



Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Lekarski II

Mgr Marzena Wojtaszewska

**Charakterystyka defektów molekularnych u chorych na nowotwory
mieloproliferacyjne Filadelfia-ujemne**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
przygotowana w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

Poznań 2015

*Panu Profesorowi Krzysztofowi Lewandowskiemu
składam serdeczne podziękowania za udzielone wsparcie,
opiekę naukową oraz nieocenioną pomoc merytoryczną.*

*Panu Profesorowi Mieczysławowi Komarnickiemu
dziękuję za umożliwienie mi przeprowadzenia badań w
Klinice i Katedrze Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.*

*Pracownikom Laboratorium Diagnostyki
Hematologicznej dziękuję za życzliwość i pomoc podczas
redagowania niniejszej dysertacji.*

*Pracę dedykuję Rodzinie w podziękowaniu za
wrozumiałość i nieskończone pokłady cierpliwości.*

Część badań, dotycząca obecności mutacji genu kalretikuliny została sfinansowana w ramach grantu dla młodych naukowców nr 502-14-02224361-41074 "*Analiza częstości występowania oraz obciążenia nieprawidłowym allelem genu CALR u chorych na nowotwory mieloproliferacyjne Philadelphia i JAK2-ujemne*", przyznanego przez Wydział Lekarski II Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	1
WSTĘP.....	3
1.1 Wprowadzenie.....	4
1.2 Rys historyczny	4
1.3 Charakterystyka kliniczna nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych.....	7
1.3.1 Czerwieńca prawdziwa	9
1.3.2 Nadpłytkowość samoistna.....	9
1.3.3 Pierwotne zwłóknienie szpiku.....	10
1.4 Szlak sygnalizacyjny JAK-STAT jako element regulatorowy hematopojezy	11
1.5 Molekularne podłoże MPN Ph-	14
1.5.1 Gen <i>JAK2</i>	16
1.5.1.1 Mutacja V617F genu <i>JAK2</i>	16
1.5.1.2 Mutacje <i>JAK2</i> w obrębie egzonu 12	17
1.5.1.3 Mutacje genu <i>JAK2</i> w obrębie egzonów 13-15.....	18
1.5.2 Gen <i>CALR</i>	18
1.5.2.1 Mutacje <i>CALR</i> egzonu 9	20
1.5.3 Gen <i>MPL</i>	21
1.5.3.1 Mutacje genu <i>MPL</i>	22
1.5.4 Geny modyfikujące fenotyp MPN Ph-	22
CELE PRACY.....	23
MATERIAŁ I METODY	25
3.1. Charakterystyka grupy badanej.....	26
3.1.1 Analizowane parametry kliniczno-laboratoryjne	26
3.2. Metody.....	27
3.2.1 Izolacja komórek jądrzastych krwi obwodowej.....	27
3.2.2 Ekstrakcja całkowitego DNA oraz RNA	27
3.2.3 Ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych kwasów nukleinowych.....	27
3.2.4 Odwrotna transkrypcja oraz ocena obecności onkogenu <i>BCR-ABL</i> metodą RT-PCR	28
3.2.5 Wykrywanie obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i> metodą jakościową ARMS-PCR ...	29
3.2.6 Ilościowa ocena obciążenia allelem V617F genu <i>JAK2</i> z użyciem AS RQ-PCR.....	31

3.2.7 Wykrywanie obecności mutacji <i>JAK2</i> w obrębie egzonu 12 metodą wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia	33
3.2.8 Wykrywanie obecności innych niż V617F zmian sekwencji nukleotydowej w obrębie egzonu 14 genu <i>JAK2</i> metodą HRMA	35
3.2.9 Analiza obecności mutacji w obrębie egzonu 10 genu <i>MPL</i> metodą HRMA.....	36
3.2.10 Wykrywanie obecności mutacji genu <i>CALR</i> w obrębie egzonu 9 metodą HRMA	37
3.2.11 Półilościowa ocena obciążenia nieprawidłowym allelem <i>CALR</i> egzonu 9 metodą elektroforezy kapilarnej.....	38
3.2.12 Charakterystyka rodzaju mutacji genów <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> oraz <i>MPL</i> metodą sekwencjonowania sangerowskiego.....	39
3.2.13 Interpretacja wyników badań molekularnych	40
3.3 Odczynniki i aparatura badawcza	41
3.3.1 Wykaz użytych odczynników.....	41
3.3.2 Wykorzystywana aparatura	42
3.3.3 Bufory sporządzone samodzielnie.....	42
3.3.4 Materiały referencyjne i standardy molekularne	43
3.4 Analiza statystyczna wyników	44
WYNIKI	45
4.1. Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna grupy badanej.....	46
4.2. Analiza obecności mutacji i obciążenia nieprawidłowym allelem.....	47
4.2.1 Jakościowa i ilościowa ocena mutacji <i>JAK2</i> V617F	48
4.2.1.1 Optymalizacja jakościowych i ilościowych oznaczeń molekularnych.....	48
4.2.1.2 Międzynarodowa standaryzacja oceny obciążenia allelem <i>JAK2</i> V617F.....	49
4.2.2 Jakościowa ocena obecności mutacji genu <i>JAK2</i> w obrębie egzonów 12 oraz 14	50
4.2.3 Jakościowa i ilościowa ocena mutacji genu <i>CALR</i>	51
4.2.4 Jakościowa ocena obecności mutacji genu <i>MPL</i>	51
4.3 Związek obecności mutacji z wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi.....	51
4.3.1 Częstość występowania mutacji genów <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> i <i>MPL</i> w poszczególnych typach MPN	51
4.3.2 Analiza obciążenia nieprawidłowym allelem V617F genu <i>JAK2</i> oraz mutacjami <i>CALR</i> w poszczególnych MPN Ph-.....	52
4.3.3 Zależność pomiędzy wybranymi parametrami klinicznymi a obecnością mutacji genów <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> i <i>MPL</i> oraz obciążeniem nieprawidłowym allelem genów <i>CALR</i> i <i>JAK2</i> u chorych na MPN Ph-	54

4.3.4 Związek pomiędzy obecnością mutacji genów <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>MPL</i> a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na poszczególne nowotwory mieloproliferacyjne	58
4.3.4.1 Czerwienica prawdziwa	58
4.3.4.2 Nadpłytkowość samoistna	59
4.3.4.3 Pierwotne zwłóknienie szpiku	60
DYSKUSJA.....	62
WNIOSKI.....	73
STRESZCZENIE.....	75
SUMMARY.....	78
SPIS TABEL I RYCIN	81
9.1. Spis tabel.....	82
9.2 Spis rycin	84
PIŚMIENNICTWO.....	85

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

A230 – absorbancja przy długości fali równej 230nm

A260 – absorbancja przy długości fali równej 260nm

A280 – absorbancja przy długości fali równej 280nm

a-CML - atypowa przewlekła białaczka szpikowa (ang. *atypical Chronic Myeloid Leukemia*)

ARMS-PCR –system PCR do detekcji mutacji oparty o oporność na amplifikację (ang. *Amplification Refractory Mutation System PCR*)

ASH- Amerykańskie Stowarzyszenie Hematologów

AS RQ-PCR – allelospecyficzny ilościowy PCR (ang. *Allele Specific Real-time Quantitative PCR*)

AUC – analiza pola pod krzywą (ang. *Area Under Curve analysis*)

CE – elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary electrophoresis*)

CEL-NOS - przewlekła białaczka eozynofilowa, nie sklasyfikowana inaczej (ang. *Chronic Eosynophilic Leukemia, Not Otherwise Specified*)

CML - przewlekła białaczka szpikowa (ang. *Chronic Myeloid Leukemia*)

CMML – Przewlekła białaczka mielomonocytoza (ang. *Chronic myelomonocytic leukemia*)

CNL - przewlekła białaczka neutrofilowa (ang. *Chronic neutrophilic leukemia*)

COSMIC – katalog nowotworowych zmian somatycznych (ang. *Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*)

DEPC – dietylopirowęglań (ang. *diethyl pyrocarbonate*)

dHPLC -wysokoprężna denaturująca chromatografia cieczowa (ang. *denaturing High Pressure Liquid Chromatography*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetate*)

ELN – Europejska Sieć Hematologów (ang. *European Leukemia Net*)

ET – Nadpłytkowość samoistna (ang. *Essential Thrombocythemia*)

FAM – 6-karboksyfluoresceina (ang. 6-Carboxyfluorescein).

GTG –barwienie prążków G trypsyną i metodą Giemsa (ang. *G-band Trypsine and Giemsa staining*)

HRMA – metoda wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (ang. *High Resolution Melt Analysis*)

JMML – młodzieńcza białaczka mielomonocytoza (ang. *Juvenile myelomonocytic leukemia*)

LB – bufor do lizy (ang. *Lysing Buffer*)

MDS – zespół mielodysplastyczny (ang. *Myelodysplastic Syndrome*)

MPN –nowotwór mieloproliferacyjny (ang. *Myeloproliferative Neoplasm*)

MPN Ph –nowotwór mieloproliferacyjny Filadelfia ujemny (ang. *Philadelphia negative*)

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

myeloproliferative neoplasm)

MPN&MPNr EURONET – Europejska sieć badawcza nowotworów mieloproliferacyjnych i chorób związanych z nowotworami mieloproliferacyjnymi (ang. *European Net For Myeloproliferative Neoplasms and Diseases Related to Myeloproliferative Neoplasms*)

MPN-U - niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjny (ang. *Myeloproliferative Neoplasm Unclassifiable*)

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *Open Reading Frame*)

PMF – Pierwotne zwłóknienie szpiku (ang. *Primary myelofibrosis*)

PV – Czerwienica prawdziwa (ang. *Polycythemia rubra vera*)

RARS-T – niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością syderoblastów pierścieniowatych i nadpłytkowością (ang. *Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocythemi*)

SB – bufor sodowo-boranowy (ang. *Sodium Borate buffer*)

SNP- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)

TAMRA – karboksytetrametylorodamina (ang. *carboxytetramethylrhodamin*)

Tm – temperatura topnienia (ang. *Melting Temperature*)

WHO- Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

WT – typ dziki (ang. *Wild Type*)

WSTĘP

ROZDZIAŁ I

WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Nowotwory mieloproliferacyjne Filadelfia ujemne (ang. *Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms*, MPN Ph-) to schorzenia wywodzące się z komórek progenitorowych szpiku kostnego, u podłoża których leżą defekty szlaków przekazywania sygnałów komórkowych. W grupie tzw. klasycznych nowotworów mieloproliferacyjnych wyodrębniono trzy jednostki chorobowe: czerwienicę prawdziwą (ang. *polycythemia vera*, PV), nadpłytkowość samoistną (ang. *essential thrombocythemia*, ET) oraz pierwotne zwłóknienie szpiku (ang. *primary myelofibrosis*, PMF) [3]. W przebiegu MPN Ph- dochodzi do stopniowego wyczerpania potencjału proliferacyjnego macierzystych komórek krwiotwórczych, a z czasem do pojawienia się objawów niewydolności hematopoezy oraz włóknienia kolagenowego i retikuliny w obrębie szpiku kostnego [4]. Etiopatogeneza klasycznych postaci MPN do niedawna nie była znana. W 2005 roku stwierdzono, że u dużej części chorych obecna jest mutacja somatyczna V617F w obrębie egzonu 14 genu kinazy Janusowej 2 (*JAK2*) [5]. W kolejnych latach potwierdzono także występowanie u chorych na MPN Ph- innych mutacji genu *JAK2* w obrębie egzonów 12-15, a także w obrębie genu kodującego receptor dla trombopoetyny *MPL* (egzony 10-11) [6, 7]. W roku 2013 stwierdzono występowanie w grupie pacjentów z MPN Ph- bez obecności mutacji genu *JAK2* zaburzeń w obrębie sekwencji genu kalretikulin (*CALR*) [8]. Wiedza na temat częstości występowania tego defektu, obciążeniu nieprawidłowym allelem oraz jego roli sprawczej w patogenezie MPN Ph- jest jednak wciąż niewielka [9].

1.2 Rys historyczny

Hematologia jako dziedzina nauki wyodrębniła się w wieku XIX. Już w czasach wczesnochrześcijańskich znajdujemy jednak opisy chorób nienowotworowych i nowotworowych krwi. Słowo „rak” wywodzone jest od Galena (ok. 130-200 rok naszej ery), natomiast pierwsza wzmianka o skazach krwotocznych pochodzi z Talmudu (ok. 500 roku naszej ery) [10]. Już wcześniej pojęcie choroby utożsamiano często z krwią, o czym świadczy powszechność krwiopustów jako metody leczniczej. Do XVII wieku nie było jednak możliwości obserwacji składników morfotycznych krwi z powodu niedostępności narzędzi optycznych, umożliwiających ich wyróżnienie. Śledziona, jeden z narządów krwiotwórczych odgrywających rolę w patogenezie MPN, była dzięki koncepcjom Galena uważana za organ oczyszczający ciało z „czarnej żółci”, czyli melancholii. Ten pogląd pokutował jeszcze w 1653

WSTĘP

roku w dziele Williama Harveya „*Lectures on the Whole Anatomy*” [10]. Według niego, zdolność do śmiechu świadczyła o prawidłowej funkcji tego narządu w zakresie oczyszczania ciała z melancholii. Pomimo braku wiedzy na temat działania układu chłonnego i krwiotwórczego (pierwsze dane na ten temat przedstawili Thomas Bartholin i Olof Rudbeck w 1653 roku), renesansowi medycy rozumieli do pewnego stopnia rolę śledziony w procesie zwalczania infekcji. Twierdzili, że odpowiada ona za oczyszczanie krwi z toksyn [11]. Przełom w badaniach nad składnikami krwi dokonał się w połowie wieku XVII, po wynalezieniu mikroskopu. Anton von Leeuwenhoek, pionier mikroskopii, jako pierwszy w 1674 roku opisał krwinkę czerwoną. Ponad pół wieku później (1749) Joseph Lieutaud scharakteryzował krwinki białe, czyli „*globuli albicantes*” [10, 12]. W tym samym czasie Jean-Baptiste de Sénac zwrócił uwagę, że te tak zwane „białe ciała” są podobne do tych, znajdujących się w obrębie ropni. Kolejne odkrycia w tym zakresie następowały jedno po drugim: Brytyjczyk William Hewson w 1774 r. wyróżnił wśród „białych ciałek” limfocyty, zlokalizował je w układzie limfatycznym i wysunął hipotezę, że mogą one tworzyć krwinki czerwone. Najpóźniej scharakteryzowano płytki krwi - za prekursora hemostazy i odkrywcę trombocytów uważa się żyjącego w drugiej połowie XIX wieku Giulio Bizzozzer'a.

Na początku XIX wieku zaczęły pojawiać się wzmianki o nowotworach układu krwiotwórczego [13]. Dwa XIX-wieczne opisy, wskazujące wyraźnie na proces rozrostowy, są dziełami odpowiednio Alfreda Donne (1844) i Dawida Craigie (1845). Pierwszy z nich zwrócił uwagę, że we krwi chorej kobiety ponad połowę komórek stanowiły „komórki śluzowe” (współcześnie: leukocyty), drugi odnotował obecność komórek „ropnych” i „limfatycznych”, które „zmieszane krążyły we krwi chorego”. Craigie był tak zafascynowany opisanym przypadkiem, że szukał podobnych. Niedługo później udało mu się znaleźć kolejnego pacjenta z podobnymi objawami chorobowymi. Przypadek wysokiej leukocytozy u młodego mężczyzny został opisany przez patologa edynburskiego Johna Hughesa Bennett oraz Davida Craigie. Stosunkowo długi okres przeżycia pacjenta od momentu diagnozy (3 miesiące), poprawa stanu chorego po przystawieniu pijawek, obecność splenomegalii, a także znakomity jak na owe czasy opis mikroskopowy krwi pacjenta pozwalają z bardzo dużym prawdopodobieństwem podejrzewać, że był to przypadek przewlekłej białaczki szpikowej [13].

Termin „białaczka” został wprowadzony w 1847 roku, dwa lata po publikacjach Craigie i Bennett. Sformułował go słynny zachodniopomorski fizjolog, Rudolf Karl Virchow [10, 13]. On także jako pierwszy zaproponował podział nowotworów układu krwiotwórczego na mieloidalne i limfoidalne, nazywając je odpowiednio „śledzionowymi” i „limfatycznymi”. W 1889 roku klasyfikację nowotworowych schorzeń krwi rozszerzył Ebstein, dzieląc białaczki na ostre i przewlekłe [10, 13]. Pierwszy opis pierwotnej mielofibrozy przedstawił w roku 1879 niemiecki

WSTĘP

chirurg Gustav Heuck. Opisał on dwóch chorych z wydatną splenomegalią oraz obecnością we krwi erytroblastów i niedojrzałych form granulocytów. Oba przypadki sklasyfikował jako formy białaczki śledzionowej. Zwrócił on także uwagę na nieopisywane wcześniej towarzyszące chorobie zwłóknienie szpiku, które określił mianem „osteosklerozy”. Obecnością osteosklerozy tłumaczył także pojawienie się pozaszpikowej hematopoezy, będącej przyczyną splenomegali [13]. Podobne opisy pojawiają się w początkach XX wieku. Jeden z nich, autorstwa Herberta Assmana, przyczynił się do sformułowania terminu „syndrom Huecka-Assmana” będącego synonimem używanych powszechnie aż do lat 50-tych innych określeń: pierwotnej mielofibrozy, osteosklerozy, chronicznej idiopatycznej mielofibrozy czy też metapłazji szpikowej niewiadomego pochodzenia. Odpowiednikiem tego stanu chorobowego w aktualnie obowiązującej terminologii jest pierwotne zwłóknienie szpiku (ang. *primary myelofibrosis*).

„Polycytemia”, czyli dosłownie „choroba nadmiaru komórek krwi” zwana jest czasami także „chorobą Vaqueza”, od nazwiska paryskiego fizjologa, który opisał ją po raz pierwszy w 1982 roku [13]. Nadpłytkowość samoistną jako osobną jednostkę chorobową po raz pierwszy przedstawili niemieccy lekarze Ebstein i Goedel w roku 1934 roku. Co ciekawe, zaprezentowany przypadek kliniczny określili jako „nadpłytkowość krwotoczna”. Trzeba nadmienić, że już dużo wcześniej, bo w pracy DiGuglilemo z 1920 roku, opisano przypadek nadpłytkowości o nieznanym etiologii. Powszechnie uważano jednak, że nadmiar płytek krwi to zjawisko wtórne do różnych stanów chorobowych. W opisach nadpłytkowości z początków XX wieku zwracano jednak uwagę na współwystępowanie splenomegalii, nadkrwistości oraz zwiększonej liczby megakariocytów.

Dopiero w latach 50-tych i 60-tych XX wieku udało się stworzyć spójną, nowoczesną klasyfikację tzw. „przewlekłych zespołów mieloproliferacyjnych”, w której nadpłytkowość samoistna została wyodrębniona jako osobna jednostka chorobowa. Autorem tej klasyfikacji był William Damashek, Amerykanin rosyjskiego pochodzenia, znany jako założyciel prestiżowego czasopisma *Blood* oraz Amerykańskiego Stowarzyszenia Hematologów (ASH) [13]. We wprowadzonej w 1951 roku klasyfikacji Damashek przedstawił poszczególne postaci przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych, przypisując im wspólne pochodzenie i etiologię [14]. Do dnia dzisiejszego nowotwory mieloproliferacyjne stanowią (w zmodyfikowanej formie) jedną kategorię nowotworów układu krwiotwórczego w klasyfikacji opublikowanej przez Światową Organizację Zdrowia (*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*) [3].

1.3 Charakterystyka kliniczna nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych

Klasyfikacja nowotworów mieloproliferacyjnych według WHO oparta jest o kryteria kliniczne, morfologiczne oraz molekularne [3]. MPN stanowią grupę klonalnych schorzeń hematopoezy, w których kluczową rolę odgrywa niekontrolowana proliferacja macierzystych komórek hematopoetycznych szpiku. Dochodzi do zaburzeń ich apoptozy, do niestabilności genomowej i nieprawidłowej ekspresji powierzchniowych molekuł adhezyjnych. Zapadalność na nowotwory mieloproliferacyjne szacuje się na 1,15-4,99 na 100 000 osób w populacji ogólnej/rok [15]. W części przypadków objawom MPN towarzyszą symptomy innej choroby proliferacyjnej, w tym zespołu mielodysplastycznego (MDS) [16]. Z tego powodu w klasyfikacji WHO wyróżniono przewlekłą białaczkę mielomonocytową (*CMML, chronic myelomonocytic leukemia*) oraz jej formę młodzieńczą (*JMML, juvenile myelomonocytic leukemia*), tzw. „atypową przewlekłą białaczkę szpikową” (*a-CML, ang. atypical CML*) oraz szczególną postać zespołu mielodysplastycznego, niedokrwistość oporną na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów i nadpłytkowością (*RARS-T, ang. refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis*). Ta ostatnia jednostka chorobowa została wyróżniona jako tymczasowa, ze względu na większe podobieństwo genetyczne tego nowotworu do MPN niż do MDS [17-19].

W obrębie klasyfikacji WHO z 2008 roku wśród MPN wyszczególniono przewlekłą białaczkę szpikową z obecną translokacją t(9;22), tzw. chromosomu Filadelfia, oraz nowotwory mieloproliferacyjne Filadelfia-ujemne (MPN Ph-), w których wymieniony chromosom nie występuje. Wśród MPN Ph- wyróżniamy czerwienicę prawdziwą (PV, ang. *polycythemia vera*), nadpłytkowość samoistną (ET, ang. *essential thrombocythemia*) oraz pierwotne zwłóknienie szpiku (PMF, ang. *primary myelofibrosis*), razem określane jako „klasyczne nowotwory mieloproliferacyjne”, a także mastocytozę, przewlekłą białaczkę neutrofilową (CNL, ang. *chronic neutrophilic leukemia*), przewlekłą białaczkę eozynofilową nie sklasyfikowaną inaczej (CEL-NOS, ang. *chronic eosynophilic leukemia not otherwise specified*) oraz MPN niesklasyfikowane (MPN-U, ang. *unclassified*). Klasyfikację MPN przedstawiono w tabeli 1 [16].

WSTĘP

Tabela 1: Podział nowotworów mieloproliferacyjnych i mielodysplastyczno-mieloproliferacyjnych według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia z 2008 roku [3, 16]

L.p.	Nazwa jednostki chorobowej	Nazwa angielska	Akronim angielski
A	Nowotwory mieloproliferacyjne	<i>Myeloproliferative neoplasms</i>	MPN
1	Przewlekła białaczka szpikowa	<i>Chronic myeloid leukemia</i>	CML
2	Przewlekła białaczka neutrofilowa	<i>Chronic neutrophilic leukemia</i>	CNL
3	Czerwieńca prawdziwa	<i>Polycythemia vera</i>	PV
4	Pierwotne zwłóknienie szpiku	<i>Primary myelofibrosis</i>	PMF
5	Nadpłytkowość samoistna	<i>Essential thrombocythemia</i>	ET
6	Przewlekła białaczka eozynofilowa, nie sklasyfikowana inaczej	<i>Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified</i>	CEL-NOS
7	Mastocytoza	<i>Mastocytosis</i>	
8	Niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjny	<i>Myeloproliferative neoplasms unclassifiable</i>	MPN-U
B	Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne	<i>Myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasms</i>	MDS/MPN
1	Przewlekła białaczka mielomonocytoza	<i>Chronic myelomonocytic leukemia</i>	CMML
2	Atypowa przewlekła białaczka szpikowa	<i>Atypical chronic myeloid leukemia</i>	a-CML
3	Młodzieńcza białaczka mielomonocytoza	<i>Juvenile myelomonocytic leukemia</i>	JMML
4	Niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjno-mielodysplastyczny	<i>Myelodysplastic/ myeloproliferative neoplasms unclassifiable</i>	MDS/MPN-U
5	Niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością syderoblastów pierścieniowatych i nadpłytkowością	<i>Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocythemia</i>	RARS-T

1.3.1 Czerwienica prawdziwa

Czerwienica prawdziwa jest nabytą chorobą wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku. Zapadalność na to schorzenie szacuje się na 0,1-2,61 na 100 000 osób populacji generalnej/rok. Mediana wieku w chwili zachorowania wynosi 60-65 lat [15, 16]. Głównym laboratoryjnym kryterium diagnostycznym PV jest utrzymujące się podwyższone stężenie hemoglobiny (powyżej 18,5g/dl lub 11,5 mmol/dl u mężczyzn i powyżej 16,5 g/dl lub 10,2 mmol/dl u kobiet) oraz wzrost wartości hematokrytu powyżej 99-go percentyla dla populacji ogólnej. W większości przypadków PV (ponad 95%) można wykazać obecność mutacji V617F w obrębie egzonu 14 genu *JAK2*. U zdecydowanej większości chorych z nieobecną mutacją V617F stwierdza się obecność defektów w obrębie egzonu 12 genu *JAK2* (ogółem u około 3% przypadków) [20]. Diagnostyka różnicowa czerwienicy prawdziwej powinna obejmować inne choroby przebiegające z erytrocytozą, w tym wrodzone mutacje receptora erytropoetyny oraz regulatora cytokinowego *LNK*, hemoglobinopatie, niedobór mutazy 2,3-bisfosfoglicerynianowej i mutacje szlaku regulacji hipoksji (ang. *oxygen sensing pathway*), a także erytrocytozy nabyte, objawowe (na przykład w przebiegu chorób płuc, nikotynizmu, chorób serca, przy obecności przetok tętniczo-żylnych) [21].

1.3.2 Nadpłytkowość samoistna

Nadpłytkowość samoistna jest schorzeniem komórki macierzystej szpiku, które cechuje wzrost liczby płytek krwi powyżej $450 \times 10^9/l$. W rozmazie krwi obwodowej stwierdza się obecność tzw. płytek olbrzymich, zaś w badaniu histopatologicznym szpiku zwiększoną liczbę megakariocytów, często zmienionych morfologicznie, tworzących skupiska (agregaty). W początkowych stadiach choroby nieobecne są objawy metaplastji pozaszpikowej, zmiany we wzorze dojrzewania krwinek białych we krwi obwodowej/szpiku oraz cechy nasilonej proliferacji linii erytroidalnej i granulocytarnej. W części przypadków ET można jednak zauważyć umiarkowaną granulocytozę we krwi [3, 16]. W badaniach cytogenetycznych u niewielkiego odsetka chorych (ok. 5%) obecne są zmiany chromosomowe, głównie w obrębie autosomów 1, 5, 9, 20 i 21 [16, 22]. Diagnostyka molekularna choroby obejmuje wykonanie badania na obecność mutacji V617F genu *JAK2* (obecna u ok. 55-56% chorych), a także mutacji genu *CALR* (obecne u ok. 25%) oraz mutacji genu *MPL* (wykrywane u 3-5% pacjentów) [8, 16]. W diagnostyce różnicowej ET ważne jest wykluczenie innych przyczyn nadpłytkowości, w tym m.in. nadpłytkowości reaktywnej czy też proliferacyjnej fazy pierwotnej mielofibrozy [3].

