi tovább rontják a prognózist, a betegek ruxolitininre adott válasza is csekélyebb (31). A DIPSS-plusz rizikócsoporttól függetlenül a *CALR-/ASXL1+* genotípus önmagában is kifejezetten rossz prognózist jelent [egy tanulmányban csontvelő-transzplantációt javasolnak még akár kedvező DIPSS-plusz rizikóbesorolás esetén is *CALR-/ASXL1+* esetben (31)]. Ezzel szemben a *CALR+/ASXL1-* genotípus kifejezetten kedvező lefolyást sejtet (26). Az előbb említett



4. ÁBRA. A mutációs profil hatása a prognózisra mielofibrózisban. HMR: magas molekuláris rizikó („high molecular risk”), LMR: alacsony molekuláris rizikó („low molecular risk”) VHMR: nagyon magas molekuláris rizikó („very high molecular risk”)

géneken túl a *TP53*-nak szintén nagy jelentősége van, mert igen alacsony alléltömegben is a leukémiás transzformációban jelentős szerepet játszik. A 4. ábra sematikus összefoglalja a betegek prognózisát az egyes mutációk jelenlétében.

Intézetünkben mindegyik mutáció vizsgálata a diagnosztikus algoritmus részét képezi. A rutinvizsgálatok jelenleg a morfológiai és a driver mutációk szekvenciális (*JAK2*, *CALR* és *MPL*) vizsgálatát tartalmazzák. A *TP53*-mutációk, valamint a HMR-csoport génjeinek (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1* és *IDH2*) vizsgálatára egy újgenerációs szekvenálás (NGS) alapú, érzékeny és nagy áteresztőképességű vizsgálati eljárást dolgoztunk ki.

## IRODALOM

1. Bedekovics J, Méhes G. Pathomechanism and clinical impact of myelofibrosis in neoplastic diseases of the bone marrow. *Orv Hetil* 155:367–375, 2014
2. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative neoplasms: a contemporary review. *JAMA Oncol* 1:97–105, 2015
3. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis. *Blood* 124:1062–1069, 2014
4. Guglielmelli P, Rotuno G, Pacilli A, Vanucchi AM. What do molecular tests add to prognostic stratification in MF: Is it time to add these to our clinical practice? *Curr Hematol Malig Rep* 10:380–387, 2015
5. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434:1144–1148, 2005
6. Deininger M, Radich J, Burn TC, et al. The effect of long-term ruxolitinib treatment on *JAK2p.V617F* allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 126:1551–1554, 2015
7. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbach HC, et al. 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, 2007
8. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3:e270, 2006
9. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108:3472–3476, 2006
10. Klampfl T, Glissinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369:2379–2390, 2013
11. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 369:2391–2405, 2013
12. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in *CALR*-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 127:1307–1316, 2016
13. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 28:1568–1570, 2014
14. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like *CALR* variants. *Blood* 124:2465–2466, 2014
15. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in *CALR*-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 30:431–438, 2016
16. Fong CY, Morison J, Dawson MA. Epigenetics in the hematologic malignancies. *Haematologica* 99:1772–1783, 2014
17. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014:287–296, 2014
18. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 372:601–612, 2015
19. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123:2220–2228, 2014
20. Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol* 97:183–197, 2013
21. Hobbs GS, Rampal RK. Clinical and molecular genetic characterization of myelofibrosis. *Curr Opin Hematol* 22:177–183, 2015
22. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42:665–667, 2010
23. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat Genet* 42:722–726, 2010
24. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering *EZH2* (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42:181–185, 2010
25. Score J, Hilgado-Curtis C, Jones AV, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 119:1208–1213, 2012
26. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. *CALR* and *ASXL1* mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 28:1494–1500, 2014
27. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 89:915–925, 2014
28. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, et al. *SRSF2* mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with *IDH* mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 120:4168–4171, 2012
29. Them NC, Kralovics R. Genetic basis of MPN: Beyond *JAK2-V617F*. *Curr Hematol Malig Rep* 8:299–306, 2013
30. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotuno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 28:1804–1810, 2014
31. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. *Blood* 123:2157–2160, 2014
32. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. IRAC Press, Lyon 2017
33. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European Consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 90:1128–1132, 2005