1.3.3 Pierwotne zwłóknienie szpiku

Pierwotne zwłóknienie szpiku jest chorobą multipotencjalnej komórki macierzystej. Nowotwór ten wyróżnia się spośród innych MPN Filadelfia-ujemnych wczesnym występowaniem objawów niewydolności hematopoezy, w tym głębokiej niedokrwistości i małopłytkowości. Jego przebieg cechuje także obecność ognisk hematopoezy pozaszpikowej. We wczesnej fazie choroby (proliferacyjnej) u większości chorych obecna jest leukocytoza oraz nadpłytkowość, a w fazie późnej (fibrotycznej) głęboka niedokrwistość, granulocytopenia oraz małopłytkowość. W badaniu przedmiotowym stwierdza się hepatosplenomegalię. W badaniach biochemicznych krwi obwodowej można stwierdzić podwyższoną aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i podwyższone stężenie kwasu moczowego we krwi. W rozmazie krwi obwodowej obecne są postaci niedojrzałe granulocytów oraz erytroblasty. Obecna jest anizo- i poikilocytoza, a także krwinki czerwone w kształcie łez. W badaniu histopatologicznym szpiku stwierdza się włóknienie retikulino- i kolagenowe oraz hiperplazję/hipoplazję komórek linii płytkotwórczej, granulocytarnej i erytroidalnej. We wczesnej, tzw. prefibrotycznej fazie PMF obecne są zmiany ilościowe i jakościowe także w obrębie megakariocytów [16]. Zmiany kariotypu w komórkach hematopoetycznych nie są charakterystyczne. Ich obecność w badaniu techniką GTG stwierdza się u 33-55% chorych. Najczęściej dotyczą one chromosomów 1, 5, 7, 8, 9, 13 oraz 20 pary [23]. Wśród zmian molekularnych najczęściej obecna jest mutacja V617F genu *JAK2* (ok. 40-50%), mutacje genu *CALR* (ok. 35%) oraz *MPL* (5-10% przypadków). Ostatnio u chorych na MPN Ph-, w szczególności u pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku, potwierdzono także występowanie innych defektów molekularnych, zmieniających rokowanie w poszczególnych przypadkach. Należą do nich defekty genów *ASXL1* (36%), *TET2* (27%), *EZH2* (22%) [8, 16, 24, 25]. Pierwotna mielofibroza jest schorzeniem najgorzej rokującym spośród klasycznych nowotworów mieloproliferacyjnych [16].

Szczegółowe kryteria rozpoznania poszczególnych postaci MPN Ph- przedstawiono w tabeli 2.

WSTĘP

Tabela 2: Kryteria rozpoznania klasycznych MPN według WHO 2008 [3, 26]

Kryteria	PV ^a	ET ^a	PMF
Większe	<ol style="list-style-type: none"> Hb > 11,48 mmol/l (mężczyźni) , > 10,24 mmol/l (kobiety) ; lub Hb albo Ht > 99 percentyla wartości dla określonego wieku, płci lub wysokości przybywania ponad poziomem morza; lub Hb > 10,55 mmol/l (mężczyźni) , > 9,31 mmol/l (kobiety) , jeśli jednocześnie stwierdza się przyrost Hb $\geq 1,24$ mmol/l w porównaniu do wartości wyjściowej nie powiązany z leczeniem stanu niedoboru żelaza; lub wzrost masy krwinek czerwonych > 25% ponad średnią przewidzianą wartością normalną Obecność mutacji V617F genu <i>JAK2</i> lub defektu o podobnych konsekwencjach 	<ol style="list-style-type: none"> Liczba płytek $\geq 450,0 \times 10^9/l$ Cechy proliferacji w linii megakariocytarnej z obecnością form dużych i dojrzałych megakariocytów. Brak lub słabo wyrażone cechy proliferacji w linii granulocytarnej i czerwonekrwinkowej Nieobecność objawów odpowiadających kryteriom WHO rozpoznania CML, PV, PMF, MDS lub innych nowotworów szpikowych Wykazanie obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i> lub innego markera wzrostu klonalnego lub niewystępowanie objawów nadpłytkowości reaktywnej 	<ol style="list-style-type: none"> Cechy proliferacji oraz atypii^b w obrębie linii megakariocytarnej z jednoczesnym występowaniem włóknienia retikulinoowego i/lub kolagenowego lub przy nieobecności włóknienia retikulinoowego zmiany w linii megakariocytarnej muszą być powiązane ze zwiększoną komórkowatością szpiku, cechami proliferacji w linii granulocytarnej, często z supresją erythropoezy (np. w przed-zwłóknieniowej fazie PMF) Nieobecność objawów odpowiadających kryteriom WHO rozpoznania CML, PV, PMF, MDS, lub innych nowotworów szpikowych Wykazanie obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i> lub innego markera wzrostu klonalnego lub niewystępowanie objawów reaktywnego włóknienia w szpiku
Mniejsze	<ol style="list-style-type: none"> Cechy trójukładowej choroby mieloproliferacyjnej w szpiku Poziom Epo w surowicy poniżej normy Endogenny wzrost kolonii erytroidalnych 		<ol style="list-style-type: none"> Leukoerytoblastoza we krwi Wzrost aktywności LDH Niedokrwistość Splenomegalia w badaniu przedmiotowym

^a - rozpoznanie czerwienicy prawdziwej wymaga obecności obu kryteriów dużych i jednego kryterium mniejszego lub pierwszego dużego i dwóch kryteriów mniejszych.

Rozpoznanie nadpłytkowości samoistnej wymaga spełnienia wszystkich czterech kryteriów dużych. Rozpoznanie pierwotnej mielofibrozy wymaga spełnienia wszystkich trzech kryteriów dużych oraz dwóch kryteriów małych. ^b - od małych do dużych megakariocytów z nieprawidłowym stosunkiem jądrowo/cytoplazmatycznym, hiperchromatycznym i nieregularnie złożonym jądrem oraz obecnością „gęstych” klastrow megakariocytarnych

1.4 Szlak sygnalizacyjny JAK-STAT jako element regulatorowy hematopoezy

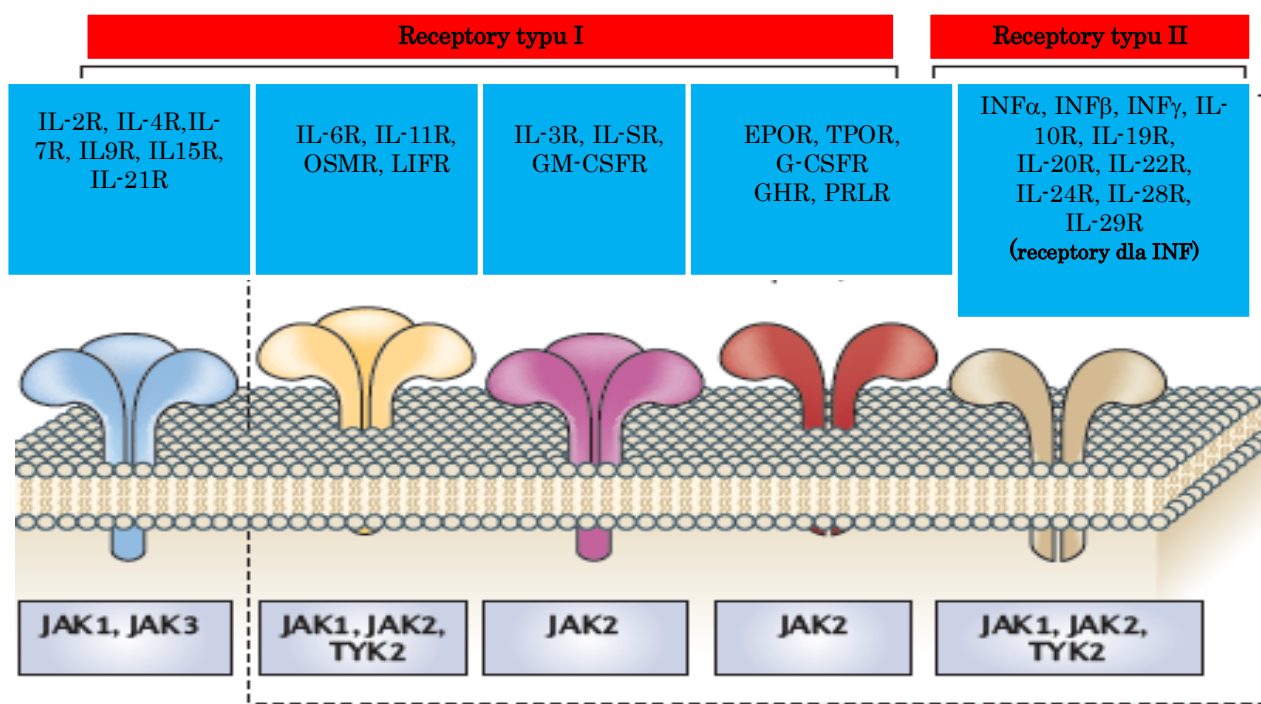
Hematopoeza jest procesem wieloetapowym i złożonym. Od jej sprawnego funkcjonowania zależy wydolność całego ustroju, w szczególności układu krążenia i oddychania, a także układu immunologicznego. W regulację hematopoezy zaangażowane są liczne szlaki komórkowego przekazywania sygnału na drodze stymulacji specyficznego receptora (regulacja hormonalna i cytokinowa), a także interakcje międzykomórkowe.

WSTĘP

Najważniejszym molekularnym szlakiem regulacji hematopoezy z punktu widzenia patogenezy MPN Ph- jest kaskada sygnałowa JAK-STAT. Jej aktywność warunkuje intensywność proliferacji komórek mieloidalnych, a także proces ich dojrzewania, różnicowania i apoptozy.

Pierwotnymi przekazywanymi sygnałami, rozpoczynającymi kaskadę JAK-STAT są receptory błonowe wiążące cytokiny. Receptory te dzielimy na 2 grupy- klasa I odpowiedzialna jest za wiązanie EPO, TPO, czynników stymulujących wzrost kolonii (CSF) oraz interleukin (IL). Receptory klasy II posiadają kieszeń wiążącą interferony (INF). W przypadku regulacji procesu erytropoezy kluczową rolę odgrywają receptory typu I dla erytropoetyny (EPOR). Podobną rolę w procesie trombopoezy odgrywają receptory dla trombopoetyny (MPL). Regulacja procesu granulopoezy odbywa się poprzez receptor dla czynnika stymulującego granulopoezę (G-CSFR). Ich stymulacja prowadzi do indukcji przekazywania sygnału szlakiem JAK-STAT [27-29].

Typy receptorów swoiste dla kaskady JAK-STAT zaprezentowano na rycinie 1.



Rycina 1 : Typy receptorów uczestniczące w transdukcji sygnału za pośrednictwem kaskady JAK-STAT. Według: Quintas-Cardama i wsp. [1]

Kolejnym elementem kaskady transdukcji sygnału jest jedna z kinaz tyrozynowych z rodziny JAK, nazywanych także „kinazami Janusowymi”. Jest to ewolucyjnie zakonserwowana rodzina białek niereceptorowych o wielkości od 120 do 140 kDa. Homologi białek JAK spotykane są w całym świecie zwierząt dwubocznie symetrycznych. Cechą charakterystyczną tej grupy kinaz jest obecność tzw. homologicznych domen JH (ang. *Janus homology domains*), odpowiedzialnych za dimeryzację i aktywność katalityczną. U człowieka wyodrębniono cztery

WSTĘP

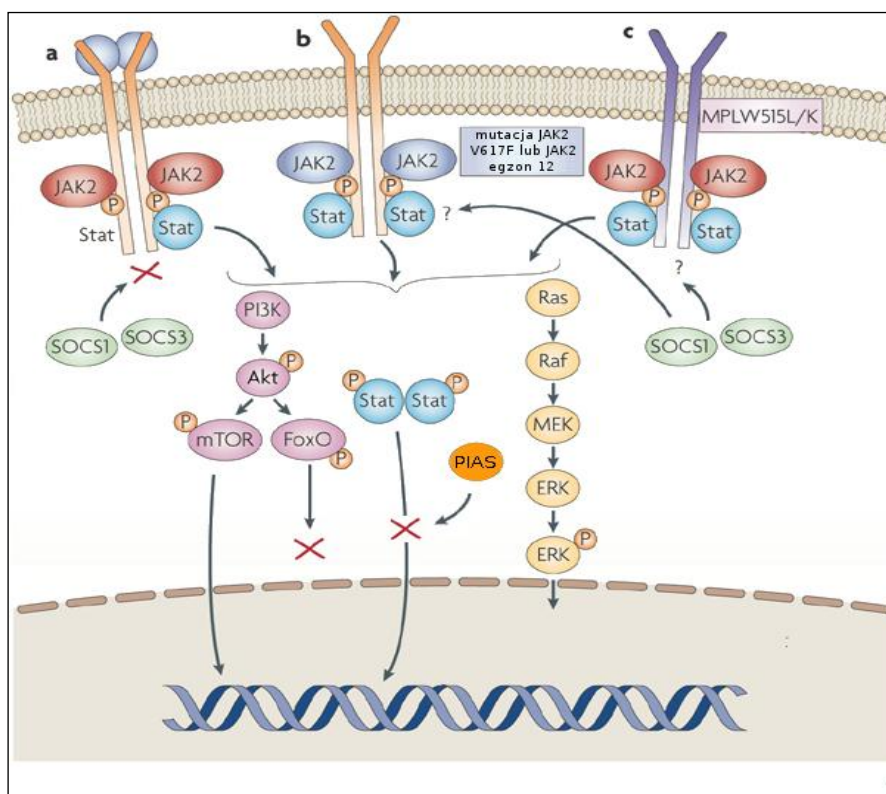
białka należące do tej rodziny: JAK1, JAK2, JAK3 oraz TYK2 (ryc. 1). Dwie podjednostki kinaz Janusowych są związane funkcjonalnie z dwoma podjednostkami danego receptora. Po związaniu liganda, podjednostki receptora dimeryzują. Indukuje to odsłonięcie domen katalitycznych, wzajemną fosforylację obu podjednostek kinazy i ich aktywację. Aktywna kinaza Janusowa fosforyluje szereg cytoplazmatycznych białek efektorowych – głównie czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT, lecz także elementy innych ważnych szlaków transdukcji sygnału takich jak RAS-MAPK, IP3-ALK, mTOR [28, 29].

Białka rodziny STAT (białkowe przekaźniki sygnału i aktywatory ekspresji, ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) to cytoplazmatyczno-jądrowe czynniki transkrypcyjne. Dotychczas u człowieka opisano 7 białek homologicznych z tej rodziny. Nieaktywne monomery STAT obecne są w formie rozpuszczonej w cytoplazmie. Są one fosforylowane przez kinazy rodziny JAK, co prowadzi do ich dimeryzacji i aktywacji. Forma aktywowana jest transportowana do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z promotorami genów efektorowych, indukując ich ekspresję. Należą do nich geny dla interferonów, interleukin i gen cykliny D [28, 29].

Szlak JAK-STAT podlega regulacji na wielu etapach. Aktywność całej kaskady JAK-STAT jest wstępnie modulowana poprzez zmianę ilości cząsteczek receptora na powierzchni komórki, nadmiarowe receptory są usuwane na drodze endocytozy. Następnie zbyt mała ich liczba wzmagą ekspresję genów, kodujących podjednostki receptora. Inną formą regulacji hematopoezy jest wymiana składowych kaskady – przykładowo homodimer JAK2 może zostać zastąpiony heterodimerem JAK1/JAK2, co zmienia powinowactwo kompleksu do różnych białek efektorowych oraz moduluje intensywność procesu ich fosforylacji. To z kolei wpływa bezpośrednio i pośrednio na ekspresję genów, będących celami dla czynników transkrypcyjnych. Istnieją także całkowicie nieaktywne izoformy białek STAT, syntezowane jako inhibitory kompetycyjne dla białek JAK. Obecne w komórce są także białka z grupy CIS (regulatory sygnału indukowane przez cytokiny, ang. *Cytokine Inducible regulators of Signalling*) oraz SOCS (supresory sygnału cytokinowego, ang. *Supressors Of Cytokine Signalling*), które uniemożliwiają formowanie aktywnego dimeru STAT, a także białka PIAS (inhibitory białkowe aktywowanych STAT, ang. *Protein Inhibitors of Activated STATs*), które czynnie blokują ich aktywność. Dodatkowo w komórce syntezowane są fosfatazy, deaktywujące białka STAT i JAK poprzez ich defosforylację [29].

Uproszczony schemat kaskady JAK-STAT na przykładzie regulacji erytropoezy i trombopoezy przedstawiono na rycinie 2.

WSTĘP



Rycina 2: Schemat kaskady JAK-STAT. (a) Natywne białko JAK2 uczestniczy w fosforylacji białek STAT po związaniu liganda z receptorem błonowym. (b) Mutacje *JAK2* mogą prowadzić do zniesienia autoinhibicji kinazy oraz aktywacji kaskady pod nieobecność liganda. (c) Mutacja receptora *MPL* zmienia konformację fragmentów przezbłonowych receptora. Umożliwia to wzajemną fosforylację w obrębie cząsteczki, co skutkuje aktywacją kaskady JAK2-STAT [2].

1.5 Molekularne podłoże MPN Ph-

Do początku XXI wieku patomechanizm nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych był nieznany. Odkrycie w 2005 roku auto-aktywującej mutacji w obrębie pojedynczego nukleotydu g.1849 G>T w genie kinazy Janusowej 2 (*JAK2* V617F) pozwoliło wyjaśnić molekularny mechanizm, prowadzący do zakłócenia kontroli procesu mielopozy w tej grupie nowotworów [30]. Okazało się jednak, że jej występowanie nie dotyczy wszystkich przypadków MPN Ph-. Z tego powodu zaczęto poszukiwać innych defektów zakłócających funkcjonowanie kaskady JAK-STAT. Doprowadziło to do wykrycia mutacji o podobnym znaczeniu czynnościowym w obrębie egzonu 12 genu *JAK2* [31] oraz egzonu 10 genu receptora dla trombopoetyny (*MPL*) [32]. Niestety okazało się, że u dużej części pacjentów z nadpłytkowością samoistną i pierwotnym zwłóknieniem szpiku mutacje w obrębie genów *JAK2* i *MPL* nie były obecne. Nie udało się także potwierdzić obecności innych mutacji w obrębie genów kodujących receptory błonowe czy też białka uczestniczące w transdukcji sygnału na osi JAK2-STAT. Dopiero przeprowadzone w 2013 roku badania genomu człowieka metodami sekwencjonowania nowej generacji przyniosły postęp w badaniach nad patogenezą MPN Ph-. W

WSTĘP

ich wyniku potwierdzono obecność mutacji rozproszonych w obrębie genów kodujących epigenetyczne elementy regulatorowe, białka spliceosomu oraz białka odpowiedzialne za regulację stresu oksydacyjnego. Ze względu na częstsze występowanie wymienionych defektów u chorych w bardziej zaawansowanych stadiach MPN, aktualnie określa się je mianem „mutacji modyfikujących fenotyp” [33]. W roku 2013 Klampf i wsp. oraz Nangalia i wsp. niezależnie potwierdzili występowanie u pacjentów z ET i PMF mutacji w obrębie genu kalretikulin (CALR). Jak dotąd ich rola w patogenezie MPN jest wciąż nie do końca poznana [8, 34].

Szczegółowe badania dotyczące znaczenia obecności wymienionych defektów u chorych na MPN Ph- wykazały, że u pacjentów z obecną mutacją V617F genu *JAK2* charakter mutacji (heterozygotyczny bądź homozygotyczny) w poszczególnych komórkach macierzystych może być różny [35]. Wykazano, że w hodowli komórek szpiku pozyskanych od pacjentów z czerwienicą prawdziwą obecne są zarówno komórki typu dzikiego, jak też z heterozygotycznym lub homozygotycznym wariantem mutacji V617F genu *JAK2* [36]. Wysłano hipotezę o występowaniu związku pomiędzy zawartością patologicznego allelu a aktywnością procesu chorobowego. Wprowadzono wobec tego termin „obciążenie nieprawidłowym allelem” (ang. „*allele burden*”), określający średnią zawartość wariantu zmutowanego w populacji komórek hematopoetycznych. Obciążenie nieprawidłowym allelem (%AB) jest wypadkową zawartości mutacji typu dzikiego, a także obciążonych mutacją heterozygotyczną i homozygotyczną w heterogennej populacji komórek. Parametr ten jest wyliczany na podstawie wzoru
$$\%AB = \frac{MUT}{WT+MUT} * 100\%$$
, gdzie MUT określa stwierdzoną liczbę kopii fragmentu DNA zawierającego mutację, a WT ilość kopii fragmentu typu dzikiego. %AB określany jest w DNA wyizolowanym z leukocytów krwi pełnej pacjenta [1].

Wartość obciążenia allelem można określić metodą ilościową (Real-Time PCR lub Digital Droplet PCR) jedynie w odniesieniu do mutacji *JAK2* V617F. Aktualnie trwają prace nad zastosowaniem tej techniki do oceny obciążenia innymi typami defektów, w tym mutacjami w obrębie egzonu 12 genu *JAK2* [37] oraz mutacjami genów *CALR* i *MPL* [38]. W przypadku mutacji *JAK2* V617F stwierdzono, że u danego chorego wartość %AB nie ulega znaczącym zmianom w krótkim (poniżej 1 roku) okresie monitorowania. Wartość ta zmienia się natomiast w trakcie wieloletniej obserwacji, co może świadczyć o progresji choroby. Do spadku %AB może prowadzić leczenie interferonem alfa lub inhibitorami kinazy *JAK2* [39, 40]. Aktualnie trwają prace badawcze, których celem jest stratyfikacja ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby w zależności od obciążenia zmutowanym allelem *JAK2* V617F oraz *CALR* [35].

1.5.1 Gen *JAK2*

Ludzki gen *JAK2* (ang. *Just Another Kinase 2* lub *Janus Kinase 2*, pl. kinaza Janusowa 2) zlokalizowany jest w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 9 (p24). Jest on złożony z 25 egzonów i obejmuje obszar ok. 144 tysięcy par zasad w orientacji nici dodatniej (koordynaty 4985245-5129948 wg sekwencji referencyjnej NC_000009.12) [41]. Gen podlega średniej lub niskiej ekspresji w większości tkanek organizmu, najwyższą jego ekspresję potwierdzono w komórkach układu krwiotwórczego, szczególnie w linii mieloidalnej i monocytarnej [42].

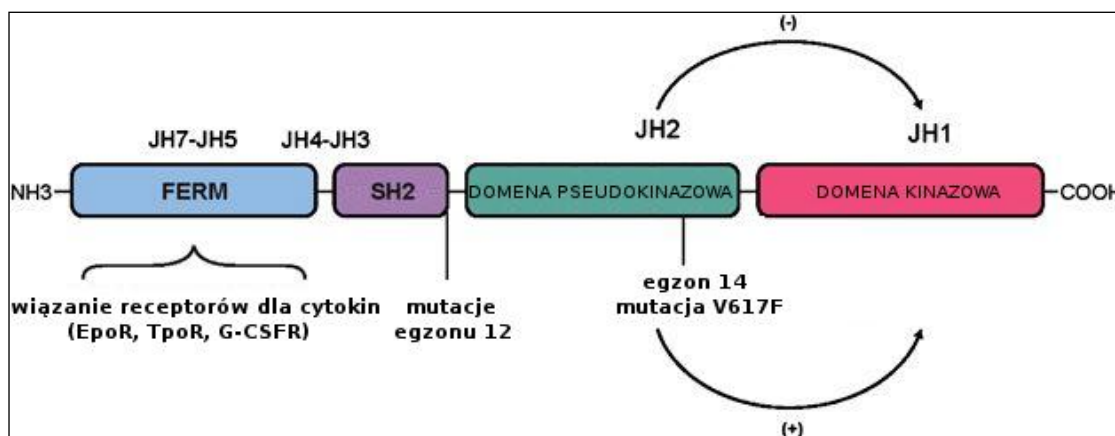
Produktem genu *JAK2* jest białko o ciężarze 131 kDa i optimum aktywności w pH 6,82. Opisano tylko jedną jego formę splicingową o długości 1132 aminokwasów [42]. Ma ono strukturę domenową, W jego obrębie wyróżniono 7 domen JH (ang. *Janus homology domains*), wykazujących homologię w obrębie całej rodziny białek JAK [43]. Domeny te zgrupowano ze względu na działanie w 4 moduły funkcjonalne (ryc. 3). Moduł FERM, złożony z domen JH5-JH7 pełni funkcje strukturalne, regulatorowe wobec domeny katalitycznej, wiąże także białko z receptorem [44]. Moduł SH2, obejmujący domeny JH3-JH4, jest charakterystyczny dla kinaz tyrozynowych i zwiększa efektywność fosforylacji dokonywanej przez domenę katalityczną. Jednocześnie jest on łącznikiem zapewniającym odpowiednią konformację całego białka [44]. Najważniejszymi dla aktywności *JAK2* są domeny JH1 i JH2, określane odpowiednio jako domena kinazowa i pseudokinazowa. Bogata w reszty tyrozynowe domena kinazowa zlokalizowana jest w pobliżu C-końca *JAK2*. Odpowiada ona za katalityczną aktywność białka. W konformacji nieaktywnej enzymatyczne właściwości JH1 są blokowane przez domenę pseudokinazową JH2. Pełni ona funkcję inhibitorową wobec domeny JH1 (ryc.4). W warunkach fizjologicznych autoinhibicja cząsteczki *JAK2* zostaje zniesiona w wyniku zmiany konformacji związanego z nią receptora. Zmiana ta wymusza oddalenie się od siebie domeny kinazowej i pseudokinazowej i odsłonięcie centrum aktywnego enzymu [45].

1.5.1.1 Mutacja V617F genu *JAK2*

W 95% przypadków czerwienicy prawdziwej i ponad połowie przypadków nadpłytkowości samoistnej i mielofibrozy stwierdza się obecność mutacji somatycznej g.1849 G>T w obrębie egzonu 14. Wynikiem jej obecności jest zmiana aminokwasowa p.V617F w obrębie sekwencji domeny pseudokinazowej białka *JAK2* (ryc. 4) [5]. Zmiana niewielkiego aminokwasu niepolarnego waliny na aminokwas aromatyczny o znacznie większej reszcie

WSTĘP

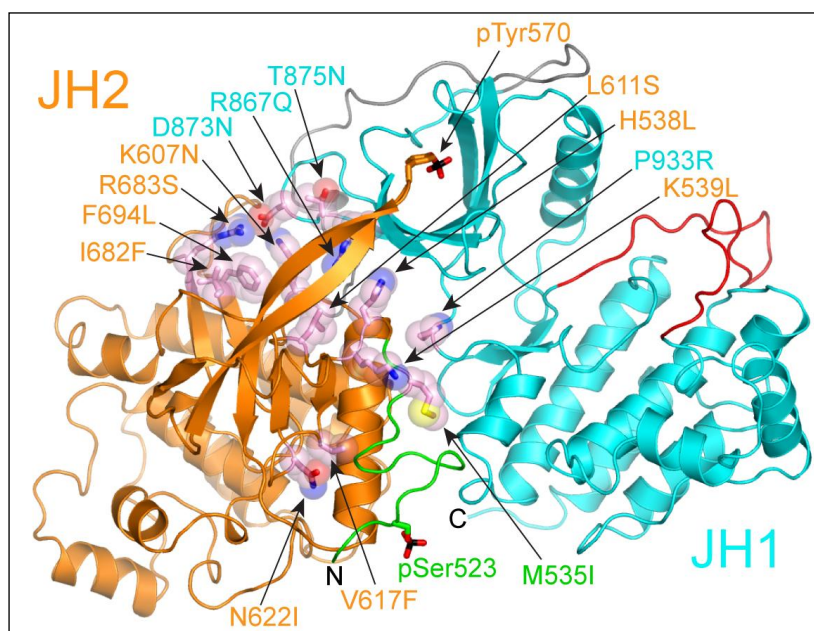
bocznej powoduje rozsuniecie sąsiadujących aminokwasów i zakłócenie interakcji pomiędzy domeną kinazową i pseudokinazową. Skutkuje to niezależną od zmiany konformacji receptora aktywacją związanej z nim kinazy JAK2 [45]. Konstytutywna aktywacja białka JAK2 prowadzi do pobudzenia kolejnych elementów kaskady JAK2-STAT i uruchomienia transkrypcji genów efektorowych, zaangażowanych w proces proliferacji komórek mieloidalnych.



Rycina 3: Domenowa struktura ludzkiego białka JAK2 [43].

1.5.1.2 Mutacje *JAK2* w obrębie egzonu 12

Do zakłócenia procesu autoinhibicji kinazy prowadzi także obecność mutacji w obrębie egzonu 12 genu *JAK2*. Występują one u ok. 3% pacjentów cierpiących z powodu czerwienicy prawdziwej. Co ciekawe, ich obecności nie potwierdzono u chorych z innymi typami MPN [46]. Charakter mutacji jest różny, spotykane są defekty insercyjnej, delecyjnej lub substytucyjnej oraz zmiany złożone. Większość defektów zlokalizowana jest w obrębie kodonów 536-547. Ich obecność nie zmienia struktury centrum aktywnego enzymu ani miejsca wiążącego ATP. Wpływa jednak na strukturę fragmentu domeny kinazowej leżącego naprzeciwko domeny pseudokinazowej i kodonu 617 (ryc. 4). Wymienione zmiany prowadzą do uwolnienia domeny kinazowej od inhibicyjnego wpływu domeny JH2, co skutkuje niezależną od receptora aktywacją zmienionego białka JAK2 [45].



Rycina 4: Model *in silico* interakcji pomiędzy domeną kinazową JH1 i pseudokinazową JH2 kinazy JAK2 w przypadku obecności mutacji zaburzających proces jej autoinhibicji [45].

1.5.1.3 Mutacje genu *JAK2* w obrębie egzonów 13-15

Defekty w egzonach 13-15 genu *JAK2* zlokalizowane są w obrębie domeny kinazowej (egzon 13), a także domeny pseudokinazowej (egzony 14 oraz 15) (ryc. 4). Stanowią niecały 0,1% wszystkich mutacji genu *JAK2*, często też współwystępują z mutacją *JAK2* V617F. Ich rola w patogenezie MPN Ph- nie jest jasna. W większości przypadków obarczonych takim defektem obciążenie nieprawidłowym allelelem jest bowiem niskie [47] [48].

1.5.2 Gen *CALR*

Gen *CALR*, kodujący białko kalretikulinę (ang. *calreticulin*), zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 19 (p13.2-p13.3). Składa się on jedynie z 9 egzonów obejmujących obszar ok. 6000 tysięcy par zasad w orientacji nici dodatniej (koordynaty 12938600-12944490 wg sekwencji referencyjnej NC_000019.10) [49]. Gen ulega średniej lub średniowysokiej ekspresji w większości komórek organizmu. Najwyższą ekspresję genu *CALR* wykazano w komórkach wątroby, płuc i jelita grubego. W komórkach układu krwiotwórczego wysoką ekspresję *CALR* wykazano w komórkach linii płytkotwórczej. Nadekspresję genu *CALR* potwierdzono w komórkach licznych nowotworów [50, 51]. Ewolucyjnie *CALR* jest bardzo

WSTĘP

zakonserwowany. Jego obecność można wykazać w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych oprócz drożdży [52].

Produktem genu kalretikuliny jest białko o ciężarze 48 kDa i optimum aktywności w pH 4,29. Jak dotąd opisano tylko jedną formę splicingową o długości 417 aminokwasów [50]. W strukturze CALR wyodrębniono trzy domeny: N-końcową domenę globularną, domenę bogatą w prolinę („domenę P”), oraz domenę C-końcową, silnie naładowaną ujemnie (ryc. 5) [52].

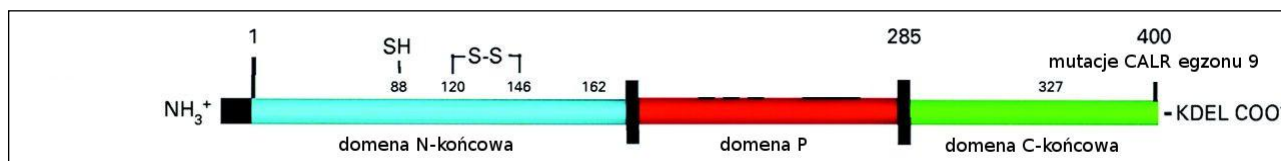
Kalretikulina jest białkiem o funkcji plejotropowej. W komórce występuje w cytozolu, retikulum endoplazmatycznym oraz jądrze komórkowym. W roku 1974 potwierdzono zdolność tego białka do wiązania jonów wapnia w ER tkanki mięśniowej, a także opisano jego rolę regulatorową w procesie skurczu mięśnia [52]. W kolejnych latach potwierdzono obecność kalretikuliny w retikulum endoplazmatycznych wielu innych typów tkanek. CALR odgrywa rolę regulatorową w procesach zależnej od jonów wapnia sygnalizacji komórkowej, przewodnictwa elektrycznego, różnicowania i podziału komórek, a także adhezji oraz apoptozy. W procesie wiązania się białka z jonami wapnia uczestniczą domena wiążąca prolinę i w mniejszym stopniu domena C-końcowa [52]. Domena N-końcowa kalretikuliny wraz z domeną P pełnią funkcje chaperonowe. Odpowiadają one za prawidłowe fałdowanie się nowopowstających białek w świetle retikulum endoplazma tylnego (ER). Proces ten służy kontroli jakości większości produkowanych w komórce białek, a jego zakłócenie może być jednym z istotnych czynników w patogenezie MPN Ph- [52].

Prawidłowa lokalizacja białka w świetle ER jest związana z obecnością w domenie C-końcowej CALR specyficznej sekwencji aminokwasowej KDEL, pozwalającej na retencję białka w tym przedziale komórkowym. Sekwencja ta ulega zmianie w przypadku wystąpienia mutacji egzonu 9 genu *CALR*. Dotychczasowe badania immunolokalizacyjne niestety nie potwierdziły różnic w stężeniach natywnego i zmienionego CALR w retikulum endoplazmatycznym w cytozolu, co poddaje w wątpliwość związek utraty KDEL z zaburzeniami mielopoezy [8].

Pod koniec ubiegłego wieku poznano nową funkcję białka CALR. Stwierdzono, że domena globularna cząsteczki kalretikuliny wiąże się w jądrze komórek prawidłowych z receptorami dla steroidów oraz niektórymi czynnikami transkrypcyjnymi, hamując ich transport w obrębie jądra komórkowego [52]. Zmienia to profil ekspresji wielu genów. Z tego powodu postuluje się, że nadekspresja CALR obniża wrażliwość komórek nowotworowych na leki sterydowe [52]. Kalretikulina wiąże się także z receptorami kwasu retynoidowego, pełniącymi ważną rolę w różnicowaniu się komórek mieloidalnych [53]. Może to prowadzić do zaburzenia wiązania czynników transkrypcyjnych z genami docelowymi w jądrze komórkowym, a przez to do zakłócenia procesów regulacji mielopoezy. Jak dotąd brak jest jednak dowodów na poparcie tej hipotezy. Badania immunolokalizacyjne nie potwierdziły bowiem różnic w stężeniach

WSTĘP

natywnego i zmienionego pod wpływem mutacji białka CALR w różnych przestrzeniach komórkowych [8].



Rycina 5: Struktura ludzkiego białka CALR [52].

1.5.2.1 Mutacje *CALR* egzonu 9

Obecność mutacji w genie *CALR* u chorych na MPN Ph- została potwierdzona dzięki analizie genomowej próbek pochodzących od dziewięciu pacjentów z pierwotną mielofibrozą i nieobecnyymi mutacjami w obrębie genów *MPL* oraz *JAK2*. W badaniach tych wykazano, że u części pacjentów obecne jest zaburzenie struktury genu *CALR* o charakterze zmiany ramki odczytu, zlokalizowane pod koniec sekwencji kodującej od strony 3' [8, 34]. Jak dotąd u chorych *JAK2*-ujemnych potwierdzono występowanie szeregu mutacji o charakterze insercyjno-delecyjnym, które mimo swojej różnorodności wyróżnia wspólna cecha: zmiana otwartej ramki odczytu (ORF) w obrębie 3'-końcowych kodonów o +2. Oznacza to zastąpienie znajdującego się na C-końcu motywu KDEL białka (sygnału retencji ER) inną sekwencją aminokwasową [8, 34].

Dotychczas nie poznano mechanizmu molekularnego, odpowiedzialnego za nieprawidłową aktywację mielopoetyzy u pacjentów z mutacjami genu *CALR*. Doświadczenia na myszach dowodzą jednak, że fenotyp choroby jest warunkowany w sposób bezpośredni obecnością mutacji. Dowodzi tego rozwój typowych dla MPN Ph- zmian narządowych i w zakresie hematopoetyzy u myszy poddanych transplantacji komórek hematopetycznych, transfekowanych zmutowanym genem *CALR* [54]. Wskazuje to, że mutacja genu *CALR* jest zjawiskiem wczesnym w patogenezie MPN Ph-. Tę hipotezę potwierdzają również badania metodami sekwencjonowania genomowego [34].

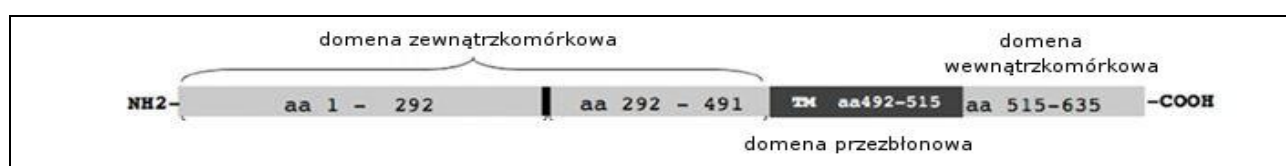
Na podstawie dostępnych danych szacuje się, że częstość występowania mutacji genu *CALR* w nadpłytkowości samoistnej wynosi 25%, zaś w pierwotnej mielofibrozie 35%. Zaobserwowano, że mutacja nie współwystępuje z mutacjami genów *JAK2* i *MPL*. W grupie *JAK2*-ujemnych chorych na ET i PMF częstość występowania wymienionego defektu wynosi odpowiednio 67% i 88% [8].

1.5.3 Gen *MPL*

Gen *MPL*, kodujący receptor dla trombopoetyny (ang. *MyeloProliferative Leukemia protein*), zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 1 (p34). Składa się z 12 egzonów i obejmuje obszar 17 tysięcy par zasad w orientacji nici dodatniej (koordynaty 43337804-43354464 wg sekwencji referencyjnej NC_000001.11) [55]. Gen ulega wysokiej ekspresji niemal wyłącznie w komórkach układu krwiotwórczego, głównie w linii płytkotwórczej [56]. Częsteczki receptora dla trombopoetyny zlokalizowane są w obrębie błony komórkowej [57].

Białko *MPL* należy do klasy hematopoetycznych receptorów cytokinowych o podobnej strukturze aminokwasowej i zbliżonej funkcji w obrębie kaskady JAK-STAT (ryc. 1 i 2). Opisano cztery transkrypty mRNA genu *MPL*. Prawdopodobnie tylko 2 z nich ulegają ekspresji do poziomu białka. Większa izoforma P jest w pełni funkcjonalna. Składa się z 635 aminokwasów, kodujących białko o ciężarze 71 kDa i pI równym 6,03 [58]. Krótsza izoforma białka *MPL* składa się z 579 aminokwasów i ma ciężar 65 kDa. Pozbawiona jest ona domeny kodowanej przez egzon 10, co przypuszczalnie ogranicza jej zdolność do transdukcji sygnału. Obie formy białka ulegają jednak ekspresji równolegle w tym samym czasie [57, 59].

W strukturze *MPL* wyodrębniono trzy domeny: N-kończącą domenę wewnątrzkomórkową hydrofilową, C-kończącą domenę zewnątrzkomórkową hydrofilową, oraz łączącą je domenę przezbłonową o charakterze hydrofobowym, umożliwiającą zakotwiczenie białka w amfipatycznej dwuwarstwie fosfolipidowej (ryc. 6) [60]. Domena zewnątrzkomórkowa jest odpowiedzialna za wiązanie trombopoetyny. Wyróżniono w niej sekwencję wspólną dla różnych hematopoetycznych receptorów cytokinowych [61]. Część wewnątrzkomórkowa odpowiada za przekazywanie sygnału szlakiem JAK-STAT oraz za pośrednictwem kinaz SRC [57, 60]. Domena przezbłonowa jest zaangażowana w dimeryzację receptora i procesy regulacji jego aktywności. Wykazano, że w obrębie tego fragmentu białka znajdują się aminokwasy W515 oraz N505, kluczowe dla procesu aktywacji receptora. Obecność mutacji w obrębie wymienionych kodonów potwierdzono u chorych na MPN Ph- oraz nadpłytkowość rodzinną [60, 62].



Rycina 6: Struktura dominującej izoformy P ludzkiego białka *MPL* [61].

1.5.3.1 Mutacje genu *MPL*

W obrębie sekwencji genu *MPL* wyróżniono kilka typów defektów: 1) sporadyczne mutacje kodonu W515 (egzon 10), typowe dla nadpłytkowości samoistnej oraz pierwotnej mielofibrozy, 2) mutacje kodonu S505 w obrębie egzonu 9, spotykane w nadpłytkowości rodzinnej w populacji kaukaskiej, 3) mutacje występujące w nadpłytkowości rodzinnej związane geograficznie z populacją negroidalną (K39N) i arabską (P106L), 4) mutacje charakterystyczne dla wrodzonej, amegakariocytowej trombocytopenii (CAMT), oraz 5) mutacje o nieznanym roli w patogenezie chorób układu krwiotwórczego. Zmiany występujące w CAMT mają charakter różnorodny. Ich obecność upośledza funkcję białka MPL i nie prowadzi do autoaktywacji receptora MPL [63].

Mutacje w obrębie tryptofanu w pozycji 515 przypuszczalnie zmieniają strukturę ważnego motywu aminokwasowego KWQFP, pełniącego rolę autoinhibitora. Prawidłowa sekwencja wymienionego motywu zapobiega spontanicznej dimeryzacji receptora MPL. Przedstawioną hipotezę potwierdzają wyniki badań *in vitro*, dokumentujące aktywację kaskady JAK-STAT w komórkach z mutacją W515L pod nieobecność trombopoetyny. Dowodzą one niezależnej od obecności liganda aktywacji białka MPL [63].

1.5.4 Geny modyfikujące fenotyp MPN Ph-

Wystąpienie mutacji genów *JAK2*, *CALR* oraz *MPL* jest uważane za wczesne zjawisko w patogenezie MPN Ph-. U znacznego odsetka chorych w fazie początkowej nowotworów mieloproliferacyjnych obserwuje się zwykle obecność pojedynczego klonu komórek nowotworowych, obarczonego jedną z ww. mutacji. Wraz z postępem choroby (stadium fibrotyczne, transformacja blastyczna) dochodzi do ewolucji klonalnej i pojawienia się kilku klonów komórek nowotworowych, z klonem dominującym: *JAK2* V617F, *CALR* lub *MPL*-dodatnim. Wykazano również, że niektóre subpopulacje komórkowe oprócz występowania wymienionych mutacji cechuje także obecność innych defektów molekularnych. Najczęściej mają one charakter „mutacji modyfikujących fenotyp choroby” (ang. „*phenotype-modifying mutations*” /” *epigenetic modifier mutations*”). Wymienia się wśród nich min. mutacje genów *RUNX1*, *ASXL1*, *DNMT3A* *TET2*, *IDH1* oraz *IDH2* [64, 65].

CELE PRACY

ROZDZIAŁ II

CELE PRACY

CELE PRACY

Mutacje genów *JAK2*, *MPL* oraz *CALR* są bezpośrednio zaangażowane w patogenezę nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia ujemnych. Ich obecność jest jednym z kryteriów rozpoznania choroby. Z tego powodu opracowanie odpowiednich metod diagnostycznych, służących do wykrywania obecności defektów molekularnych w obrębie tych genów jest niezwykle ważne. W przyszłości ocena obecności mutacji może także służyć stratyfikacji ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby. W indywidualnych przypadkach odkrycie powiązań pomiędzy występowaniem poszczególnych mutacji a parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi ułatwi także diagnostykę różnicową tej grupy chorób.

Nadrzędnym celem pracy była analiza częstości występowania oraz charakteru mutacji genów *JAK2*, *MPL* oraz *CALR* u pacjentów z określonym typem nowotworu mieloproliferacyjnego Filadelfia ujemnego.

Cele cząstkowe obejmowały:

- ocenę przydatności wybranych technik molekularnych w diagnostyce zmian w obrębie genów *JAK*, *MPL* oraz *CALR*
- optymalizację metod analizy ilościowej obciążenia nieprawidłowym allelem V617F genu *JAK2* oraz *CALR* zgodnie z rekomendacjami *MPN&MPNr Euronet* oraz *European Leukemia Net*
- analizę charakteru zidentyfikowanych defektów genetycznych u poszczególnych chorych z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej, nadpłytkowości samoistnej oraz pierwotnej mielofibrozy
- określenie wpływu obecności zaburzeń molekularnych na manifestację kliniczno-laboratoryjną poszczególnych nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia ujemnych

ROZDZIAŁ III

MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Część doświadczalną pracy doktorskiej przeprowadzono w Pracowni Biologii Molekularnej Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody uczelnianej Komisji Bioetycznej (nr Uchwały 788/14), z poszanowaniem zasad Deklaracji Helsińskiej.

Do badań zakwalifikowano 200 pacjentów, diagnozowanych i leczonych z powodu nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku UM w Poznaniu w latach 2007 – 2013. We wszystkich przypadkach rozpoznanie ustalono w oparciu o kryteria WHO opublikowane w 2008 roku [3]. Podstawą włączenia chorych do badań była kompletność zgromadzonych danych klinicznych, niezbędnych do prawidłowego rozpoznania choroby oraz dostępność materiału genetycznego, pobranego od pacjenta w czasie nie późniejszym niż rok od momentu ustalenia ostatecznego rozpoznania.

Ocenie końcowej poddano 54 (27%) chorych na czerwienicę prawdziwą, 124 (62%) chorych na nadpłytkowość samoistną oraz 22 (11%) z rozpoznaniem pierwotnego zwłóknienia szpiku. Mediana wieku pacjentów w chwili rozpoznania choroby wyniosła 56 lat (zakres 19-83 lat). 82 osoby badane stanowili mężczyźni, a 118 kobiety.

3.1.1 Analizowane parametry kliniczno-laboratoryjne

Oceniono następujące wyjściowe parametry laboratoryjno-kliniczne: stężenie hemoglobiny, hematokryt, liczbę płytek, liczbę leukocytów, stężenie kwasu moczowego i aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi. Wyniki wyrażono w jednostkach międzynarodowych (SI). Analizie poddano także obecność splenomegalii (jeżeli została ona potwierdzona w badaniu przedmiotowym lub w badaniach obrazowych).

Analizy molekularne przeprowadzono w odniesieniu do sekwencji następujących genów: kinazy Janusowej 2 (*JAK2*) – zmiany w obrębie egzonów 12 oraz 14, receptora dla trombopoetyny (*MPL*) - zmiany sekwencji egzonu 10, a także genu kalretikuliny (*CALR*) - defekty egzonu 9. Dodatkowo w przypadku mutacji V617F genu *JAK2* oraz mutacji genu *CALR* wykonano analizę obciążenia nieprawidłowym allelem w komórkach jądrzastych krwi obwodowej. W każdym przypadku, w celu wykluczenia współwystępowania subklonu *BCR-ABL*-dodatniego, wykonano również badanie RT-PCR na obecność tego onkogenu.

3.2. Metody

3.2.1 Izolacja komórek jądrzastych krwi obwodowej

Materiałem do badań było 9 ml krwi obwodowej, pozyskanej z nakłucia żyły odłokciowej. Próbki pobierano do próbek typu Monovette (Sarstedt), zawierających wersenian dwusodowy jako antykoagulant. Pozyskaną krew rozcieńczano hipotonicznym buforem do lizy erytrocytów (LB) w stosunku 1:4,5, a następnie inkubowano na lodzie przez 30 minut. W kolejnym kroku krew wirowano w temperaturze 25 stopni przez 20 minut przy prędkości obrotowej 640 RCF. Supernatant zlewano, a otrzymany osad komórek jądrzastych przemywano buforem lizującym. Po ponownym zwirowaniu i usunięciu supernatantu komórki ponownie zawieszano w 1,2ml buforu LB.

3.2.2 Ekstrakcja całkowitego DNA oraz RNA

Zawiesinę komórek jądrzastych przenoszono do dwóch próbek o objętości 1,5ml typu Eppendorf. Izolację DNA przeprowadzano wykorzystując 0,2ml uzyskanej zawiesiny komórek i zestaw kolumnkowy do izolacji DNA (DNA Blood Mini Kit), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Elucji DNA dokonywano, przepłukując kolumny 0,2ml dołączonego buforu AE. Izolację RNA przeprowadzano wykorzystując 1ml zawiesiny komórek, którą następnie wirowano w temperaturze 25°C przez 2 minuty przy prędkości obrotowej 11180 RCF. Otrzymany osad komórkowy zawieszano w 1ml odczynnika TRIzol. Ekstrakcji RNA dokonano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Po wysuszeniu w temperaturze 65°C przez 5 minut RNA zawieszano w 15µl wody DEPC.

3.2.3 Ocena ilościowa i jakościowa otrzymanych kwasów nukleinowych

Analizę jakościową i ilościową otrzymanego DNA i RNA przeprowadzono z użyciem spektrofotometru kropłowego NanoDrop1000. Oceniano iloraz absorbancji A260/A230 oraz A280/A230 w celu oszacowania odpowiednio czystości organicznej oraz kontaminacji białkowej danej próbki. W badanym materiale dokonywano także pomiaru stężenia kwasów nukleinowych. Do dalszych analiz dopuszczono jedynie izolaty DNA o stężeniu przekraczającym 50ng/µl i czystości organicznej oraz białkowej powyżej 1,6. W przypadku próbek RNA przyjęto, że stężenie kwasu rybonukleinowego powinno wynosić przynajmniej 500ng/µl, a próbki powinna cechować czystość organiczna powyżej 1,2 oraz białkowa powyżej 1,4.

3.2.4 Odwrotna transkrypcja oraz ocena obecności onkogenu *BCR-ABL* metodą RT-PCR

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem zestawu SuperScript Vilo według instrukcji podanej przez producenta. Do reakcji wykorzystywano 2500ng pozyskanego uprzednio RNA.

Po etapie odwrotnej transkrypcji 2 μ l cDNA poddawano reakcji multiplex RT-PCR na obecność onkogenu *BCR-ABL*. Do amplifikacji wykorzystano odczynniki z zestawu PCR Taq Core Kit. Jako kontrolę wewnętrzną poprawności przebiegu reakcji stosowano gen referencyjny ludzkiej beta-glukuronidazy *GUSb*. Reakcję prowadzono równolegle dla próbek badanych, kontroli dodatniej (mieszanina transkryptów *BCR-ABL* e13a2, e14a2 oraz e1a2), kontroli ujemnej (cDNA osoby zdrowej) oraz kontroli bez matrycy cDNA. 5 μ l produktu PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Rozdział prowadzono przez okres 30 minut w buforze SB przy napięciu 180V. Do dokumentacji rozdziałów elektroforetycznych wykorzystywano transiluminator VL Infinity VX2 i oprogramowanie Scion Image. Zestawienie odczynników oraz warunki przebiegu reakcji PCR przedstawiono w tabelach 3 oraz 4. Sekwencje starterów oligonukleotydowych PCR zestawiono w tabeli 5.

Tabela 3: Skład mieszaniny reakcyjnej RT-PCR na obecność onkogenu *BCR-ABL*

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor bezbarwny 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	1
dNTP 10mM	0,5
BCR-b1-A 10mM	0,5
ABL-a3-B 10mM	0,5
BCR-e1-A 10mM	0,5
BCR e6s2 10mM	0,5
BCR c3a 10mM	0,5
GUS_F 10mM	0,25
GUS_R 10mM	0,25
H ₂ O	15,9
Taq (5U/ μ l)	0,1
Matryca (50ng/ μ l)	2

MATERIAŁ I METODY

Tabela 4: Warunki multiplex RT-PCR stosowanej do wykrywania obecności onkogenu *BCR-ABL*

Program	Temperatura	Czas inkubacji
1.Denaturacja wstępna	95°C	30s
2.Denaturacja	94°C	30s
3.Annealing	67°C	60s
4.Elongacja	72°C	60s
Kroki 2-4	35x	
Elongacja końcowa	72°C	5min

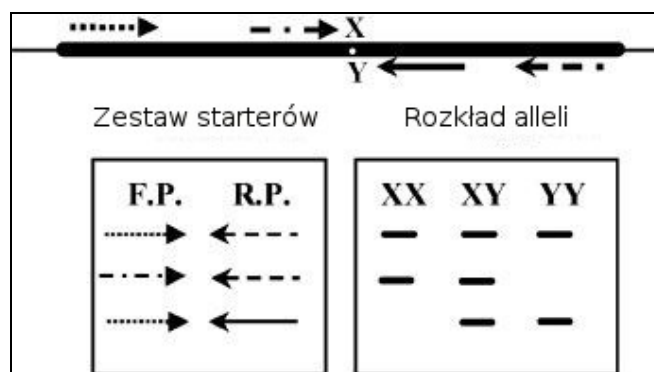
Tabela 5: Startery oligonukleotydydowe wykorzystane w multiplex RT-PCR, stosowanej w celu oceny obecności onkogenu *BCR-ABL*

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydydowa	Uwagi/wielkość amplikonu	Piśmiennictwo
1	GUS_F	5'CCTGTGACCTTTGTGAGCAA 3'	<i>GUSb</i> : 620pz	[66]
2	GUS_R	5'GTCTGCCCGTGAACAGTCCA 3'		
3	BCR-b1-A	5'GAAGTGTTCAGAAAGCTTCTCC 3'	<i>BCR-ABL</i> e13a2: 342pz <i>BCR-ABL</i> e14a2: 417pz	[67]
4	ABL-a3-B	5'GTTTGGGCTTCACACCATTC 3'		
5	BCR-e1-A	5'GACTGCAGCTCCAATGAGAAC 3'	<i>BCR-ABL</i> e1a2: 521pz	[68]
6	BCR e6s2	5 GACTTACCTGAGCCACCTGGAG 3'	<i>BCR-ABL</i> e13a3: 168pz	
7	BCR c3a	5'ACGGCGAGAGCACGGACA3'	<i>BCR-ABL</i> e14a3: 243	

3.2.5 Wykrywanie obecności mutacji V617F genu *JAK2* metodą jakościową ARMS-PCR

Metoda ARMS-PCR (ang. *Amplification Refractory Mutation System*) jest modyfikacją klasycznej łańcuchowej reakcji polimerazy. Stosuje się w niej 2 startery allelospecyficzne, jeden komplementarny do sekwencji typu dzikiego, usytuowany w orientacji dodatniej na nici wiodącej, drugi do sekwencji zmutowanej, znajdujący się w orientacji ujemnej na nici opóźnionej. Oba oligonukleotydy cechuje „niesparowanie” w pozycji -2 licząc od końca 3'. Jego obecność zwiększa specyficzność reakcji. W technice ARMS-PCR dodatkowo używana jest para starterów zewnętrznych, będących jednocześnie partnerami dla starterów allelospecyficznych. W takim układzie podczas amplifikacji dochodzi jednocześnie do syntezy produktu prawidłowego (typu dzikiego), produktu zawierającego mutację (jeżeli występuje), a także amplikonu kontrolnego. Schemat reakcji przedstawiono na rycinie 7.

MATERIAŁ I METODY



Rycina 7: Schemat ARMS-PCR i układ produktów PCR po rozdziale na żelu agarozowym. F.P – starter „forward”, R.P– starter „reverse”, X, Y- allele badanego genu.

ARMS-PCR prowadzono z użyciem odczynników PCR Taq Core Kit firmy QIAGEN. Do reakcji wykorzystywano 50ng genomowego DNA. Uzyskane produkty PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym (warunki rozdziału opisano w sekcji 3.2.4) lub stosując elektroforezę kapilarną QIAxcel Screening zgodnie z ustawieniami fabrycznymi urządzenia. Zestawienie odczynników oraz warunki PCR przedstawiono w tabelach 6 oraz 7, a sekwencje starterów oligonukleotydowych w tabeli 8.

Tabela 6: Odczynniki wykorzystywane do ARMS-PCR, stosowanej w celu wykrywania obecności mutacji V617F genu *JAK2*.

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor Coral Load 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	0,5
dNTP 10mM	3
Primer FO 10mM	2,5
Primer RO 10mM	2,5
Primer Fwt 10mM	1,25
Primer Rmut 10mM	1,25
H ₂ O	10,4
Taq (5U/ μ l)	0,1
Matryca (50ng/ μ l)	1

MATERIAŁ I METODY

Tabela 7: Warunki ARMS-PCR stosowanej do wykrywania obecności mutacji V617F genu *JAK2*.

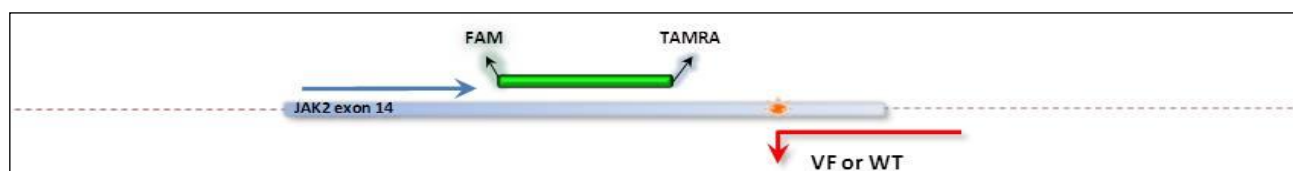
Program	Temperatura	Czas inkubacji
1.Denaturacja wstępna	95°C	5 min
2.Denaturacja	95°C	30s
3.Annealing	60°C	30s
4.Elongacja	72°C	40s
Kroki 2-4 x30		
Elongacja końcowa	72°C	5 min

Tabela 8: Startery oligonukleotydowe ARMS-PCR stosowanej do wykrywania obecności mutacji V617F genu *JAK2*.

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość amplikonu	Piśmiennictwo
1	JAK2-FO	5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3';	<i>JAK2</i> kontrola: 463pz <i>JAK2</i> typ dziki: 229pz <i>JAK2</i> V617F: 279pz	[5]
2	JAK2-RO	5'-ATTGCTTTCCTTTTTTACAAAGAT-3'		
3	JAK2-Fwt	5'-GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG-3		
4	JAK2-Rmt	5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAaAA-3'		

3.2.6 Ilościowa ocena obciążenia allelem V617F genu *JAK2* z użyciem metody AS RQ-PCR

Metoda AS RQ-PCR (ang. *Allele Specific Real-Time Quantitative PCR*) do ilościowej oceny obciążenia allelem V617F genu *JAK2* jest modyfikacją klasycznej reakcji RQ-PCR. W reakcji ocenie podlega jednocześnie liczba kopii cząsteczek DNA *JAK2* typu dzikiego oraz cząsteczek z obecną mutacją V617F. Metoda pozwala na odrębną ocenę liczby kopii dla obu alleli przy zachowaniu identycznej kinetyki zachodzących reakcji. Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu wspólnej sondy molekularnej typu TaqMan, jednego wspólnego startera oraz dwóch starterów o tej samej wielkości, lokalizacji i orientacji, różniących się jednak końcowym nukleotydem 3'. Ideowy schemat tak prowadzonej reakcji przedstawia rycina 8.



Rycina 8: Schemat AS RQ-PCR. Kolorem zielonym oznaczono sondę molekularną typu TaqMan, kolorem czerwonym dwa startery dla wariantów *JAK2* typu dzikiego i V617F [1]. FAM – 6-karboksyfluoresceina, TAMRA – karboksytetrametylorodamina.

MATERIAŁ I METODY

Oznaczenia AS RQ-PCR przeprowadzono według tzw. protokołu Larsena z użyciem odczynników PCR Taq Core Kit firmy QIAgen [1]. Do reakcji wykorzystywano 50ng genomowego DNA. Amplifikację przeprowadzono z użyciem termocyklera Real-Time PCR QIAgen Rotorgene Q. Zestawienie odczynników oraz warunki PCR przedstawiono w tabelach 9. oraz 10. Sekwencje starterów oligonukleotydowych przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 9: Odczynniki wykorzystywane do AS RQ-PCR wg zmodyfikowanego protokołu Larsena [1]

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor bezbarwny 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	0,5
dNTP 10mM	3
Larsen_F 10mM	0,75
Larsen Rwt lub Larsen Rm 10mM	0,75
Sonda Larsen_P	0,5
H ₂ O	8,9
Taq (5U/ μ l)	0,1
Matryca (5ng/ μ l)	10

Tabela 10 Warunki AS RQ-PCR wg protokołu Larsena

Program	Czas	Temperatura (°C)	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	10 minut	95	1
Denaturacja	15 sekund	95	50
Amplifikacja	60 sekund	60	

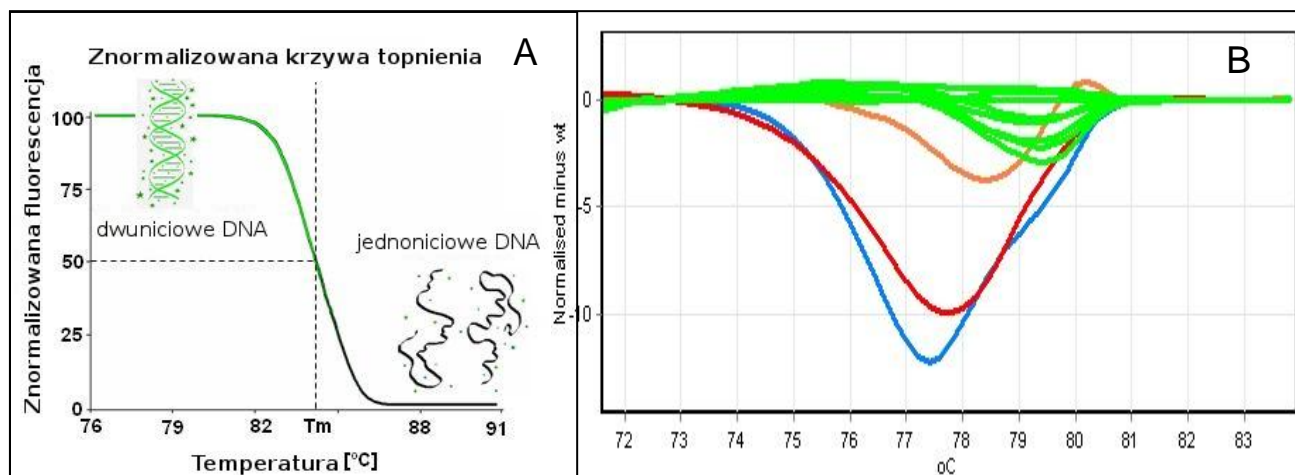
Tabela 11 Startery oligonukleotydowe wykorzystane do ilościowej analizy obciążenia allelem V617F genu *JAK2*

Lp.	Nazwa sondy/ startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość amplikonu	Písmien-nictwo
1	Larsen_F	5'-CTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA-3'	JAK2 typ dziki: 101pz JAK2 V617F: 101pz	[1]
2	Larsen_Rwt	5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAC-3'		
3	Larsen_Rmut	5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACATAA-3'		
4	Larsen_P	5'-Fam-TGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTGGTTT-Tamra-3'		

3.2.7 Wykrywanie obecności mutacji *JAK2* w obrębie egzonu 12 metodą wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia

Ocena obecności mutacji z wykorzystaniem metody wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (HRMA) polega na amplifikacji fragmentu DNA z udziałem niespecyficznego barwnika fluorescencyjnego o wysokim powinowactwie do dwuniciowego DNA. Po zakończonej PCR następuje etap powolnego podgrzewania ($0,1^{\circ}\text{C}/1$ sekundę) wysyconego barwnikiem dwuniciowego produktu amplifikacji. Podczas podwyższania temperatury dochodzi do stopniowego rozplątania się nici DNA. Fragment DNA ulega denaturacji z chwilą osiągnięcia tzw. temperatury topnienia (T_m). Przejawia się to nagłym spadkiem intensywności fluorescencji, wywołanym uwolnieniem związanego barwnika przez rozplatające się nici matrycy. Należy nadmienić, że temperatura topnienia jest specyficzna dla określonej cząsteczki DNA i ma związek z jej długością oraz sekwencją nukleotydową. W związku z tym każda zmiana w strukturze cząsteczki (mutacja lub polimorfizm) wywołuje zmiany w profilu topnienia w stosunku do matrycy referencyjnej. Dynamikę spadku fluorescencji w czasie trwania reakcji można zobrazować w postaci pochodnej spadku fluorescencji po czasie (tzw. krzywej topnienia) i porównać dla każdej z badanych prób. Wszelkie odchylenia od wzorcowego przebiegu krzywej mogą świadczyć o obecności w próbce mutacji lub polimorfizmu [69].

Metodę HRMA cechuje wysoka czułość detekcji mutacji, określana na od 1 do 5% zawartości nieprawidłowego allelu. W celu zwiększenia specyficzności reakcji HRMA wykonuje się ją w trzech powtórzeniach, a każdy stwierdzony nietypowy wynik weryfikuje się metodą sekwencjonowania sangerowskiego. Schemat reakcji HRMA oraz przykład analizy krzywych topnienia przedstawia rycina 9.



Rycina 9: Przebieg reakcji HRMA

A: Schemat kinetyki reakcji HRMA, obrazujący postęp denaturacji produktu PCR i równoczesny spadek fluorescencji w czasie podwyższania temperatury.

B: Znormalizowany wynik reakcji HRMA na obecność mutacji *JAK2* w obrębie sekwencji egzonu 12. Próbkę typu dzikiego oznaczono kolorem zielonym, polimorfizm rs10974944 kolorem pomarańczowym, mutacje *JAK2* egzonu 12 g.1627_1632del oraz g.1624-1629del (p.H538-K539insL oraz E543-D544del) odpowiednio kolorami niebieskim i czerwonym.

Potwierdzenia obecności mutacji w obrębie egzonu 12 genu *JAK2* dokonywano wykorzystując zestaw Bioline HRM Sensimix na aparaturze QIAgen Rotorgene Q. Dla zapewnienia wysokiej specyficzności, reakcje przeprowadzano w trzech powtórzeniach. Normalizację wykonano w oparciu o oprogramowanie urządzenia Rotorgene Q. Zakresy normalizacji obejmowały temperatury 71-72°C oraz 82-83°C. W analizie statystycznej jako próg ufności dla wariantu typu dzikiego przyjęto wartość 90%.

Zestawienie odczynników oraz warunki PCR przedstawiono w tabelach 12 oraz 13. Sekwencje starterów oligonukleotydowych podano w tabeli 14.

Tabela 12: Odczynniki wykorzystywane do PCR do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 12 genu *JAK2*

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor 5x	2
Barwnik Eva Green	1
MgCl ₂ 25mM	0,4
hrm JAK2-F 10mM	0,3
hrmJAK2-R 10mM	0,3
H ₂ O	2
Matryca (25ng/ μ l)	1

MATERIAŁ I METODY

Tabela 13: Warunki reakcji HRMA do analizy obecności mutacji *JAK2* egzonu 12.

Program	Temperatura	Czas	Uwagi
1.Denaturacja wstępna	95°C	10 minut	
2.Denaturacja	95°C	15 sekund	
4.Elongacja	60°C	15 sekund	Odczyt kanału zielonego
Kroki 2-4 x40			
HRM	60-92°C	0,1°C / 1 sekunda	

Tabela 14: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 12 genu *JAK2*.

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość amplikonu	Piśmien-nictwo
1	hrm JAK2-F	5' ACCAACCTCACCAACATTACAGAG 3'	JAK2 typ dziki: 184pz	[69]
2	hrmJAK2-R	5' AAAAGGACAAAAAAGACAGTAATGAGTATC 3'	JAK2 allel zmutowany: różna w zależności od typu mutacji	

3.2.8 Wykrywanie obecności innych niż V617F zmian sekwencji nukleotydowej w obrębie egzonu 14 genu *JAK2* metodą HRMA

W celu identyfikacji obecności rzadkich mutacji *JAK2* egzonu 14 zaprojektowano dodatkową parę starterów PCR przy pomocy oprogramowania Primer Select z pakietu LaserGene 10. Warunki reakcji HRMA oraz skład odczynnikowy mieszaniny PCR były takie same jak w przypadku analizy obecności mutacji egzonu 12 genu *JAK2* (podrozdział 3.2.7). Sekwencje starterów zawarto w tabeli 15.

Tabela 15: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 14 genu *JAK2*.

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość amplikonu	Piśmien-nictwo
1	JAK2x14-F	5' GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCA 3'	<i>JAK2</i> typ dziki: 87pz <i>JAK2</i> allel zmutowany: 87pz	Metodyka własna
	JAK2x14-R	5' GCAAGTATGATGAGCAAGCTTT 3'		

3.2.9 Analiza obecności mutacji w obrębie egzonu 10 genu *MPL* metodą HRMA

Weryfikację obecności defektów genu *MPL* w obrębie egzonu 10 przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Bioline HRM Sensimix i aparatu QIAgen Rotorgene Q. W celu zapewnienia wysokiej specyficzności reakcje wykonywano w trzech powtórzeniach. Normalizację przeprowadzano w oparciu o oprogramowanie urządzenia Rotorgene Q. Zakresy normalizacji obejmowały temperatury 80-81°C oraz 85-86°C. W analizie statystycznej jako próg ufności dla wariantu typu dzikiego przyjęto wartość 95%.

Zestawienie odczynników oraz warunki PCR przedstawiono w tabelach 16 oraz 17. Sekwencje starterów oligonukleotydowych podano w tabeli 18.

Tabela 16: Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do analizy obecności defektów molekularnych w obrębie egzonu 10 genu *MPL*.

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor 5x	2
Barwnik Eva Green	1
MgCl ₂ 25mM	0,4
hrm MPL-F 10mM	0,3
hrm MPL-R 10mM	0,3
H ₂ O	2
Matryca (25ng/ μ l)	1

Tabela 17: Warunki reakcji HRMA wykorzystywanej w celu oceny obecności mutacji genu *MPL* w obrębie egzonu 10.

Program	Temperatura	Czas	Uwagi
1.Denaturacja wstępna	95°C	10 minut	
2.Denaturacja	95°C	15 sekund	
4.Elongacja	60°C	15 sekund	Odczyt kanału zielonego
Kroki 2-4 x40			
HRM	60-92°C	0,1°C / 1 sekunda	

Tabela 18: Startery oligonukleotydowe wykorzystywane do analizy obecności defektów molekularnych genu *MPL* w obrębie egzonu 10.

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość ampliconu	Piśmien- nictwo
1	hrm MPL-F	5' TAGCCTGGATCTCCTTGGTG 3'	<i>MPL</i> typ dziki: 107pz <i>MPL</i> allel zmutowany: 107pz	[70]
2	hrm MPL-R	5' GCGGTACCTGTAGTGTGCAG 3'		

3.2.10 Wykrywanie obecności mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9 metodą HRMA

Wykrywanie obecności mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9 metodą HRMA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Bioline HRM Sensimix na aparaturze QIAgen Rotorgene Q. Reakcje wykonywano w trzech powtórzeniach dla zapewnienia wysokiej specyficzności. Normalizację przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie urządzenia Rotorgene Q. Zakresy normalizacji obejmowały temperatury 80-81°C oraz 85-86°C. W analizie statystycznej jako próg ufności dla wariantu typu dzikiego przyjęto wartość 95%.

Zestawienie odczynników oraz warunki reakcji PCR przedstawiono w tabelach 19 oraz 20. Sekwencje starterów oligonukleotydowych podano w tabeli 21.

Tabela 19: Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej do analizy obecności mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9.

Odczynnik	Objętość [μ l]
Bufor bezbarwny 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	1
dNTP 10mM	0,5
Q solution 5x	5
DMSO	1,2
CALR-F	0,5
CALR-R	0,5
H ₂ O	12,7
Taq (5U/ μ l)	0,1
Matryca (5ng/ μ l)	1

Tabela 20: Warunki reakcji HRMA służącej do analizy obecności mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9.

Program	Temperatura	Czas	Uwagi
1.Denaturacja wstępna	95°C	10 minut	
2.Denaturacja	95°C	15 sekund	
4.Elongacja	60°C	15 sekund	Odczyt kanału zielonego
Kroki 2-4 x40			
HRM	60-92°C	0,1°C / 1 sekunda	

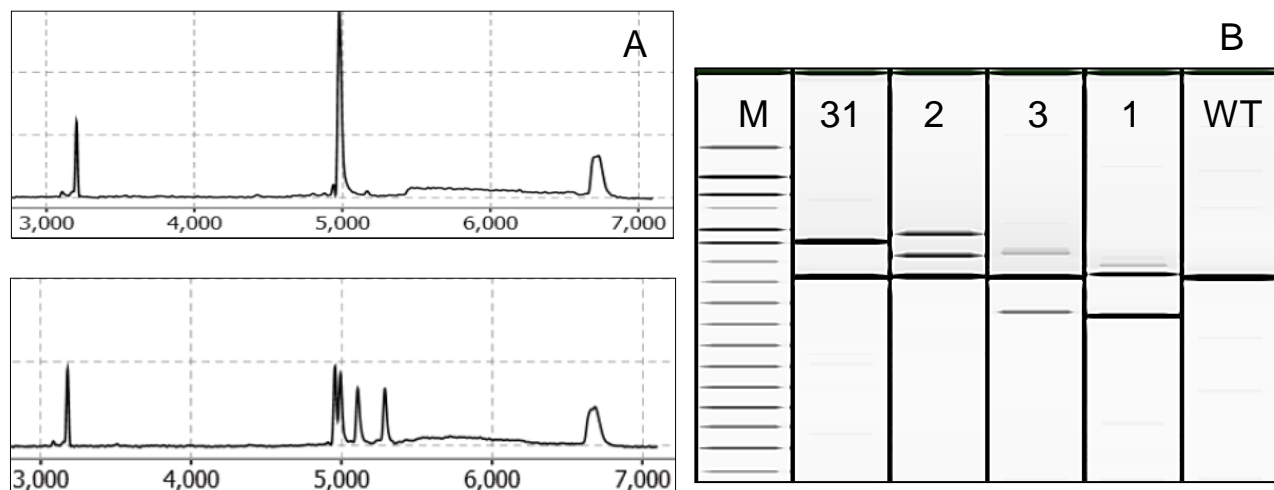
Tabela 21: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa	Uwagi / wielkość amplikonu	Piśmien- nictwo
1	CALR-F	5' GGCAAGGCCCTGAGGTGT 3'	<i>CALR</i> typ dziki: 265pz	[8]
2	CALR-R	5'GGCCTCAGTCCAGCCCTG 3'	<i>CALR</i> allel zmutowany: różna w zależności od typu mutacji	

3.2.11 Półilościowa ocena obciążenia nieprawidłowym allelem *CALR* egzonu 9 metodą elektroforezy kapilarnej

W celu określenia typu mutacji oraz półilościowej oceny obciążenia nieprawidłowym allelem genu *CALR* przeprowadzano elektroforezę kapilarną (ang. CE, *capillary electrophoresis*) produktów HRM z wykorzystaniem urządzenia QIAgen QIAxcel. Mutacje genu *CALR* najczęściej mają charakter defektów insercyjno-delecyjnych, dlatego możliwe jest ich odróżnienie od typu dzikiego na podstawie elektroforegramu o wysokiej rozdzielczości. Podczas analiz posłużono się kasetą QIAxcel High Resolution, która pozwala na rozdział produktów amplifikacji o wielkości 50-1000pz z rozdzielczością do 3pz. Wynik elektroforezy ma formę wirtualnego żelu oraz zestawu elektroforegramów. Dołączone do urządzenia oprogramowanie umożliwia procentową ocenę półilościową zawartości określonego produktu PCR w ocenianej próbce. W tym celu obliczana jest całka oznaczona z pola pod krzywą piku w elektroforegramie (tzw. analiza AUC, ang. *Area Under the Curve*). Analizę taką przeprowadzono dla wszystkich próbek, w których stwierdzono nietypowy profil topnienia metodą HRMA.

Przykładowy wynik analizy CE w próbce zawierającej mutację genu *CALR* przedstawiono na rycinie 10.



Rycina 10 Rozdział produktów amplifikacji badanego fragmentu genu *CALR* metodą elektroforezy kapilarnej

A: Porównanie elektroforegramów próbki typu dzikiego oraz próbki z obecną mutacją *CALR* (typu 2).

B: Wirtualny żel obrazujący różnice w rozdziale elektroforetycznym produktów amplifikacji *CALR* typu dzikiego (WT) oraz czterech różnych mutacji (typ 1,2,3 oraz 31). Symbolem M oznaczono molekularny marker wielkości.

3.2.12 Charakterystyka typów mutacji genów *JAK2*, *CALR* oraz *MPL* metodą sekwencjonowania sangerowskiego

Sekwencjonowanie genów metodą Sangera jest obecnie uważane za referencyjną technikę służącą do detekcji i charakteryzowania mutacji w genetyce medycznej. Pozwala ona na zdefiniowanie mutacji o nieznanym charakterze, zarówno zmian typu substytucji jak i mutacji insercyjno-delecyjnych. Jest więc szczególnie przydatna do poszukiwania zmian genetycznych lokalizujących się w różnych pozycjach nukleotydowych tego samego egzonu. Do takich mutacji należą defekty genów *CALR*, *MPL* oraz *JAK2*. Uważa się, że techniki przesiewowe, takie jak HRMA oraz CE, mogą jedynie sugerować obecność mutacji. W większości przypadków nie pozwalają one bowiem na określenie ich rodzaju. Wadą sekwencjonowania sangerowskiego jest z kolei niska czułość detekcji w porównaniu z techniką HRMA, szacowana jedynie na 10-20% zmutowanego allelu [71].

Do analizy metodą sekwencjonowania wykorzystano produkty amplifikacji uzyskane techniką HRMA. 30µl próbki otrzymanej w wyniku połączenia objętości trzech powtórzeń reakcji HRM oczyszczano przy pomocy zestawu QIAgen QIAquick PCR Purification Kit zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Końcową elucję przeprowadzono stosując 25µl buforu EB, dołączonego do zestawu. W celu określenia wydajności tak przeprowadzonego

MATERIAŁ I METODY

procesu oczyszczania, próbki poddawano każdorazowo elektroforezie na 1% żelu agarozowym (warunki procesu rozdziału opisano w podrozdziale 3.2.4).

Sekwencjonowanie metodą Sangera wykonywano w Wydziałowej Pracowni Sekwencjonowania przy Wydziale Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Znakowanie wykonano z zastosowaniem zestawu BigDye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems). Uzyskane w ten sposób próbki poddawano reamplifikacji z wykorzystaniem tych samych starterów PCR, których używano podczas reakcji HRMA (podrozdziały 3.2.7-3.2.9).

Analizę sekwencji przeprowadzono z użyciem modułu SeqMan aplikacji Lasergene 8. Otrzymane sekwenogramy porównywano, korzystając z odpowiedniej sekwencji referencyjnej (tabela 22). Obecność mutacji/polimorfizmu uznawano za pewną, jeżeli uzyskana sekwencja różniła się od sekwencji referencyjnej, oraz jeśli zmiana występowała zarówno w odczycie ze startera *forward* jak i ze startera *reverse*. Mutacje opisywano w notacji nukleotydowej oraz aminokwasowej zgodnie z wytycznymi Human Genome Variation Society na rok 2014. Zidentyfikowane mutacje porównywano z repozytorium nowotworowych zmian somatycznych COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*) [48]

Tabela 22 Sekwencje referencyjne ludzkiego genomu, wykorzystane do identyfikacji mutacji w programie SeqMan.

Lp	Nazwa genu	Sekwencja referencyjna	Zakres nukleotydów	Obowiązująca wersja sekwencji
1	<i>JAK2</i>	NG_009904.1	5001..147939	3.05.2014
2	<i>MPL</i>	NG_007525.1	5001..21661	29.07.2014
3	<i>CALR</i>	NG_029662.1	5001..10891	05-07-2014

3.2.13 Interpretacja wyników badań molekularnych

W przypadku oznaczeń molekularnych mutacji V617F genu *JAK2* za wynik dodatni uznawano potwierdzenie jej obecności w próbce analizowanej metodą jakościową. W przypadku pozostałych oznaczeń przyjęto, że wynik oceny należy uznać za dodatni, jeżeli obecność defektu zostanie potwierdzona za pomocą metody HRMA i/lub elektroforezy kapilarnej.

3.3 Odczynniki i aparatura badawcza

3.3.1 Wykaz użytych odczynników

Tabela 23: Wykaz użytych odczynników

L.p.	Pełna nazwa odczynnika	Producent
1	Agaroza <i>BioReagent low EEO</i>	SIGMA-ALDRICH
2	Alkohol izopropylowy	MERCK
3	Alkohol etylowy 96%	MERCK
4	Chlorek amonu	MERCK
5	Chloroform	MERCK
6	Dimetylosulfotlenek	SIGMA-ALDRICH
7	QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
8	EvaGreen HRM Dye	Biotium
9	GelStar	LONZA
10	Kwas borowy	MERCK
11	QIAxcel High Resolution Cartridge	QIAGEN
12	QIAxcel Alignment Marker 1000bp	QIAGEN
13	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
14	Sensimix HRM Kit	Bioline
15	Sondy typu TaqMan	Genomed
16	Startery oligonukleotydowe	Genomed
17	Superscript VILO	Life Technologies
18	Taq PCR Core Kit	QIAGEN
19	TRIzol	Life Technologies
20	Wersenian dwusodowy	SIGMA-ALDRICH
21	Woda dejonizowana	MILIPORE
22	Woda dietylopiranowęglanowana, wolna od RNA-z	Life Technologies
23	Wodorotlenek sodu	MERCK
24	Wodorowęglan potasu	SIGMA-ALDRICH

3.3.2 Wykorzystywana aparatura

Tabela 24: Wykorzystywana aparatura

L.p.	Nazwa urządzenia	Funkcja	Producent
1	DELFIN AG10	Aparat do elektroforezy agarozowej	DNA Gdańsk
2	Mastercycler EP Gradient S	Termocykler	Eppendorf
3	Multipette X-Stream	Dyspenser elektroniczny	Eppendorf
4	NanoDrop ND-1000	Spektrometr kroplowy	THERMO Scientific
5	QIAxcel	System do elektroforezy kapilarnej	QIAGEN
6	Rotorgene Q	Termocykler do RQ-PCR oraz analizy HRM	QIAGEN
7	Thermomixer Comfort	Blok grzewczy	Eppendorf
8	Wirówka Universal 32R	Wirówka	Hettich
9	Wirówka Universal 320R	Wirówka	Hettich
10	VL Infinity VX2	Transiluminator	Vilber Lourmat

3.3.3 Bufory sporządzone samodzielnie

Tabela 25: Bufory sporządzone samodzielnie

L.p.	Nazwa buforu	Składnik	Molarność
1.	Bufor lizujący LB stężony 10x	Chlorek amonu	155mM
		Wodorowęglan potasu	10mM
		EDTA	0,1mM
		H ₂ O dejonizowana	do objętości końcowej
2.	Bufor do elektroforezy SB stężony 20x	Kwas borowy	730mM
		Wodorotlenek sodu	50mM
		H ₂ O dejonizowana	do objętości końcowej

3.3.4 Materiały referencyjne i standardy molekularne

Tabela 26: Materiały referencyjne i standardy molekularne

L.p.	Typ materiału referencyjnego	Wytwórca
1	Kontrola amplifikacji genu <i>BCR-ABL</i> - mieszanina transkryptów e13a2, e14a2 oraz e1a2	Wykonano we własnym zakresie
2	Materiał referencyjny <i>JAK2</i> V617F- DNA linii komórkowej UKE-1	Laboratorium Referencyjne MPN&MPNr Euronet, Vejle, Dania
3	Materiał referencyjny <i>CALR</i> z mutacją typu 1 : DNA pacjenta rozcieńczone do 5% obciążenia allelem	Wykonano we własnym zakresie
4	Materiał referencyjny <i>CALR</i> z mutacją typu 2 : DNA pacjenta rozcieńczone do 5% obciążenia allelem	Wykonano we własnym zakresie
5	Materiał referencyjny <i>JAK2</i> egzonu 12: polimorfizm SNP rs10974944 rozcieńczony do 5% obciążenia allelem	Wykonano we własnym zakresie
6	Materiał referencyjny <i>MPL</i> W515L, obciążenie allelem 5%	Laboratorium Referencyjne MPN&MPNr Euronet, Vejle, Dania
7	Materiał referencyjny <i>MPL</i> W515K, obciążenie allelem 5%	Laboratorium Referencyjne MPN&MPNr Euronet, Vejle, Dania
8	Materiał referencyjny typu dzikiego – mieszanina DNA zdrowych dawców szpiku	Wykonano we własnym zakresie
9	Referencyjny zestaw odczynników do oceny obciążenia allelem <i>JAK2</i> V617F metodą Larsena	Laboratorium Referencyjne MPN&MPNr Euronet, Vejle, Dania
10	Zestaw standardów kalibracyjnych do oceny obciążenia allelem <i>JAK2</i> V617F	Laboratorium Referencyjne MPN&MPNr Euronet, Vejle, Dania

3.4 Analiza statystyczna wyników

Analiza statystyczna została wykonana z użyciem oprogramowania Statsoft Statistica w wersji 10.0 oraz Microsoft Excel 2010.

Znaczną część zebranych wyników badań eksperymentalnych cechował rozkład odbiegający od rozkładu normalnego, stąd w analizach wykorzystano następujące testy statystyczne:

- nieparametryczny test ANOVA Kruskal-Wallis
- testy post-hoc metodą wielokrotnych porównań średnich rang
- test U Manna-Whitneya
- test korelacji rang Spearmana.

WYNIKI

ROZDZIAŁ IV

WYNIKI

WYNIKI

4.1. Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna grupy badanej

W całej grupie badanej stwierdzono występowanie dużych różnic w zakresie następujących parametrów: hematokrytu, stężenia hemoglobiny, liczby płytek krwi oraz leukocytów, co związane było ze zróżnicowaną manifestacją kliniczną MPN. Szczegółowe zestawienie wartości analizowanych parametrów w grupie badanej przedstawia tabela 27

Tabela 27: Charakterystyka grupy badanej pod kątem ocenianych podstawowych parametrów kliniczno-laboratoryjnych.

Analizowany parametr	Czerwienica prawdziwa	Nadpłytkowość samoistna	Pierwotne zwłóknienie szpiku	Cała grupa
Liczba pacjentów [%]	54 (27)	124 (62)	22 (11)	200 (100%)
Mężczyźni/kobiety, n (%M//%K)	25/29 (46/54)	44/80 (36/64)	13/9 (59/41)	82/118 (41/59)
Mediana wieku w momencie diagnozy (zakres)	58,5 (19-83)	55,5 (23-83)	56 (24-78)	56 (19-83)
Średnie stężenie hemoglobiny [mmol/l] (zakres)	11,04 (4,3-13,84)	8,94 (6,08-12)	6,46 (3,89-8,3)	9,24 (3,89-13,84)
Średni hematokryt [%] (zakres)	54 (31-70)	43 (28-59)	30 (18-38)	44 (18-70)
Mediana liczby płytek krwi [$10^9/l$] (zakres)	423 (112-1178)	791,5 (164-2080)	204,5 (59-1392)	658,5 (59/2080)
Mediana liczby leukocytów [$10^9/l$], (zakres)	10,5 (1,6-49,2)	9,9 (31,28,8)	8,7 (1,6-83,4)	9,9 (1,6-83,4)
Normosplenizm/splenomegalia (% splenomegalii)	32/22 (41)	102/22 (18)	5/17 (77)	139/61 (30)
Aktywność dehydrogenazy mleczanowej w osoczu [U/l]	340 (161-818)	262 (152-637)	700 (183-2730)	361 (152-2730)
Stężenie kwasu moczowego w osoczu [$\mu\text{mol/l}$]	336 (160-558)	306 (143-636)	362 (126-674)	319 (124-674)

WYNIKI

4.2. Analiza obecności mutacji i obciążenia nieprawidłowym allelem

Wszystkie próbki pochodzące od pacjentów zostały poddane badaniu metodami molekularnymi na obecność mutacji genów *JAK2*, *MPL* oraz *CALR* oraz analizie obciążenia nieprawidłowym allelem w odniesieniu do *JAK2* V617F oraz defektów genu *CALR*. Ze względu na sporadyczne występowanie mutacji *JAK2* egzonu 12 oraz mutacji *MPL* egzonu 10 i trudności metodologiczne, nie było możliwe wykonanie analogicznych oznaczeń ilościowych w ich przypadku.

W ocenianej grupie pacjentów potwierdzono występowanie 131 mutacji V617F w obrębie egzonu 14 genu *JAK2*, 3 mutacji delecyjnych w obrębie egzonu 12 genu *JAK2*, 26 mutacji genu *CALR* oraz 2 mutacji genu *MPL* w obrębie kodonu W515. Nie stwierdzono obecności innych niż V617F defektów w obrębie egzonu 14 genu *JAK2*. U żadnego z chorych nie potwierdzono współwystępowania kilku mutacji.

U osób z obecnością defektu V617F genu *JAK2* średnie obciążenie allelem wyniosło 17%, natomiast w przypadku mutacji genu *CALR* 34% (średnia dla wszystkich typów mutacji). Szczegółowe zestawienie wykrytych defektów molekularnych przedstawiono w tabeli 28

Tabela 28: Szczegółowe zestawienie defektów molekularnych, których obecność potwierdzono w grupie badanej.

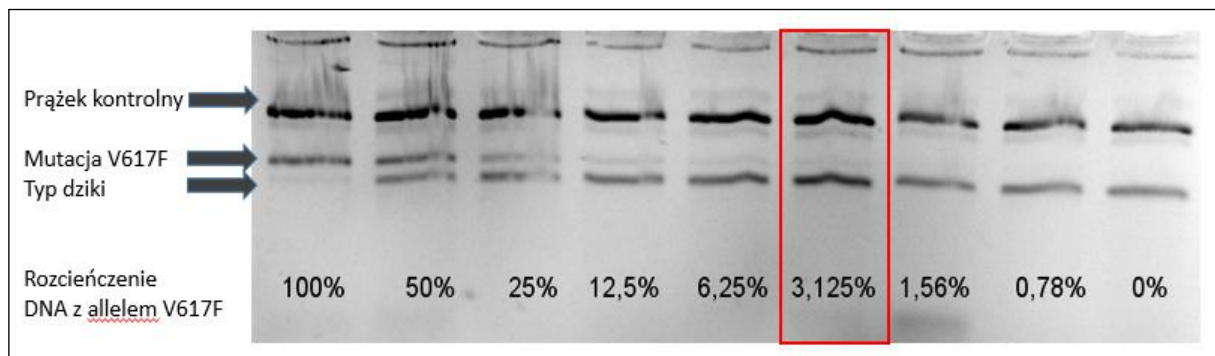
Gen	Egzon	Mutacja	Zmiana na poziomie białka	PV, (n)	ET, (n)	PMF, (n)	Cała grupa badana (n)	Wartość średnia obciążenia allelem, % (zakres)
<i>JAK2</i>	14	g.1849G>T	V617F	52	72	8	131	35 (3-97)
	12	g.1627_1632 del	E543_D544del	1	0	0	1	b/d
		g.1624-1629 del	N542_E543del	1	0	0	1	b/d
<i>MPL</i>	10	g.1544G>T	W515L	0	1	1	2	b/d
<i>CALR</i>	9	g.1092_1143del (typ 1)	L367fs	0	8	5	13	42 (2-60)
		g.1154_1155insTTGTC (typ 2)	K385fs	0	6	3	9	36 (12-76)
		g.1095_1140del (typ 3)	K368fs	0	2	0	2	27 (13-42)
		g.1151A>G; 1154_1155insTTGTC (typ 31)	K385fs	0	1	0	1	19
		g.1154delinsCTTGTC (typ 34)	K385fs	0	1	0	1	35

4.2.1 Jakościowa i ilościowa ocena mutacji *JAK2* V617F

4.2.1.1 Optymalizacja jakościowych i ilościowych oznaczeń molekularnych

Obecność mutacji V617F genu *JAK2* śledzono wykorzystując metodę ARMS-PCR. Optymalizację stężeń starterów oraz określenie progu detekcji metody przeprowadzono wykonując serię dwukrotnych rozcieńczeń materiału referencyjnego pochodzącego z linii komórkowej UKE-1. DNA referencyjny UKE-1, zawierający 100% zmutowanego allelu *JAK2*, rozcieńczano w DNA typu dzikiego o tym samym stężeniu 50ng/μl. Otrzymano serię 8 rozcieńczeń: 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:8 (12,5%), 1:16 (6,25%), 1:32 (3,13%), 1:64 (1,56%) oraz 1:128 (0,78%). Próg detekcji testu określono metodą wizualną porównując 2 metody: elektroforezę kapilarną Qiaxcel HR oraz elektroforezę agarozową z barwnikiem GelStar.

Wyniki otrzymane obiema metodami były zbieżne – ostatnim rozcieńczeniem, w którym udało się wykazać obecność mutacji było rozcieńczenie 32-krotne, odpowiadające obecności ok. 3% allelu V617F. Wynik procesu optymalizacji przedstawiono na rycinie 11



Rycina 11: Wyniki procesu optymalizacji zastosowanej metody ARMS-PCR.

Elektroforeza produktów PCR w żelu agarozowym. Kolorem czerwonym zaznaczono najwyższe rozcieńczenie, pozwalające na potwierdzenie obecności mutacji V617F genu *JAK2*.

W celu walidacji stosowanej metody oceny obciążenia nieprawidłowym allelem *JAK2* porównano dwie techniki analizy ilościowej RQ-PCR, wg Lipperta [72] oraz wg Larsena [1]. Porównania dokonano wykorzystując materiały referencyjne zawierające znaną liczbę kopii DNA typu dzikiego oraz zmutowanego w pozycji V617F genu *JAK2*. Analizowano parametry zmienności uzyskanych wyników (średni współczynnik zmienności dla serii trzech pomiarów w trzech powtórzeniach) oraz ich dokładności wobec wartości deklarowanych, wyrażoną jako średnia niepewność pomiaru wobec wyniku referencyjnego. Wyznaczano także czułość i specyficzność obu reakcji na podstawie amplifikacji 100% DNA typu dzikiego (WT) w reakcji

WYNIKI

specyficznosci dla mutacji V617F genu *JAK2*. Czulość zdefiniowano jako wartosc pozornego obciazenia nieprawidlowym allelem w probce nie zawierajacej mutacji, zaś specyficznosc jako 10-krotnosc tej wielkosc [73, 74]. Wyniki tego porownania zestawiono w tabeli 29.

Tabela 29: Wyniki porownania dwóch metod analizy obciazenia allelem V617F genu *JAK2*.

Metoda	Próbka 1 (średnia/ odchylenie standardowe)		Próbka 2 (średnia/ odchylenie standardowe)		Próbka 3 (średnia/ odchylenie standardowe)		Próbka WT (średnia/ odchylenie standardowe)		Średnia zmien- ność [%]	Niepew- ność pomia- ru [%]	Czu- łość	Specyfi- czność
Lippert	19,26 18,46 18,87	18,67 (0,29)	32,74 33,12 33,03	32,96 (0,20)	3,31 3,44 3,08	3,28 (0,18)	0,81 0,56 0,72	0,7 (0,13)	2,5	22	0,7	7
Larsen	15,61 14,34 16,13	15,36 (0,92)	28 28,14 28,27	28	2,59 1,74 2,19	2,17 (0,43)	0,0001 0,0002 0,0002	0,0002 (0,0005)	8,7	3,4	0,0002	0,002
Wartość deklaro- wana	16		28		2		0					

Do dalszych analiz wybrano metode wg Larsena z uwagi na jej duzo wyzsza dokladnosc, czulość i specyficznosc pomiarow.

We wszystkich analizowanych przypadkach do oceny obecności mutacji *JAK2* V617F wykorzystano zarówno metode ilosciowa, jak i jakościowa. Należy zaznaczyć, że zastosowaną metode ilosciowa, w porownaniu z metoda jakościowa, cechuje wielokrotnie wyzsza czulość (0,002% vs 3%). Mimo to wyniki uzyskane za pomoca obu metod byly calkowicie zgodne.

4.2.1.2 Międzynarodowa standaryzacja oceny obciazenia allelem *JAK2* V617F

W celu uzyskania mozliwie najwyzszej wiarygodności pomiarow obciazenia allelem *JAK2* V617F dwukrotnie poddano je międzynarodowej walidacji. Przeprowadzono ja w latach 2013 oraz 2014 we wspolpracy ze stowarzyszeniem *MPN&MPNr Euronet*. W obu rundach standaryzacyjnych uzyskano wysoka zgodnosc z wartosciami zadeklarowanymi przez duński ośrodek referencyjny. Wyniki pierwszej rundy kontroli jakości zaprezentowano na kongresach międzynarodowych [75, 76]. Wyniki drugiej rundy kontroli jakości przedstawiono na rycinie 12.

WYNIKI

Sample	Your result	Mean	ddPCR	z-score	Performance status
S1	3.9	4.1	4.6	-0.1	Satisfactory
S2	19	20	22	-0.1	Satisfactory
S3	0.1	0.1	0.1	-0.3	Satisfactory
S4	63	62	66	0.1	Satisfactory
S5	17	19	21	-0.3	Satisfactory
S6	0.7	0.8	1.0	-0.2	Satisfactory
Overall performance of the lab:					Satisfactory

Rycina 12: Wyniki II rundy standaryzacyjnej dotyczącej oceny obciążenia allelem V617F genu *JAK2*. Rezultaty analiz wykonanych dla niniejszej rozprawy doktorskiej oznaczono kolorem niebieskim. Wszystkie wyniki spełniły kryteria laboratorium referencyjnego.

4.2.2 Jakościowa ocena obecności mutacji genu *JAK2* w obrębie egzonów 12 oraz 14

Do identyfikacji obecności mutacji egzonu 12 oraz egzonu 14 genu *JAK2* wykorzystano metodę HRMA, elektroforezę kapilarną oraz sekwencjonowanie. Ze względu na brak dostępnych materiałów kontrolnych i walidacyjnych dla ocenianych fragmentów genu *JAK2* badanie przeprowadzono w oparciu o kontrole wykonane we własnym zakresie: dla egzonu 12 DNA z polimorfizmem SNP rs10974944 (w rozcieńczeniu 5%), dla egzonu 14 DNA z mutacją V617F (w rozcieńczeniu 3%).

U badanej grupy pacjentów potwierdzono obecność 2 różnych mutacji egzonu 12 genu *JAK2*: g.1627_1632del (E543_D544del) oraz g.1624_1629 del (N542_E543del). W przebadanej grupie osób nie wykazano obecności mutacji genu *JAK2* w obrębie egzonu 14, innych niż V617F. Obecność mutacji egzonu 12 potwierdzono za pomocą wszystkich trzech metod (100% zgodności wyników).

4.2.3 Jakościowa i ilościowa ocena mutacji genu *CALR*

Występowanie mutacji w obrębie egzonu 9 genu *CALR* śledzono metodami HRMA, elektroforezy kapilarnej oraz sekwencjonowania. Ze względu na brak dostępnych materiałów kontrolnych i walidacyjnych dla badanego genu zastosowano własne kontrole: genomowy DNA z obecną mutacją typu 1 oraz genomowy DNA z obecną mutacją typu 2. W obu przypadkach zostały one rozcieńczone do poziomu 5% obciążenia allelem.

W ocenianej grupie chorych potwierdzono obecność 5 różnych mutacji genu *CALR*: g.1092_1143del (typ 1) u 13 pacjentów, g.1154_1155insTTGTC (typ 2) u 9 osób badanych, g.1095_1140del (typ 3) u 2 chorych, g.1151A>G; 1154_1155insTTGTC (typ 31) u jednego pacjenta oraz g.1154delinsCTTGTC (typ 34) w pojedynczym przypadku. Ze względu na niskie obciążenie allelem (ok. 2%) u jednego z chorych, w badaniu techniką sekwencjonowania nie potwierdzono obecności defektu wykazanego w badaniach przesiewowych.

W celu półilościowej oceny obciążenia nieprawidłowym allelem wykorzystano analizę pola pod krzywą CE. Nie udało się zoptymalizować metody RQ-PCR do analizy ilościowej mutacji genu *CALR* ze względu na różnorodny charakter defektów oraz niską złożoność sekwencji nukleotydowej, flankującej zmutowany region.

4.2.4 Jakościowa ocena obecności mutacji genu *MPL*

Mutacje *MPL* egzonu 10 wykrywano stosując metodę HRM oraz sekwencjonowanie. Jako materiał walidacyjny zastosowano plazmidowe DNA, zawierające mutację W515L oraz W515K (w rozcieńczeniu 5%). U dwojga pacjentów potwierdzono obecność mutacji W515L za pomocą obu stosowanych metod detekcji (100% zgodność).

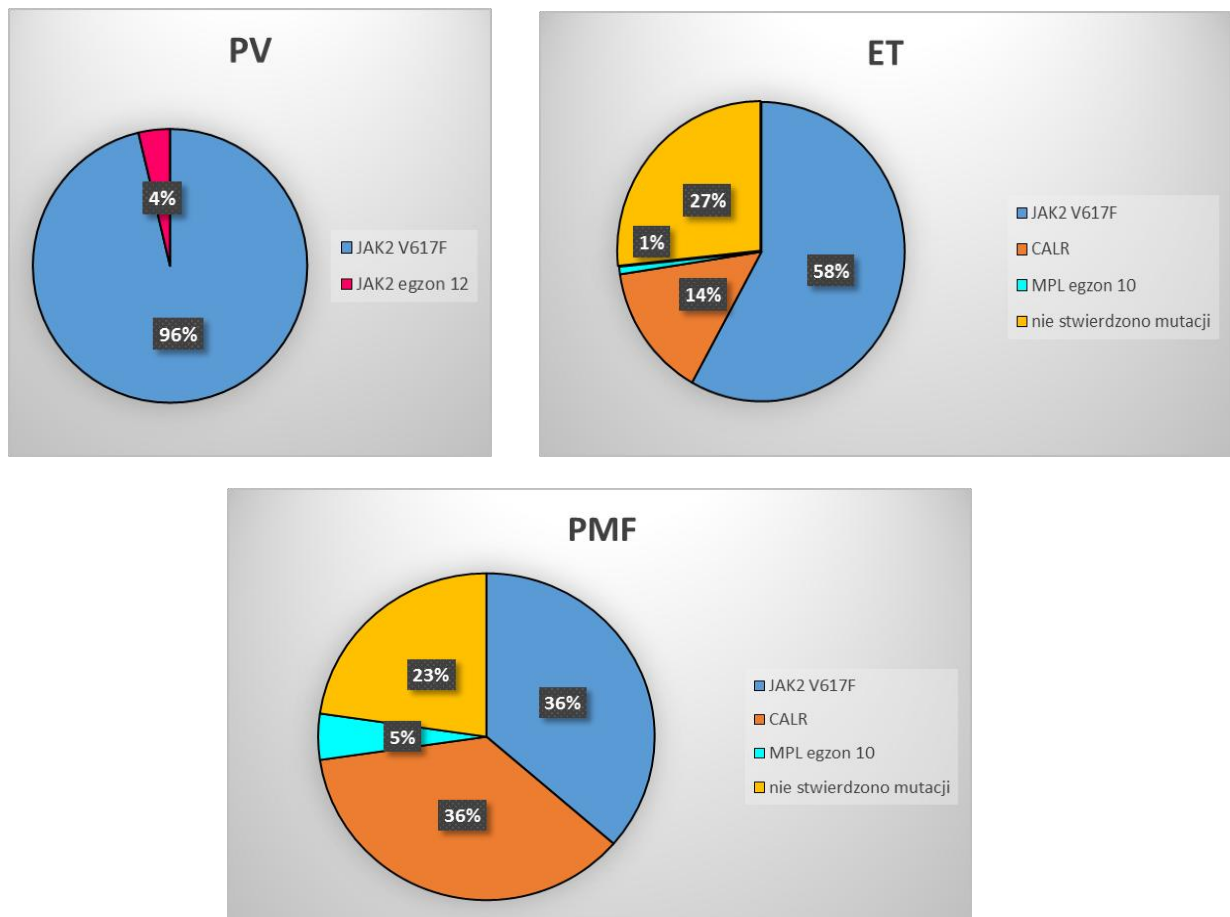
4.3 Związek obecności mutacji z wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi

4.3.1 Częstość występowania mutacji genów *JAK2*, *CALR* i *MPL* w poszczególnych typach MPN

Poszczególne typy MPN różniły się częstością występowania określonych mutacji. U wszystkich pacjentów z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej potwierdzono obecność defektów genu *JAK2*: u 52 (96%) mutacji *JAK2* V617F, zaś u 2 pacjentów (4%) mutacji genu *JAK2* w obrębie egzonu 12. W przypadku nadpłytkowości samoistnej obecność mutacji V617F genu *JAK2* potwierdzono u 72 chorych (58%), genu *CALR* u 18 chorych (14%) i genu *MPL* u 1 pacjenta (1%). U 33 osób z MPN Ph- nie potwierdzono obecności żadnego z wymienionych

WYNIKI

defektów. W grupie chorych z rozpoznaniem pierwotnego zwłóknienia szpiku w 8 przypadkach potwierdzono obecność mutacji V617F w genie *JAK2* (36%), w kolejnych 8 w genie *CALR* (36%) oraz 1 w przypadku mutacji genu *MPL* (5%). U 5 (23%) pacjentów z PMF nie potwierdzono występowania mutacji w obrębie ocenianych sekwencji badanych genów. Częstość mutacji wymienionych genów w poszczególnych MPN Ph- przedstawiono na rycinie 13.



Rycina 13: Częstość występowania mutacji genów *JAK2*, *CALR* i *MPL* u pacjentów z czerwienicą prawdziwą, nadpłytkowością samoistną i pierwotnym zwłóknieniem szpiku.

4.3.2 Analiza obciążenia nieprawidłowym allelem V617F genu *JAK2* oraz mutacjami *CALR* w poszczególnych MPN Ph-

Analiza obciążenia allelem V617F genu *JAK2* wykazała występowanie znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi postaciami nowotworów mieloproliferacyjnych. Średnie obciążenie allelem w czerwienicy prawdziwej wynosiło 40%, u 17 pacjentów (33%) stwierdzono obecność mutacji homozygotycznych. Wśród chorych na nadpłytkowość samoistną średnie obciążenie allelem wynosiło 29% (12 homozygot, 17%) a u osób z pierwotnym zwłóknieniem

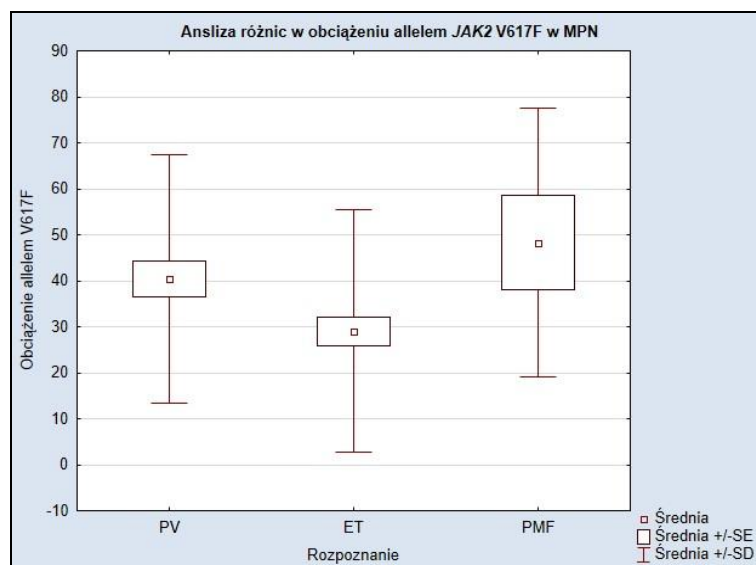
WYNIKI

szpiku 48%. W 3 przypadkach (37%) były to defekty homozygotyczne. Wyniki analiz zestawiono w tabeli 30.

Tabela 30: Obciążenia nieprawidłowym allelem genów *JAK2* i *CALR* w poszczególnych przypadkach MPN Ph-

Mutacja	Czerwienica prawdziwa		Nadpłytkowość samoistna		Pierwotne zwłóknienie szpiku	
	Średnie % obciążenie allelem (zakres)	Mutacje w układzie homozygotycznym n (%)	Średnie % obciążenie allelem (zakres)	Mutacje w układzie homozygotycznym n (%)	Średnie % obciążenie allelem (zakres)	Mutacje w układzie homozygotycznym n (%)
<i>JAK2</i> V617F	40 (3-95)	17 (33)	29 (3-97)	12 (17)	48 (24-93)	3 (37)
<i>CALR</i> egzon 9	n/d	n/d	34 (12-60)	2 (11)	47 (2-76)	3 (37)

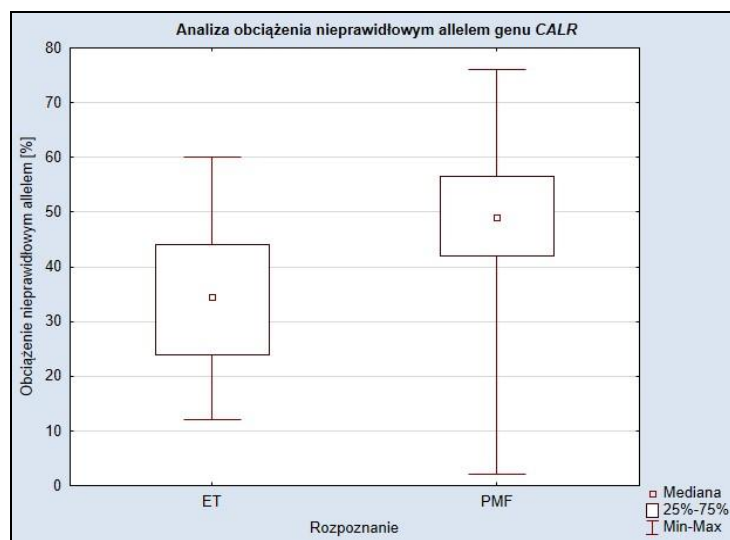
Porównanie poszczególnych nowotworów mieloproliferacyjnych Ph- *JAK2* V617F- dodatnich wykazało występowanie znamienych statystycznie różnic w średnim obciążeniu allelem pomiędzy badanymi grupami ($p=0,004$). Ze względu na inny niż normalny rozkład zmiennej zależnej, w analizie wykorzystano nieparametryczny test ANOVA Kruskal-Wallis. Test post-hoc wykazał występowanie statystycznie istotnych różnic pomiędzy ocenianymi pacjentami z czerwienicą prawdziwą i nadpłytkowością samoistną ($p=0,020$, średnie obciążenie allelem 40% vs 29%), a także nadpłytkowością samoistną i pierwotnym zwłóknieniem szpiku ($p=0,047$, średnie obciążenie allelem 29% vs 48%). Nie stwierdzono występowania istotnych różnic w podobnej analizie przeprowadzonej dla czerwienicy prawdziwej i pierwotnego zwłóknienia szpiku ($p=0,87$). Wyniki tej oceny zestawiono na rycinie 14.



Rycina 14: Obciążenie nieprawidłowym allelem V617F genu *JAK2* u chorych na poszczególne nowotwory mieloproliferacyjne Filadelfia-ujemne.

WYNIKI

Analizę obciążenia nieprawidłowym allelem dla genu *CALR* przeprowadzono zbiorczo dla wszystkich typów mutacji. Średnie obciążenie nieprawidłowym allelem wynosiło 40%, u 6 pacjentów (23%) potwierdzono obecność mutacji w układzie homozygotycznym. W nadpłytkowości samoistnej średnie obciążenie allelem wynosiło 34% (2 homozygoty, 11%), a w pierwotnym zwłóknieniu szpiku było równe 47%. Wśród ocenionych pacjentów z PMF w 3 przypadkach (37%) potwierdzono występowanie mutacji homozygotycznej. Porównanie chorych z nadpłytkowością samoistną i pierwotną mielofibrozą z obecną mutacją *CALR* ujawniło występowanie znamienych różnic w średnim obciążeniu allelem ($p=0,043$, średnia %AB 34% vs 47%). Ze względu na małą liczbę obserwacji oraz brak równości wariancji, pomimo normalności rozkładu danych, w analizie wykorzystano test U Manna-Whitneya. Wyniki tego porównania przedstawiono na rycinie 15.



Rycina 15: Obciążenie nieprawidłowym allelem genu *CALR* egzonu 9 u chorych na nadpłytkowość samoistną i pierwotną mielofibrozę.

4.3.3 Zależność pomiędzy wybranymi parametrami klinicznymi a obecnością mutacji genów *JAK2*, *CALR* i *MPL* oraz obciążeniem nieprawidłowym allelem genów *CALR* i *JAK2* u chorych na MPN Ph-

U chorych na MPN Ph- z obecną mutacją *JAK2* V617F średnie stężenie hemoglobiny było znamienne wyższe niż u reszty pacjentów (9,73 vs 8,26 mmol/l). Podobną zależność potwierdzono także w przypadku hematokrytu (0,47 vs 0,40 L/L) oraz mediany liczby leukocytów (13 vs 11,87 $\times 10^9/l$). W przypadku pacjentów z obecną mutacją egzonu 9 genu *CALR* średnie stężenie hemoglobiny, wartość hematokrytu oraz mediana liczby leukocytów były istotnie wyższe niż u pacjentów nie obciążonych obecnością defektu (odpowiednio 8,26 vs 7,48

WYNIKI

mmol/l, 0,40 vs 0,37 L/L oraz 11,87 vs 10,4 $\times 10^9/l$). W porównaniu z chorymi z mutacją genu *JAK2* mediana wieku w chwili rozpoznania choroby była niższa w przypadku chorych z obecnym defektem genu *CALR* (52 vs 55 lat). Wyniki analizy za pomocą testu U Manna-Whineya przedstawiono w tabeli 31.

Tabela 31: Związek pomiędzy obecnością mutacji genu *CALR* w obrębie egzonu 9 oraz mutacji *JAK2* V617F z wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph-

L.p.	Oceniany parametr kliniczny	Wartość P zależności pomiędzy analizowanym parametrem klinicznym a obciążeniem nieprawidłowym allelem danego genu	
		<i>JAK2</i> V617F	<i>CALR</i> egzon 9
1	Płeć	>0,05	>0,05
2	Wiek w momencie rozpoznania	>0,05	>0,05
3	Stężenie hemoglobiny [mmol/l]	<0,001	<0,001
4	Hematokryt [l/l]	<0,001	0,001
5	Liczba leukocytów [$10^9/l$]	<0,001	0,008
6	Liczba płytek krwi [$10^9/l$]	>0,05	>0,05
7	Aktywność LDH w surowicy [U/l]	>0,05	>0,05
8	Stężenie kwasu moczowego w surowicy [$\mu\text{mol/l}$]	>0,05	>0,05
9	Obecność splenomegalii	>0,05	>0,05

Podobną ocenę w odniesieniu do obecności mutacji *JAK2* V617F u chorych na MPN Ph- przeprowadzono także po wykluczeniu chorych na czerwienicę prawdziwą z całej ocenianej grupy. Także wynik tej analizy, przeprowadzonej przy pomocy testu U Manna-Whineya, potwierdził zależność pomiędzy obecnością mutacji a stężeniem hemoglobiny, wartością hematokrytu oraz liczbą leukocytów we krwi obwodowej badanych chorych (tabela 32).

Z powodu zbyt małej liczby pacjentów obciążonych mutacjami genu *JAK2* w obrębie egzonu 12 oraz genu *MPL* w obrębie egzonu 10, podobnej oceny nie przeprowadzono w tych grupach osób.

Tabela 32: Związek pomiędzy obecnością mutacji V617F genu *JAK2* a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph- (po wykluczeniu chorych z czerwienicą prawdziwą)

L.p.	Parametr kliniczny -pacjenci z rozpoznaniem ET oraz PMF	Istotność statystyczna zależności (<i>p-value</i>) dla <i>JAK2</i> V617F
1	Płeć	>0,05
2	Wiek w momencie rozpoznania	>0,05
3	Stężenie hemoglobiny [mmol/l]	0,001
4	Hematokryt [l/l]	0,003
5	Liczba leukocytów [$10^9/l$]	0,001
6	Liczba płytek krwi [$10^9/l$]	>0,05
7	Aktywność LDH w surowicy [U/l]	>0,05
8	Stężenie kwasu moczowego w surowicy [$\mu\text{mol/l}$]	>0,05
9	Obecność splenomegalii	>0,05

WYNIKI

Z uwagi na niewielką liczbę pacjentów wyniki badań oceniających związek pomiędzy obecnością mutacji genu *MPL* oraz genu *JAK2* w obrębie egzonu 12 a parametrami kliniczno-laboratoryjnymi miały charakter obserwacyjny.

Średnie stężenie hemoglobiny okazało się być wyższe u osób obarczonych mutacjami genu *JAK2* w obrębie egzonu 12 niż u pozostałych pacjentów (10,05 vs 9,23 mmol/l). Analogiczne różnice potwierdzono w zakresie wartości hematokrytu (0,5 vs 0,44 L/L). Co ciekawe, pacjenci z obecną mutacją egzonu 12 cechowali się jednak niższą liczbą leukocytów ($4,7$ vs $12,1 \times 10^9/l$) oraz płytek krwi (419 vs $690 \times 10^9/l$).

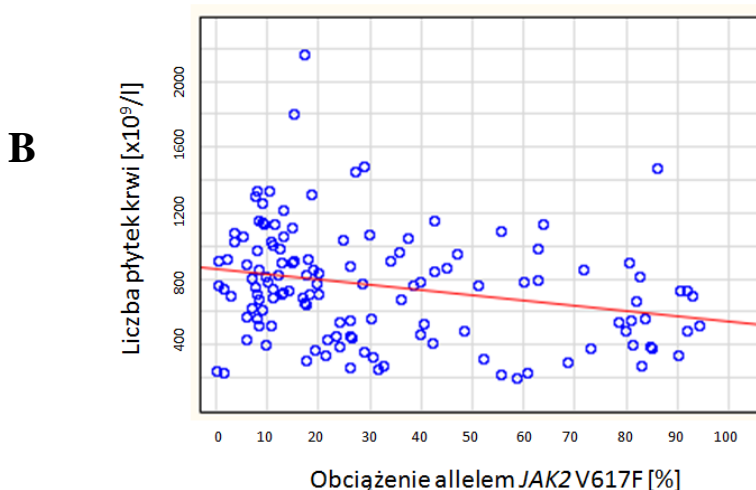
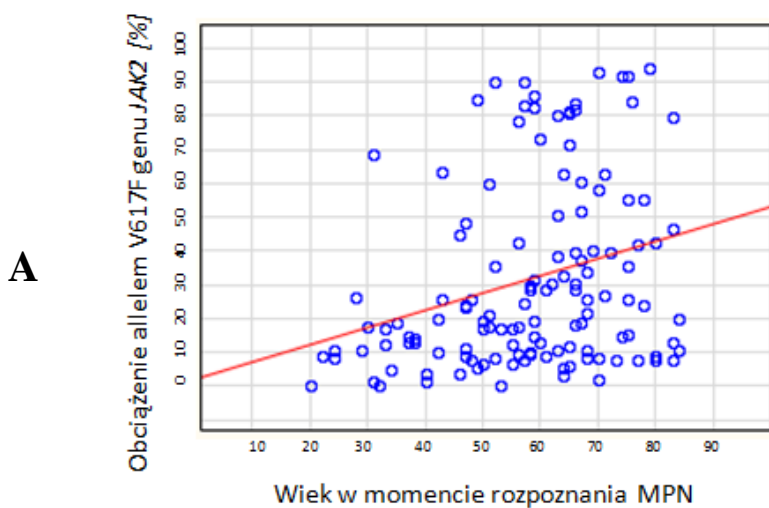
W przypadku mutacji genu *MPL*, u pacjenta z mielofibrozą aktywność LDH (2730 U/l) oraz stężenie kwasu moczowego ($580 \mu\text{mol/l}$) były wysokie, zaś hematokryt (0,3 l/l) oraz stężenie hemoglobiny ($6,27 \text{mmol/l}$) obniżone. Liczba płytek krwi była natomiast prawidłowa. Obecne było także powiększenie śledziony. U chorego z rozpoznaniem nadpłytkowości samoistnej obecność defektu W515L powiązana była z niewielką nadpłytkowością (pomiędzy 450 a $500 \times 10^9/l$) oraz z dodatnim wywiadem dotyczącym występowania epizodów zakrzepowozatorowych.

Wyniki oceny związku pomiędzy obciążeniem allelem V617F genu *JAK2* oraz nieprawidłowym allelem genu *CALR* w całej grupie badanej przedstawiono w tabeli 33 oraz na rycinie 16. W przypadku mutacji V617F genu *JAK2* potwierdzono występowanie związku pomiędzy %AB a wiekiem chorych (wzrost %AB wraz z wiekiem), liczbą płytek krwi (spadek Plt wraz ze wzrostem %AB) oraz obecnością splenomegalii (obecna częściej u chorych z wyższymi wartościami obciążenia allelem). Zawartość nieprawidłowego allelu w przypadku mutacji egzonu 9 genu *CALR* powiązana była ze średnim stężeniem hemoglobiny i wartością hematokrytu (zależność odwrotnie proporcjonalna), liczbą leukocytów we krwi (wyższa u chorych z wysoką zawartością nieprawidłowego allelu). U chorych z wysoką zawartością nieprawidłowego wariantu genu kalretikuliny znamienne częściej występowała splenomegalia. W analizach zastosowano test U Manna-Whitneya w przypadku interpretacji obecności splenomegalii lub test korelacji rang Spearmana w przypadku reszty ocenianych parametrów.

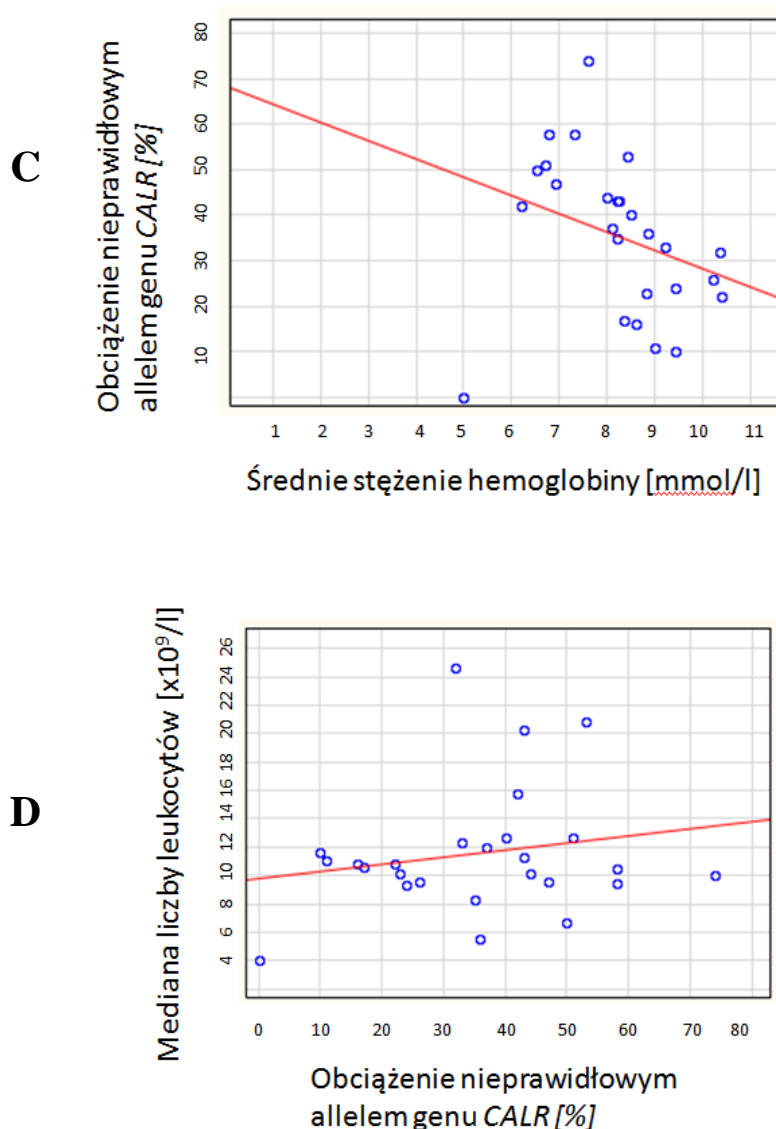
WYNIKI

Tabela 33: Wyniki analizy związku pomiędzy obciążeniem nieprawidłowym allelem *CALR* lub *JAK2* V617F a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph-

L.p.	Oceniany parametr kliniczny	Wartość P zależności pomiędzy analizowanym parametrem klinicznym a obciążeniem nieprawidłowym allelem danego genu	
		<i>JAK2</i> V617F	<i>CALR</i> egzon 9
1	Wiek w momencie rozpoznania	0,001	>0,05
2	Stężenie hemoglobiny [mmol/l]	>0,05	0,003
3	Hematokryt [l/l]	>0,05	0,024
4	Liczba leukocytów [$10^9/l$]	>0,05	0,005
5	Liczba płytek krwi [$10^9/l$]	0,002	>0,05
6	Aktywność LDH w surowicy [U/l]	>0,05	0,025
7	Stężenie kwasu moczowego w surowicy [$\mu\text{mol/l}$]	>0,05	0,001
8	Obecność splenomegalii	0,001	0,035



WYNIKI



Rycina 16: Wynik oceny korelacji wybranych parametrów laboratoryjnych i obciążenia nieprawidłowym allelem genów *JAK2* (A, B) oraz *CALR* (C, D)

4.3.4 Związek pomiędzy obecnością mutacji genów *JAK2*, *CALR*, *MPL* a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na poszczególne nowotwory mieloproliferacyjne

4.3.4.1 Czerwienica prawdziwa

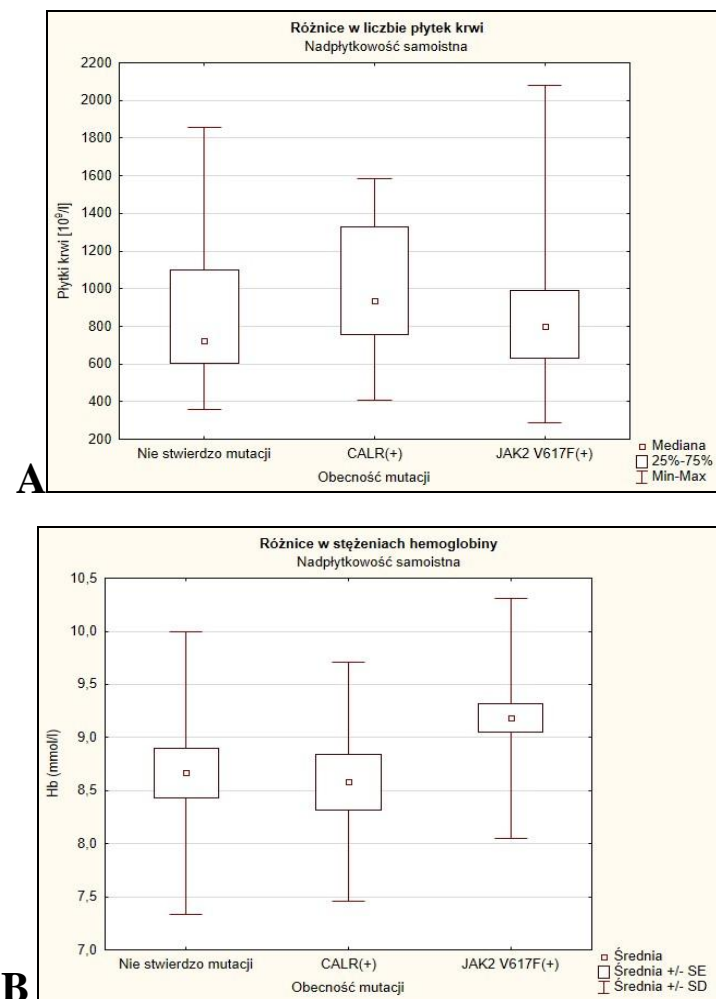
W obrębie grupy chorych z czerwienicą prawdziwą nie potwierdzono występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami pacjentów z mutacją V617F i mutacjami egzonu 12 genu *JAK2*. Z uwagi na bardzo małą liczbę poczynionych obserwacji, wyniki te mogą nie odzwierciedlać faktycznych zależności biologicznych.

WYNIKI

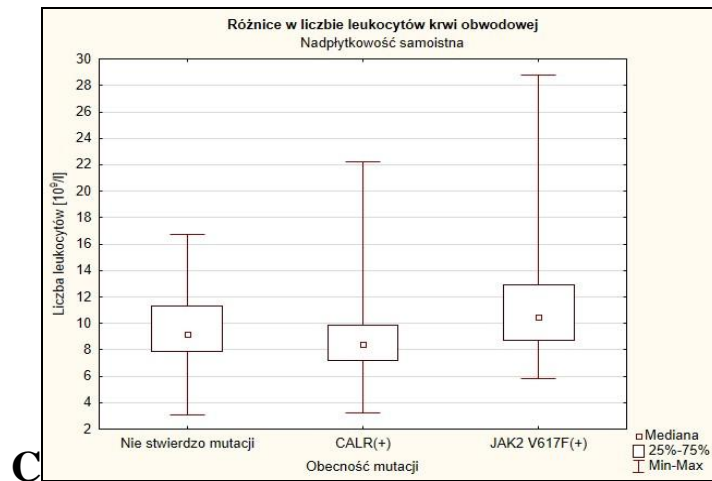
4.3.4.2 Nadpłytkowość samoistna

Porównanie pacjentów *CALR*-dodatnich, *JAK2* V617F-dodatnich i osób nie obciążonych żadnym z analizowanych defektów wykazało występowanie istotnych statystycznie różnic w zakresie stężenia hemoglobiny ($p=0,017$), liczby leukocytów ($p=0,014$) oraz liczby płytek krwi ($p=0,049$).

Analiza post-hoc wykazała, że grupę *JAK2*-dodatnią cechuje istotnie statystycznie wyższe średnie stężenie Hb niż grupę *CALR*-dodatnią ($p=0,018$, 9,18 vs 8,58 mmol/l) oraz grupę nie obciążoną mutacjami ocenianych genów. Mediana liczby leukocytów w grupie *JAK2*-dodatniej była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie *CALR*-dodatniej ($p=0,028$, mediana 10,51 vs 8,45 $\times 10^9/l$). Grupa pacjentów *CALR*-dodatnich cechowała się natomiast istotnie wyższą liczbą płytek niż pozostałe grupy pacjentów ($p=0,049$ mediana Plt 937 $\times 10^9/l$ vs 767 $\times 10^9/l$). Graficzne zestawienie wyników w postaci grafów pudełkowych przedstawiono na rycinie 17.



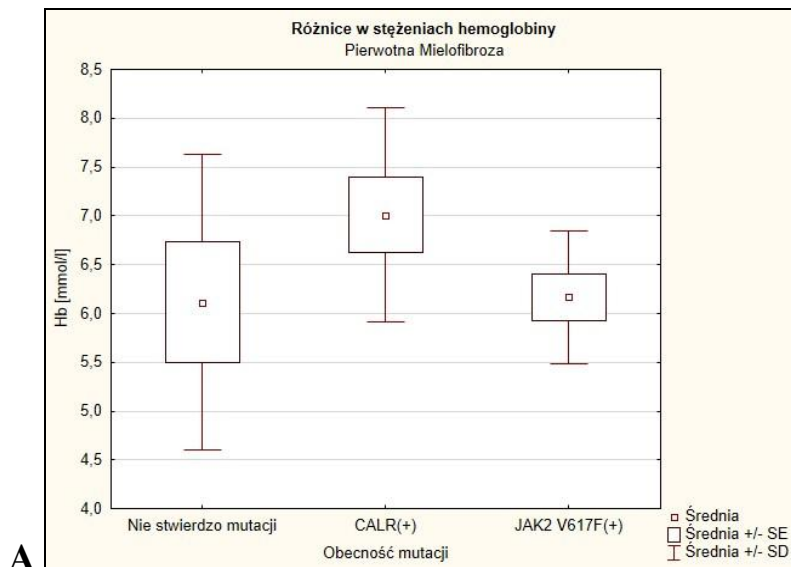
WYNIKI



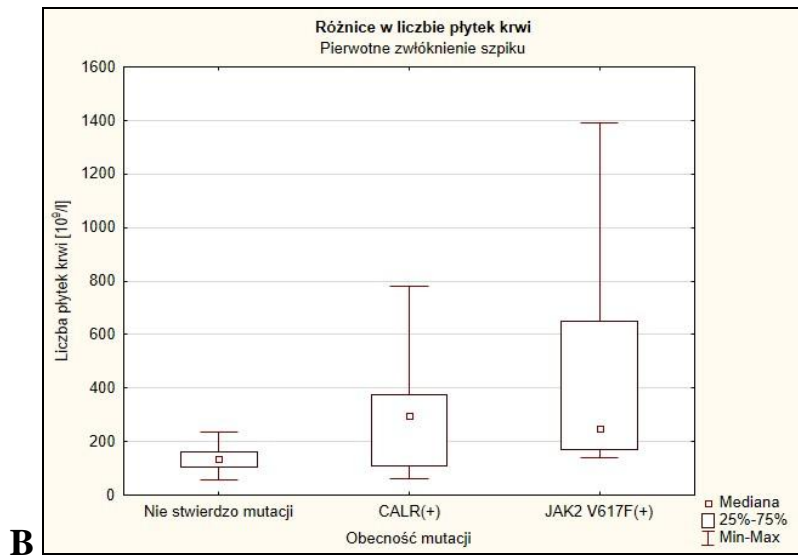
Rycina 17: Średnie stężenie hemoglobiny (A), mediana liczba płytek (B) oraz mediana liczby leukocytów (C) u pacjentów z nadpłytkowością samoistną, obciążonych odpowiednio obecnością mutacji V617F genu *JAK2*, defektami egzonu 9 genu *CALR* oraz u chorych wolnych od obecności mutacji genów *JAK2*, *MPL* i *CALR*.

4.3.4.3 Pierwotne zwłóknienie szpiku

U chorych na PMF w zależności od defektu molekularnego potwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w zakresie średniego stężenia hemoglobiny oraz mediany liczby płytek krwi. Średnie stężenie Hb było najwyższe u pacjentów obarczonych mutacją *CALR* ($p=0,028$, 7,00 vs 6,12 mmol/l). Najwyższa była także mediana liczby płytek krwi ($p=0,034$, 260 vs 174 $\times 10^9/l$). Wyniki porównania przedstawiono na rycinie 18.



WYNIKI



Rycina 18: Średnie stężenia hemoglobiny (A) i mediana liczby płytek krwi (B) u pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku, obciążonych obecnością mutacji *JAK2 V617F* lub *CALR* oraz u chorych bez obecności wymienionych defektów.

DYSKUSJA

ROZDZIAŁ V

DYSKUSJA

DYSKUSJA

Ocena obecności mutacji genów zaangażowanych w patogenezę MPN jest kluczowa dla prawidłowej i szybkiej diagnostyki klinicznej tej grupy nowotworów. Jak dotąd nie opracowano jednolitych metod oceny obecności mutacji genowych dla potrzeb rutynowej diagnostyki hematologicznej. Z tego powodu konieczne jest podejmowanie prób ich wdrożenia oraz optymalizacji.

Dotychczas opracowano kilka metod molekularnych, służących do oceny obecności mutacji genu *JAK2*. W przypadku mutacji *JAK2* V617F są to zwykle metody allelospecyficzne. Pozwalają one potwierdzić obecność określonej zmiany nukleotydowej i umożliwiają identyfikację defektu w przypadkach o obciążeniu allelem przekraczającym 1-5% [5, 77]. Techniki bardziej złożone, oparte o allelospecyficzny RQ-PCR lub Digital Droplet PCR są rzadziej stosowane w praktyce klinicznej. Należy jednak pamiętać, że ich czułość diagnostyczna jest znacznie wyższa (poniżej 0,1% obciążenia allelem V617F) [1, 78]. Ze względu na możliwość generowania wyników fałszywie dodatnich, ich przydatność diagnostyczna jest w tej chwili w trakcie weryfikacji. Wykazano bowiem obecność komórek *JAK2* V617F-dodatnich we krwi obwodowej u osób bez objawów klinicznych MPN [79-81]. Opisano także przypadki, w których obecności defektu genu *JAK2* w niskim mianie towarzyszyły dodatkowe zmiany molekularne [64]. Wydaje się jednak, że techniki o wysokiej czułości mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu obecności minimalnej choroby resztkowej u pacjentów *JAK2*-dodatnich, poddanych allogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych [82]. Wykorzystana w niniejszej pracy metoda ARMS-PCR wydaje się spełniać wymóg przydatności w procesie rutynowej diagnostyki molekularnej MPN Ph-. Pozwala bowiem na wykrywanie obecności mutacji istotnych klinicznie w przypadkach o obciążeniu allelem wyższym niż 3%.

Zastosowana w badaniach własnych ilościowa analiza obciążenia allelem V617F genu *JAK2* według protokołu Larsena okazała się być wysoce czuła (0,002%) oraz specyficzna (0,002%). Dzięki temu możliwa była detekcja nawet pojedynczej zmutowanej cząsteczki matrycy w ocenianej próbce DNA. Metoda ta okazała się być również wystarczająco dokładna (niepewność pomiarowa 3,4%) i powtarzalna, aby uznać ją za wiarygodną diagnostycznie. Drugi z testowanych protokołów (Lipperta) cechowała wyższa powtarzalność, natomiast niższa była dokładność pomiarów oraz czułość i specyficzność. Z tych powodów protokołu tego nie potraktowano jako wiarygodnego narzędzia diagnostycznego, szczególnie w kontekście detekcji choroby o niskim obciążeniu zmutowanym allelem.

DYSKUSJA

W literaturze dostępne są nieliczne opracowania dotyczące walidacji jakościowych oraz ilościowych metod molekularnych w diagnostyce medycznej [83, 84]. Autorzy skupiają się w nich głównie na diagnostyce defektów wrodzonych, obecnych w 50 lub 100% komórek badanych (rzadziej jest to mniejszy odsetek związany z mozaicyzmem genetycznym). Wykrycie obecności takich zmian przysparza mniejszych trudności niż diagnostyka defektów somatycznych w chorobach nowotworowych, w których obciążenie nieprawidłowym allelem może być niskie. Zimmermann i wsp. wskazali na konieczność dostosowania metod walidacji testów do rodzaju wykrywanego defektu genetycznego, charakteru choroby a także rodzaju ocenianej tkanki. W przypadku detekcji germinalnych wariantów allelicznych rodzaj zastosowanej techniki powinien być również uzależniony od specyfiki populacji badanej [84]. W hematologii w większości przypadków materiałem badanym są komórki krwi obwodowej, rzadziej są to komórki pozyskiwane ze szpiku kostnego. Dotyczy to szczególnie przypadków z izolowanym jego zajęciem lub przy wyraźnej dysproporcji pomiędzy zajęciem krwi obwodowej i szpiku [85]. Szpik kostny jest również materiałem z wyboru w przypadku technik służących do analizy profilu ekspresji genów [86]. W nowotworach mieloproliferacyjnych *JAK2*-dodatnich porównanie krwi obwodowej oraz szpiku kostnego nie wykazało jednak istotnych różnic zarówno w zakresie częstości występowania ocenianych zmian, jak też w zakresie obciążenia nieprawidłowym allelem. Z tego powodu do celów diagnostycznych wykorzystywane są leukocyty izolowane z krwi obwodowej [87].

Najistotniejszym parametrem brany pod uwagę w ocenie przydatności metod molekularnych dla celów diagnostyki genetycznej w chorobach nowotworowych jest ich czułość analityczna. Dotyczy to zarówno metod ilościowych, jak i jakościowych. Ze względu na różną procentową zawartość komórek nowotworowych w materiale pochodzącym od różnych pacjentów, niezbędne jest także określenie progu czułości stosowanych testów. Metody ilościowe powinny być walidowane dodatkowo także pod kątem dokładności analitycznej, zmienności i/lub powtarzalności oraz odtwarzalności uzyskiwanych wyników [83, 88]. Niestety w tym zakresie brak jest jednolitych wytycznych, pozwalających na obiektywną ocenę przydatności stosowanej metody diagnostycznej. Z tego powodu bardzo ważna i potrzebna jest walidacja międzylaboratoryjna wykorzystywanych technik molekularnych.

Także zewnątrzlaboratoryjna kontrola jakości pozwala na uwiarygodnienie wyników. W hematologii molekularnej pierwsza walidacja międzynarodowa została przeprowadzona przez towarzystwo *European Leukemia Net* dla onkogenu *BCR-ABL*. Jej szerokie zastosowanie pozwoliło na porównywanie wyników pomiędzy poszczególnymi laboratoriami. Stało się to możliwe dzięki wprowadzeniu współczynnika korekcji oraz ustanowieniu skali międzynarodowej. Standaryzacja zwiększyła tym samym wiarygodność uzyskiwanych wyników

DYSKUSJA

i przełożyła się na poprawę jakości monitorowania odpowiedzi na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową [89]. W przypadku MPN *JAK2*-dodatnich jedyną tego typu inicjatywą była walidacja *JAK2 V617F Quality Assessment*, prowadzona we wiodących laboratoriach europejskich przez *MPN&MPNr Euronet* [75, 76]. W walidacji tej z sukcesem uczestniczyła także Pracownia Biologii Molekularnej Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku UM, uzyskując certyfikat potwierdzający wysoką jakość wykonywanych oznaczeń ilościowych.

W przypadku mutacji rozproszonych, pojawiających się w różnych pozycjach nukleotydowych w obrębie badanego genu, nie jest możliwe zastosowanie strategii detekcji oraz analizy ilościowej, wykorzystywanych w przypadku oceny *JAK2 V617F*. Z tego powodu opracowano szereg metod przesiewowych, służących do oceny obecności mutacji w MPN Ph-, w tym metodę bezpośredniego sekwencjonowania, wysokoprężnej, denaturującej chromatografii cieczowej (dHPLC), elektroforezy kapilarnej (CE) oraz wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia (HRMA) [69, 90-92]. Spośród wymienionych technik najszerzej obecnie stosowana jest HRMA, którą cechuje stosunkowo wysoka czułość (1-5%) i specyficzność [91]. Jest to jednak metoda trudna w standaryzacji międzylaboratoryjnej [93]. Dla potrzeb niniejszej pracy wykorzystano analizę krzywych topnienia, która pozwoliła na identyfikację defektów molekularnych na poziomie czułości co najmniej 5%, zarówno w przypadku mutacji insercyjno-delecyjnych (*CALR*, *JAK2* egzon 12 i egzon 14) jak i substytucyjnych (*MPL*). HRMA nie umożliwiła jednak odróżnienia mutacji o charakterze onkogennym od polimorfizmów genetycznych. Potwierdzeniem tego spostrzeżenia było wykrycie w próbce kontrolnej polimorfizmu SNP rs10974944 w obrębie egzonu 12 *JAK2*. Z tego powodu w opinii autorki niniejszej rozprawy metoda HRMA może być stosowana w rutynowej diagnostyce klinicznej jedynie pod warunkiem jednoczesnego zastosowania innej techniki molekularnej, pozwalającej na bardziej szczegółowy opis wykrytego wariantu genowego (mutacja, polimorfizm). Do tego celu można zastosować metodę sekwencjonowania sangerowskiego, a w przypadku defektów insercyjno-delecyjnych metodę elektroforezy kapilarnej [69, 70, 92].

Wysokonapięciowa elektroforeza kapilarna pozwala na rozdział produktów amplifikacji PCR z wysoką rozdzielczością, dochodzącą, w zależności od użytej platformy, do 1-3 par zasad, z czułością co najmniej 5% przy pomiarze obciążenia nieprawidłowym allelem. Technika ta umożliwia jednoczesne określenie z dużą dokładnością wielkości molekularnej produktu PCR [94]. W przypadku systemów niedenaturujących, takich jak QIAGEN QIAxcel dzięki charakterystycznemu wzorowi prążkowemu, tworzonemu przez tzw. heterodupleksy DNA,

DYSKUSJA

możliwa jest również identyfikacja poszczególnych mutacji insercyjno-delecyjnych. Metoda ta nie jest jednak przydatna do wykrywania obecności mutacji substytucyjnych oraz polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Z tego powodu jej zastosowanie w przypadku MPN Ph- jest ograniczone do defektów genów *CALR* oraz *JAK2* egzonu 12 oraz egzonu 14. W badaniach własnych wykazano, że skuteczność elektroforezy kapilarnej w wykrywaniu obecności mutacji jest porównywalna z możliwościami metody HRMA [90]. Girodon w swoich badaniach określił czułość i specyficzność metody CE w identyfikacji obecności mutacji *CALR* odpowiednio na 98,2% oraz 100%. W przypadku metody HRMA odsetki te wyniosły odpowiednio 96,4% oraz 96,3% [90]. Warto nadmienić, że połączenie obu metod w procesie diagnostycznym pozwala na identyfikację mutacji insercyjno-delecyjnych genu *CALR* w ponad 99% przypadków [90].

Technika sekwencjonowania uchodzi za metodę referencyjną w przypadku analizy obecności defektów onkogennych. Pozwala bowiem na szczegółową charakterystykę zmiany genetycznej. Możliwe jest nie tylko stwierdzenie obecności mutacji, ale również poznanie charakteru zmiany sekwencji nukleotydowej. Metoda ta jest szczególnie użyteczna podczas poszukiwania mutacji nieznanymi oraz rozproszonymi w obrębie genu. Wadą metody jest jej niska czułość diagnostyczna. Zmiana nukleotydowa musi być bowiem obecna w co najmniej 10-20% analizowanej populacji komórek [95]. Jej stosunkowo niska czułość pozwala jednak na wykrywanie defektów o wysokim mianie, istotnych z punktu widzenia patogenezy nowotworów mieloproliferacyjnych.

W przypadku oceny obecności defektów molekularnych u chorych na MPN Ph- należy pamiętać, że niektóre zmiany mogą występować w niskim odsetku komórek. Potwierdzają to wyniki badań własnych dotyczące oceny obciążenia nieprawidłowym allelem (u niektórych chorych poniżej 10%). Dotyczy to także oceny mutacji egzonu 12 genu *JAK2* oraz genów *MPL* i *CALR*. Również w tych przypadkach u niewielkiego odsetka analizowanych pacjentów %AB okazał się być niższy od czułości reakcji sekwencjonowania [93]. W niniejszej pracy w jednym przypadku wykazano obecność mutacji *CALR* typu 1 (podrozdział 4.2.3) w obciążeniu około 2%. Było to powodem rozbieżności wyników uzyskanych metodami przesiewowymi (HRMA oraz CE) oraz techniką sekwencjonowania. W przypadku zidentyfikowanych mutacji genu *MPL* oraz egzonu 12 genu *JAK2* wyniki sekwencjonowania oraz analiz przesiewowych były zgodne, zawartość zmutowanego allelu w tych przypadkach była jednak wysoka. Z wymienionych powodów w każdym przypadku MPN Ph- należy rekomendować wykonywanie skryningu metodami przesiewowymi, a następnie przeprowadzenie badania metodą sekwencjonowania wybranych fragmentów genu (ów) [95, 96].

DYSKUSJA

Wyniki dotychczas opublikowanych badań, dotyczących częstości występowania poszczególnych defektów w MPN Ph- potwierdziły, że u ok. 95% pacjentów z czerwienicą prawdziwą stwierdza się obecność mutacji V617F w genie *JAK2*. Częstość jej występowania u pacjentów z nadpłytkowością samoistną i pierwotną mielofibrozą określono na 50-60% [5, 97]. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki są spójne z doniesieniami literaturowymi na ten temat, dotyczącymi PV oraz ET. Jedynie w przypadku PMF wykazana częstość występowania mutacji *JAK2* V617F była niższa od tej raportowanej w piśmiennictwie. Rozbieżność ta może wynikać z małej liczebności grupy poddanej ocenie.

Według dostępnych danych średnie obciążenie allelem V617F w czerwienicy prawdziwej wynosi około 48%, w nadpłytkowości samoistnej 26% oraz w przypadku mielofibrozy 72% [98]. Także te wyniki są zbliżone z uzyskanymi w niniejszej pracy. Wyjątek ponownie stanowi pierwotne zwłóknienie szpiku, w którym obciążenie allelem było w badaniach własnych niższe [98].

Mutacje egzonu 12 genu *JAK2* występują u chorych na PV z częstością ok. 3%. Jak dotąd nie wykazano ich obecności w innych postaciach MPN [97]. Nie potwierdzono także ich współwystępowania z mutacją V617F genu *JAK2*. Wyniki te znalazły odzwierciedlenie w rezultatach badań własnych. Inne defekty genu *JAK2*, obejmujące egzony 13-15 dotyczą mniej niż 0,1% ocenianych chorych i najczęściej zlokalizowane są w obrębie egzonu 14 [48]. Prawdopodobnie z tego powodu nie udało się wykazać ich obecności w ocenianej grupie pacjentów.

Z punktu widzenia patogenezy MPN Ph- niezwykle interesujące jest zagadnienie, jak obecność poszczególnych defektów molekularnych związana jest z występowaniem objawów klinicznych choroby. U 95% chorych z PV przyczyną ich wystąpienia jest mutacja *JAK2* V617F. Jak dotąd w tej grupie nie wykazano obecności defektów w obrębie genu *CALR*. U pacjentów z ET oraz PMF mutacje *CALR* występują zaś wyłącznie u chorych z nieobecną mutacją V617F genu *JAK2*. W tej grupie pacjentów częstość ich występowania oceniono na 15-35%. Odsetek ten jest wyższy u pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku. Co ciekawe, w obu wymienionych nowotworach dwa najczęściej spotykane typy mutacji *CALR* występują w różnych proporcjach. Powszechniejszy jest typ 1, występujący w ok. 46% przypadków, natomiast typ 2 stwierdzany jest u ok. 38% przypadków. Typ 3 występuje rzadko, u ok. 1% przypadków, zaś wszystkie pozostałe mutacje stanowią w sumie niespełna 15% [99]. W badaniach własnych potwierdzono, że mutacja *JAK2* V617F nie współwystępuje z mutacjami genu *CALR*. Nie stwierdzono także jednoczesnego występowania mutacji V617F z innymi

DYSKUSJA

mutacjami genu *JAK2* ani z mutacjami *MPL*. Defekty genu kalretikuliny obecne były u 15% chorych z nadpłytkowością samoistną oraz u 36% osób z pierwotnym zwłóknieniem szpiku. Przeważał typ 1 (50% przypadków). Typ 2 wykryto w 31% przypadków, typ 3 u 8% chorych, a typ 31 i 34 u 4% pacjentów. Wyniki te dobrze korelują z danymi uzyskanymi przez inne grupy badawcze [8, 34].

Rezultaty badań nad obciążeniem nieprawidłowym allelem genu *CALR* u chorych na MPN Ph- wykazały, że najwyższe jest ono u pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku. Według badań chińskich, przeprowadzonych na grupie 577 pacjentów *CALR*-dodatnich, obciążenie nieprawidłowym allelem w ET wynosiło 29% a w PMF 38% [100]. Z kolei w przypadku badań przeprowadzonych przez Rumi i wsp. %AB w ET i PMF określono odpowiednio na 32% i 50% [99]. Wykonana przez badaczy ocena zawartości nieprawidłowego allelu u chorych na MPN Ph- wykazała niski odsetek mutacji o charakterze homozygotycznym (8 -16%), co ciekawe, głównie u chorych z typem 2 defektu [8, 101].

Uzyskane rezultaty badań własnych są zbieżne z wynikami przedstawionymi przez autorów europejskich [99]. Średnie obciążenie allelem zmutowanym genu *CALR* wyniosło bowiem 34% wśród pacjentów z ET oraz 47% u chorych na PMF. Zbieżność ta może mieć związek z podobnym charakterem ocenianej populacji (osoby rasy kaukaskiej) lub być wynikiem zastosowania podobnych metod analizy obciążenia nieprawidłowym allelem. Zaobserwowano bowiem, że wyniki uzyskane za pomocą technik ilościowych w poszczególnych laboratoriach różnią się. Prawdopodobnie jest to wynikiem braku ich standaryzacji.

W przypadku obu dominujących typów mutacji średnie obciążenie nieprawidłowym allelem wydaje się być różne w poszczególnych postaciach MPN Ph-. Być może związane jest to z odmiennym wpływem poszczególnych typów defektów genu *CALR* na obraz kliniczny choroby [8]. Jak dotąd brak jest jednak jednoznacznych rozstrzygnięć w tym zakresie. Według Palandri i wsp. wyższe obciążenie nieprawidłowym allelem genu *CALR* stwierdzane jest w typie 2 niż w typie 1 (47% vs 40%). Przeciwnie, Andrikovics i wsp. odnotowali wyraźnie wyższe obciążenie allelem w typie 1 niż 2 (41% vs 27%) [102, 103]. Według badań własnych, wyższe obciążenie nieprawidłowym allelem *CALR* występuje w typie 1 defektu (42 vs 36%)

Obecność mutacji *MPL* egzonu 10 stwierdza się u ok. 3-5% pacjentów z ET oraz u 5-8% pacjentów z PMF [104]. Najczęstszym typem defektu jest zmiana W515L, stwierdzana u ok. 74% chorych. Rzadziej występują substytucje W515K, W515R, W515S oraz W515A [48]. W badaniach własnych obecność mutacji W515L potwierdzono u 1% pacjentów z nadpłytkowością samoistną oraz u 5% w ocenianej grupie chorych z pierwotnym zwłóknieniem szpiku. Nie potwierdzono występowania innych mutacji genu *MPL*. Należy jednak pamiętać, że zmiany w

DYSKUSJA

obrębie genu *MPL* są najrzadziej stwierdzanymi defektami molekularnymi w kaskadzie JAK-STAT u chorych na MPN Ph-. Być może oceniona grupa 124 pacjentów z ET (w tym jedynie 34 *JAK2* i *CALR*-ujemnych) nie jest reprezentatywna dla oceny częstości mutacji genu *MPL* w polskiej populacji chorych.

W literaturze światowej nowotwory mieloproliferacyjne z obecną mutacją *JAK2* V617F nazywane są „JAK-opatiami” (ang. *JAK-opathies*). Część badaczy sugeruje, że patogenezę i przebieg MPN *JAK2*-dodatnich są odmienne niż w przypadku pozostałych nowotworów mieloproliferacyjnych Ph- [105]. Hipotezę tą potwierdzają wyniki badań własnych. Analiza badanej grupy chorych z obecną mutacją *JAK2* V617F wykazała, że u osób obarczonych defektem stężenie hemoglobiny jest znamienne wyższe niż u pacjentów *JAK2*-ujemnych. Wyższy jest także hematokryt oraz mediana liczby leukocytów we krwi obwodowej. Jak dotąd ukazało się niewiele opracowań dotyczących podobnych zależności w odniesieniu do przypadków MPN z obecną mutacją genu *CALR*. Wyniki badań własnych wskazują na istnienie swoistych cech wspólnych także dla tej grupy MPN Ph-. I tak, u pacjentów *CALR*-dodatnich stężenie hemoglobiny, wartość hematokrytu oraz mediana liczby leukocytów są wyższe niż u chorych na MPN Ph-, u których nie potwierdzono obecności mutacji *JAK2* V617F. Chorych tych cechuje także znamienne niższy wiek w chwili rozpoznania MPN. Należy podkreślić, że spostrzeżenia te są zgodne z doniesieniami innych badaczy, dotyczącymi chorych z pierwotną mielofibrozą oraz z nadpłytkowością samoistną [34, 103, 106]. Wydaje się, że na zdefiniowanie odrębnej grupy MPN, „*CALR*-opatii” trzeba będzie jednak poczekać. Wciąż bowiem mało poznany jest wpływ obecności mutacji genu kalretikuliny na regulację transdukcji sygnału komórkowym szlakiem JAK2-STAT u chorych na MPN Ph-.

Obserwacje własne dotyczące wpływu obecności mutacji egzonu 10 genu *MPL* na przebieg kliniczny MPN mają charakter szczątkowy. Obecność mutacji wykazano bowiem jedynie w dwóch przypadkach. Także dane literaturowe, dotyczące charakterystyki klinicznej pacjentów *MPL*-dodatnich mają charakter kazuistyczny. Jak dotąd największym badaniem, oceniającym przebieg kliniczny u chorych *MPL*-dodatnich jest analiza Beera i wsp. dotycząca 32 osób. Według opinii autora, w porównaniu z chorymi *JAK2* V617F- dodatnimi u pacjentów z obecną mutacją genu *MPL* średnie stężenie hemoglobiny jest niższe a liczba płytek krwi wyższa [38].

Badania własne, dotyczące oceny obciążenia nieprawidłowym allelem genów *JAK2* i *CALR* wykazały ich istotny wpływ na niektóre parametry kliniczno-laboratoryjne. Różnice te dotyczyły obciążenia allelem *JAK2* V617F u chorych z poszczególnymi postaciami MPN Ph-. I tak, najwyższe wartości %AB zaobserwowano w pierwotnej mielofibrozie oraz w czerwienicy

DYSKUSJA

prawdziwej. Zawartość nieprawidłowego allelu była natomiast znacząco niższa w nadpłytkowości samoistnej. Dane te potwierdzają wyniki innych grup badawczych, wskazujących na istotnie niższą średnią zawartość allelu V617F u pacjentów z nadpłytkowością samoistną [107-109]. Najwyższą zawartość nieprawidłowego allelu potwierdzono u chorych na PMF. [107, 109]. Według niektórych autorów jest ona szczególnie wysoka w mielofibrozie poprzedzonej czerwienicą prawdziwą [109]. Obserwację tę wydaje się negować spostrzeżenie Vannucchi, potwierdzające najwyższą zawartość allelu V617F u chorych na czerwienicę prawdziwą, a „pośrednio-wysoką” u pacjentów z PMF [108]. Rozbieżności te wynikają prawdopodobnie z przyjętych kryteriów rozpoznania dla określonych postaci MPN. W przypadku PMF w części z analiz wykluczano bowiem przypadki z fazą prefibrotyczną choroby.

W badaniach własnych potwierdzono związek pomiędzy obciążeniem allelem *JAK2* V617F a wiekiem ocenianych pacjentów (wzrost zawartości allelu wraz z wiekiem), liczbą płytek krwi (mediana liczby płytek niższa przy wyższym obciążeniu allelem V617F) oraz powiększeniem śledziony (obecne u chorych z wyższymi wartościami obciążenia allelem). Obserwacje te są zbieżne z wynikami prac Passamonti i Rumi, potwierdzającymi związek pomiędzy wysoką zawartością allelu V617F i splenomegalią u chorych na MPN Ph-. Fenomen ten jest prawdopodobnie wynikiem zależnej od obecności defektu nadmiernej stymulacji hematopoezy, w tym hematopoezy pozaszpikowej, m.in. w obrębie śledziony. W cytowanych badaniach potwierdzenie znalazła także odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy obciążeniem allelem *JAK2* V617F a liczbą płytek krwi [109]. Nie potwierdzają one jednak obserwowanego w badaniach własnych związku pomiędzy wiekiem a zawartością allelu *JAK2* V617F. Może to wskazywać na występowanie różnic pomiędzy Polską i krajami zachodnimi w zakresie wczesnego rozpoznawania choroby. Wiadomo bowiem, że u chorych w późnych fazach MPN Ph- zawartość allelu *JAK2* wzrasta [108]. W badaniach własnych potwierdzono także występowanie znamienych różnic dotyczących obciążenia nieprawidłowym allelem genu kalretikuliny u chorych z nadpłytkowością samoistną oraz pierwotnym zwłóknieniem szpiku. Było ono znacząco niższe w ET porównaniu do PMF. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych badaczy [99, 103].

Rezultaty badań własnych wskazują na występowanie zależności pomiędzy obciążeniem nieprawidłowym allelem a stężeniem hemoglobiny i wartością hematokrytu u chorych z defektami egzonu 9 genu *CALR*. U osób z wysoką zawartością nieprawidłowego allelu liczba leukocytów we krwi obwodowej także jest wyższa. Co ciekawe także klinicznie jawne powiększenie śledziony występowało znamienne częściej u chorych z wysoką zawartością nieprawidłowego wariantu genu kalretikuliny. Dane literaturowe, oceniające związek

DYSKUSJA

parametrów klinicznych z obciążeniem nieprawidłowym allelem *CALR* są dotychczas skąpe. Andrikovics i wsp. potwierdzili związek pomiędzy zawartością nieprawidłowego allelu *CALR* a średnim stężeniem hemoglobiny, hematokrytem, a także medianą liczby leukocytów we krwi chorych na MPN Ph-. Zasugerowali także zależność pomiędzy medianą liczby płytek krwi a obciążeniem nieprawidłowym allelem genu *CALR*. Związku tego nie potwierdziły badania własne [103].

W grupie pacjentów z czerwienicą prawdziwą nie uzyskano istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami pacjentów z mutacją V617F i mutacjami egzonu 12 genu *JAK2*. Jest to prawdopodobnie wynikiem zbyt małej liczby pacjentów z obecną mutacją w obrębie egzonu 12. Dostępne dane literaturowe wskazują jednak, że u pacjentów z obecnością defektu *JAK2* w obrębie egzonu 12 mediana liczby płytek i leukocytów we krwi jest niższa niż u osób z obecną mutacją V617F genu *JAK2*. W tej grupie chorych częściej też obserwuje się izolowaną erytrocytozę [6, 31, 110]. Dane dotyczące innych parametrów kliniczno-laboratoryjnych są rozbieżne. Martínez-Avilés i wsp. nie potwierdzili występowania istotnych różnic w zakresie średniego stężenia hemoglobiny i mediany wieku pomiędzy pacjentami V617F-dodatnimi oraz z obecnymi mutacjami egzonu 12 genu *JAK2*. Według Scott i wsp. oraz Passamonti i wsp. w momencie formułowania rozpoznania u pacjentów z mutacjami egzonu 12 genu *JAK2* stężenie hemoglobiny jest wyższe a wiek niższy [31, 110]. Porównanie wyników eksperymentalnych różnych zespołów pozwala przypuszczać, że pacjenci z nadpłytkowością samoistną, obarczeni defektem molekularnym genu *CALR* różnią się znacząco od chorych *JAK2* V617F-dodatnich oraz osób, u których nie stwierdzono żadnego z wymienionych defektów. Wyniki badań własnych wskazują na występowanie znamienych różnic w zakresie stężenia hemoglobiny, liczby płytek i leukocytów we krwi u pacjentów z nadpłytkowością samoistną obarczonych obecnością mutacji genów *JAK2* oraz *CALR*. Pacjentów *CALR*-dodatnich cechuje bowiem najniższe stężenie hemoglobiny, najniższa liczba leukocytów oraz najwyższa liczba płytek krwi. Chorzy *JAK2*-dodatni charakteryzują się natomiast najwyższymi wartościami stężenia hemoglobiny i mediany liczby leukocytów we krwi obwodowej. U osób z MPN Ph- z nieobecnymi defektami genów *JAK2*, *CALR* i *MPL* liczba płytek krwi jest najniższa a stężenie hemoglobiny i mediana liczby leukocytów osiągają wartości pośrednie. Wyniki te są całkowicie zgodne z doniesieniami innych grup [8, 99, 103]. Te same zależności zaobserwował m.in. Klampf i wsp, zaś Chen i wsp, wskazując jednocześnie na fakt, że mediana wieku pacjentów *CALR*-dodatnich jest najniższa a ryzyko wystąpienia epizodów zakrzepowo-zatorowych mniejsze [8, 111]. W przypadku pierwotnego zwłóknienia szpiku wyniki własne potwierdziły występowanie istotnych różnic pomiędzy grupą *CALR* i *JAK2* V617F-dodatnią oraz grupą

DYSKUSJA

pacjentów bez obecności defektów w obrębie sekwencji ocenianych genów. U osób z obecną mutacją genu *CALR* stężenie hemoglobiny oraz mediana płytek krwi były najwyższe. Najniższe wartości stężenia hemoglobiny zaobserwowano w grupie nie obciążonej obecnością ocenianych defektów. Najniższą medianę liczby płytek krwi stwierdzono u pacjentów *JAK2*-dodatnich. Podobne obserwacje poczynili także inni badacze [8, 103, 106].

Przedstawione wyniki badań własnych oraz dane uzyskane przez innych autorów jednoznacznie wskazują na konieczność ujednoczenia metod analizy obecności oraz zawartości nieprawidłowego allelu genów *JAK2*, *MPL* i *CALR*. W opinii autorki niniejszej pracy równie ważne są odpowiedni dobór stosowanych metod diagnostycznych, jak i walidacja zewnątrzlaboratoryjna.

WNIOSKI

ROZDZIAŁ VI

WNIOSKI

1. Zastosowane metody biologii molekularnej, wykorzystane w diagnostyce klinicznej nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych, umożliwiły wykrycie obecności zmian w obrębie egzonów 12 i 14 genu *JAK2*, egzonu 10 genu *MPL* oraz egzonu 9 genu *CALR*. Techniki te cechowała czułość diagnostyczna na poziomie co najmniej 5% obciążenia nieprawidłowym allelem.
2. Wykorzystanie wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia jako metody przesiewowej w analizie obecności mutacji egzonu 12 genu *JAK2*, egzonu 10 genu *CALR* oraz egzonu 9 genu *MPL* ma dużą wartość praktyczną, szczególnie gdy uzupełniona jest ona o ocenę obecności defektów za pomocą wysokonapięciowej elektroforezy kapilarnej i sekwencjonowania metodą Sanger.
3. Ocena obecności oraz obciążenia nieprawidłowym allelem genu *JAK2* V617F jest przydatna w diagnostyce różnicowej poszczególnych postaci nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych. Podobne znaczenie wydaje się mieć ocena jakościowa i ilościowa innych defektów molekularnych genów *JAK2*, *CALR* oraz *MPL*.
4. Manifestacja kliniczno-laboratoryjna nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych jest odmienna w zależności od obecności mutacji *JAK2*, *CALR* i *MPL*.

STRESZCZENIE

ROZDZIAŁ VII

STRESZCZENIE

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była próba optymalizacji i walidacji metod wykrywania obecności mutacji *JAK2* egzonu 12 oraz 14, mutacji *CALR* egzonu 9 oraz mutacji *MPL* egzonu 10 w nowotworach mieloproliferacyjnych Filadelfia-ujemnych. Niezależnym celem badań była także ocena częstości występowania tych mutacji w polskiej grupie chorych na MPN Ph-. Grupę badaną stanowiło 200 pacjentów (118 kobiet i 82 mężczyzn) w wieku 19-83 lata, leczonych z powodu nowotworów mieloproliferacyjnych w Katedrze Hematologii i Transplantacji Szpiku UMP. Badaniami objęto 54 chorych na czerwienicę prawdziwą, 124 chorych na nadpłytkowość samoistną oraz 22 osoby z rozpoznaniem pierwotnego zwłóknienia szpiku. Materiałem do badań było DNA genomowe, wyizolowane z krwi obwodowej. W analizach wykorzystano system PCR do detekcji mutacji oparty o oporność na amplifikację (ARMS-PCR), wysokorozdzielczą analizę krzywych topnienia (HRMA), elektroforezę kapilarną w żelu niedenaturującym oraz sekwencjonowanie techniką Sangera.

Oceniono przydatność metod diagnostycznych do analizy obecności mutacji genów *JAK2* egzonów 12 i 14, *MPL* egzonu 10 oraz *CALR* egzonu 9. Czulość technik przesiewowych oszacowano na 5% obciążenia nieprawidłowym allelem. Dokonano także porównania technik molekularnych pod kątem ich przydatności w diagnostyce MPN. Określono również czulość, specyficzność, zmienność analityczną oraz niepewność pomiarową dwóch metod do ilościowej analizy obciążenia allelem V617F genu *JAK2*. Po dokonaniu wyboru lepszej z technik skutecznie przeprowadzono jej walidację międzynarodową.

Ocena występowania defektów molekularnych w MPN Ph- wykazała, że u 52 pacjentów (96%) z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej obecna jest mutacja V617F genu *JAK2*, a u 2 mutacje *JAK2* egzonu 12 (4%). W przypadku nadpłytkowości samoistnej obecność mutacji *JAK2* V617F potwierdzono u 72 chorych (58%), *CALR* u 18 chorych (14%) zaś *MPL* u 1 pacjenta (1%). U 33 osób (27%) nie zidentyfikowano żadnej z wymienionych mutacji. Wśród chorych z pierwotnym zwłóknieniem szpiku potwierdzono obecność mutacji *JAK2* V617F w 8 przypadkach (36%) i mutacji *CALR* w kolejnych 8. W przypadku mutacji *MPL* wykryto obecność defektu u 1 chorego (5%). U 5 pacjentów (23%) z PMF nie zidentyfikowano żadnej z wymienionych zmian molekularnych. Średnie obciążenie allelem V617F w grupie pacjentów z PV wyniosło 40%, u osób z rozpoznaniem ET 29%, zaś w PMF 48%. Obciążenie nieprawidłowym allelem genu *CALR* wyniosło 34% u chorych z ET i 47% u osób z PMF.

Analiza parametrów kliniczno-laboratoryjnych w grupie pacjentów z czerwienicą prawdziwą nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami pacjentów z

STRESZCZENIE

mutacją V617F i mutacjami egzonu 12 genu *JAK2*. W grupie chorych na nadpłytkowość samoistną obecność mutacji *JAK2* V617F powiązana była z najwyższymi wartościami stężenia hemoglobiny i mediany liczby leukocytów krwi obwodowej. Pacjentów *CALR*-dodatnich z ET cechowało najniższe średnie stężenie hemoglobiny, najniższa mediana liczby leukocytów oraz najwyższa liczba płytek. U chorych na PMF z obecną mutacją genu *CALR* średnie stężenie hemoglobiny oraz mediana liczby płytek były wyższe niż u chorych z obecną mutacją *JAK2* V617F oraz pacjentów bez obecności defektów genów *JAK2* i *CALR*. Najniższe wartości stężenia hemoglobiny odnotowano w grupie nie obciążonej mutacjami, zaś najniższą medianą liczby płytek krwi cechowali się pacjenci *JAK2*-dodatni.

Przeprowadzone badania potwierdziły także występowanie znaczących różnic w obciążeniu allelem *JAK2* V617F pomiędzy poszczególnymi postaciami MPN Ph-. Najwyższe odnotowano w pierwotnej mielofibrozie oraz w czerwienicy prawdziwej, znacząco niższe w nadpłytkowości samoistnej. W przypadku obciążenia nieprawidłowym allelem *CALR* wyniki wykonanych badań potwierdziły zależność odwrotnie proporcjonalną pomiędzy %AB oraz stężeniem hemoglobiny i wartością hematokrytu. Przeciwnie, liczba leukocytów we krwi obwodowej była wyższa u chorych na MPN Ph- z wysoką zawartością nieprawidłowego allelu.

Uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają praktyczne znaczenie śledzenia obecności mutacji genów *JAK2*, *CALR* oraz *MPL* u chorych na MPN Ph-. Wskazują one jednocześnie na konieczność wypracowania ujednoczonych algorytmów postępowania diagnostycznego w zakresie oceny obecności/zawartości nieprawidłowego allelu wymienionych genów, w tym ich walidacji zewnątrzlaboratoryjnej.

SUMMARY

ROZDZIAŁ VIII

SUMMARY

SUMMARY

The main aim of this study was to optimize and validate molecular assays for detection of presence of mutations in *JAK2* exon 12 and 14, *CALR* exon 9 and *MPL* exon 10 in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. Independently, the aim was to describe the occurrence of mutations in polish MPN Ph- patients. The studied group consisted of 200 patients (118 women and 82 men) aged 19-83, diagnosed with myeloproliferative neoplasms in Faculty of Hematology and Bone Marrow Transplantation of Poznań Medical University. Among patients, 54 polycythemia vera, 124 essential thrombocythemia and 22 primary myelofibroses cases were identified. Molecular analyses were performed on genomic DNA, isolated from full peripheral blood. Samples were tested with amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR), high resolution melt analysis (HRMA), capillary electrophoresis and Sanger sequencing.

According to the performed analyses, the assays for detection of mutations in *JAK2* exon 12 and 14, *CALR* exon 9 and *MPL* exon 10 were useful for MPN diagnostics. The detection limit of the screening tests was established at 5% allele burden. Parameters of specificity, sensitivity, analytical compliance and uncertainty of measurements were evaluated for the two assays for quantitative analysis of *JAK2* V617F allele burden. After choosing the optimal technique its international validation was performed.

The analysis of prevalence of molecular defects in MPN Ph- revealed that 52 (96%) of PV cases was bearing the V617F mutation of *JAK2* gene and 2 patients (4%) the mutations of *JAK2* exon 12. In ET 72 patients (58%) had *JAK2* V617F mutation, 18 (14%) patients carried *CALR* exon 9 mutations and 1 case (1%) was *MPL*-positive. Among the remaining 33 patients (27%) none of these mutations were found. In PMF 8 cases of *JAK2* V617F mutation were identified (36%) and also 8 mutations in *CALR* gene (36%). There was 1 case of *MPL* mutation identified (5%) within this group. 5 (23%) of PMF patients had none of these defects. Mean allele burden of *JAK2* V617F in PV group stood at 40%, in ET 29%, and in PMF 48%. *CALR* mutations allele burden amounted to 34% in ET and 47% in PMF.

The analysis of clinical and laboratory parameters in polycythemia vera revealed there was no statistical significance when comparing *JAK2* exon 12 and V617F-positive groups. On the other hand, in essential thrombocythemia, the *JAK2* V617F patients had the highest values of mean haemoglobin concentration and median leukocyte count. On contrary, *CALR*-positive group had the highest mean haemoglobin levels and median leukocyte counts. Moreover they had the highest median of platelet count. In primary myelofibrosis *CALR*-positive patients had the highest value of mean haemoglobin concentration and median platelet count. The lowest mean haemoglobin concentration was present in patients negative for the mutations. *JAK2*-

SUMMARY

positive patients had the lowest platelet numbers in this group.

There were significant differences in *JAK2* V617F allele burden among analyzed groups. The highest burden was observed in primary myelofibrosis and polycythemia vera. In terms of *CALR* allele burden, the results pointed out the inverse relationship between %AB and haemoglobin concentrations and hematocrite values. Moreover the median leukocyte counts were higher among patients with higher values of mutated allele.

The results presented in this dissertation confirm practical usefulness of mutation detection in *JAK2*, *MPL* and *CALR* genes in patients suffering from MPN Ph-. They also indicate the need for unification of laboratory methods of mutations detection and quantification. Adequate choice of diagnostic techniques and external quality control is also of great importance for molecular diagnostics of MPNs Ph-.

SPIS TABEL I RYCIN

9.1. Spis tabel

Tabela 1: Podział nowotworów mieloproliferacyjnych i mielodysplastyczno-mieloproliferacyjnych według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia z 2008 roku	8
Tabela 2: Kryteria rozpoznania klasycznych MPN według WHO 2008.....	11
Tabela 3: Skład mieszaniny reakcyjnej RT-PCR na obecność onkogenu <i>BCR-ABL</i>	28
Tabela 4: Warunki multiplex RT-PCR stosowanej do wykrywania obecności onkogenu <i>BCR-ABL</i>	29
Tabela 5: Startery oligonukleotydowe wykorzystane w multiplex RT-PCR stosowanej w celu oceny obecności onkogenu <i>BCR-ABL</i>	29
Tabela 6: Odczynniki wykorzystywane do ARMS-PCR stosowanej w celu wykrywania obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i>	30
Tabela 7: Warunki ARMS-PCR stosowanej do wykrywania obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i>	31
Tabela 8: Startery oligonukleotydowe ARMS-PCR stosowanej do wykrywania obecności mutacji V617F genu <i>JAK2</i>	31
Tabela 9: Odczynniki wykorzystywane do AS RQ-PCR wg zmodyfikowanego protokołu Larsena.....	32
Tabela 10 Warunki AS RQ-PCR wg protokołu Larsena.....	32
Tabela 11 Startery oligonukleotydowe wykorzystane do ilościowej analizy obciążenia allelem V617F genu <i>JAK2</i>	32
Tabela 12: Odczynniki wykorzystywane do PCR do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 12 genu <i>JAK2</i>	34
Tabela 13: Warunki reakcji HRMA do analizy obecności mutacji <i>JAK2</i> egzonu 12.....	35
Tabela 14: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 12 genu <i>JAK2</i>	35
Tabela 15: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji w obrębie egzonu 14 genu <i>JAK2</i>	35
Tabela 16: Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do analizy obecności defektów molekularnych w obrębie egzonu 10 genu <i>MPL</i>	36
Tabela 17: Warunki reakcji HRMA wykorzystywanej w celu oceny obecności mutacji genu <i>MPL</i> w obrębie egzonu 10.....	36
Tabela 18: Startery oligonukleotydowe wykorzystywane do analizy obecności defektów molekularnych genu <i>MPL</i> w obrębie egzonu 10.....	36
Tabela 19: Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej do analizy obecności mutacji genu	

SPIS TABEL I RYCIN

<i>CALR</i> w obrębie egzonu 9.	37
Tabela 20: Warunki reakcji HRMA służącej do analizy obecności mutacji genu <i>CALR</i> w obrębie egzonu 9.	37
Tabela 21: Startery oligonukleotydowe wykorzystane do analizy obecności mutacji genu <i>CALR</i> w obrębie egzonu 9.	38
Tabela 22 Sekwencje referencyjne ludzkiego genomu, wykorzystane do identyfikacji mutacji w programie SeqMan.	40
Tabela 23: Wykaz użytych odczynników	41
Tabela 24: Wykorzystywana aparatura.....	42
Tabela 25: Bufory sporządzone samodzielnie	42
Tabela 26: Materiały referencyjne i standardy molekularne.....	43
Tabela 27: Charakterystyka grupy badanej pod kątem ocenianych podstawowych parametrów kliniczno-laboratoryjnych.	46
Tabela 28: Szczegółowe zestawienie defektów molekularnych, których obecność potwierdzono w grupie badanej.	47
Tabela 29: Wyniki porównania dwóch metod analizy obciążenia allelem V617F genu <i>JAK2</i>	49
Tabela 30: Obciążenia nieprawidłowym allelem genów <i>JAK2</i> i <i>CALR</i> w poszczególnych przypadkach MPN Ph-.....	53
Tabela 31: Związek pomiędzy obecnością mutacji genu <i>CALR</i> w obrębie egzonu 9 oraz mutacji <i>JAK2</i> V617F z wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph-	55
Tabela 32: Związek pomiędzy obecnością mutacji V617F genu <i>JAK2</i> a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph- (po wykluczeniu chorych z czerwienicą prawdziwą).....	55
Tabela 33: Wyniki analizy związku pomiędzy obciążeniem nieprawidłowym allelem <i>CALR</i> lub <i>JAK2</i> V617F a wybranymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi u chorych na MPN Ph-	57

9.2 Spis rycin

Rycina 1: Typy receptorów uczestniczące w transdukcji sygnału za pośrednictwem kaskady JAK-STAT.....	12
Rycina 2: Schemat kaskady JAK-STAT.....	14
Rycina 3: Domenowa struktura ludzkiego białka JAK2	17
Rycina 4: Model in silico interakcji pomiędzy domeną kinazową JH1 i pseudokinazową JH2 kinazy JAK2 w przypadku obecności mutacji zaburzających proces jej autoinhibicji [46].	18
Rycina 5: Struktura ludzkiego białka CALR [53].	20
Rycina 6: Struktura dominującej izoformy P ludzkiego białka MPL	21
Rycina 7: Schemat ARMS-PCR i układ produktów PCR po rozdziale na żelu agarozowym.	30
Rycina 8: Schemat AS RQ-PCR.....	31
Rycina 9: Przebieg reakcji HRMA.....	34
Rycina 10 Rozdział produktów amplifikacji badanego fragmentu genu <i>CALR</i> metodą elektroforezy kapilarnej	39
Rycina 11: Wyniki procesu optymalizacji zastosowanej metody ARMS-PCR.	48
Rycina 12: Wyniki II rundy standaryzacyjnej dotyczącej oceny obciążenia allelem V617F genu <i>JAK2</i>	50
Rycina 13: Częstość występowania mutacji <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> i <i>MPL</i> u pacjentów z czerwienicą prawdziwą, nadpłytkowością samoistną i pierwotnym zwłóknieniem szpiku.	52
Rycina 14: Obciążenia nieprawidłowym allelem V617F genu <i>JAK2</i> u chorych na poszczególne nowotwory mieloproliferacyjne Filadelfia-ujemne.....	53
Rycina 15: Obciążenie nieprawidłowym allelem genu <i>CALR</i> egzonu 9 u chorych na nadpłytkowość samoistną i pierwotną mielofibrozę.	54
Rycina 16: Wynik oceny korelacji wybranych parametrów laboratoryjnych i obciążenia nieprawidłowym allelem genów <i>JAK2</i> (A, B) oraz <i>CALR</i> (C, D)	58
Rycina 17: Średnie stężenie hemoglobiny (A), mediana liczba płytek (B) oraz mediana liczby leukocytów (C) u pacjentów z nadpłytkowością samoistną, obciążonych odpowiednio obecnością mutacji V617F genu <i>JAK2</i> , defektami egzonu 9 genu <i>CALR</i> oraz u chorych wolnych od obecności mutacji genów <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> i <i>CALR</i>	60
Rycina 18: Średnie stężenia hemoglobiny (A) i mediana liczby płytek krwi (B) u pacjentów z pierwotnym zwłóknieniem szpiku, obciążonych obecnością mutacji <i>JAK2</i> V617F lub <i>CALR</i> oraz u chorych bez obecności wymienionych defektów.	61

PIŚMIENNICTWO

1. Larsen, T.S., 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, 2007. **136**(5): p. 745-51.
2. Levine, R.L., et al., *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 673-83.
3. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
4. Alvarez-Larran, A., et al., *WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes*. Br J Haematol, 2014.
5. Jones, A.V., et al., *Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2162-8.
6. Martinez-Aviles, L., et al., *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis*. Haematologica, 2007. **92**(12): p. 1717-8.
7. Chaligne, R., et al., *New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1557-66.
8. Klampfl, T., et al., *Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms*. N Engl J Med, 2013. **369**(25): p. 2379-90.
9. Wojtaszewska, M., M. Iwola, and K. Lewandowski, *Frequency and Molecular Characteristics of Calreticulin Gene (CALR) Mutations in Patients with JAK2 -Negative Myeloproliferative Neoplasms*. Acta Haematol, 2014. **133**(2): p. 193-198.
10. Piller, G., *Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950*. Br J Haematol, 2001. **112**(2): p. 282-92.
11. *History of the liver, spleen and gallbladder*. Stanford University online History of Medicine Lectures.
12. Hajdu, S.I., *A note from history: The discovery of blood cells*. Ann Clin Lab Sci, 2003. **33**(2): p. 237-8.
13. Tefferi, A., *The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 3-13.
14. Dameshek, *Some speculations on the myeloproliferative syndromes*. Blood, 1951. **6**: p. 372-375.
15. Anderson, L.A. and M.F. McMullin, *Epidemiology of MPN: What Do We Know?* Curr Hematol Malig Rep, 2014. **9**(4): p. 340-9.
16. *Nowotwory mieloproliferacyjne i zespoły mielodysplastyczne*, ed. W. K. 2014, Gdańsk: Via Medica.
17. DiNardo, C.D., et al., *Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 958-61.
18. Steensma, D.P. and A. Tefferi, *JAK2 V617F and ringed sideroblasts: not necessarily RARS-T*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1748.
19. Bang, S.M., *Is RARS-T a new disease entity or a subtype of RARS or ET?* Korean J Hematol, 2010. **45**(2): p. 139-40.
20. Tefferi, A., *JAK and MPL mutations in myeloid malignancies*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(3): p. 388-97.
21. McMullin, M.F., *The classification and diagnosis of erythrocytosis*. Int J Lab Hematol, 2008. **30**(6): p. 447-59.
22. Sever, M., et al., *Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia at presentation and transformation*. Int J Hematol, 2009. **90**(4): p. 522-5.
23. Hussein, K., D.L. Van Dyke, and A. Tefferi, *Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion*. Eur J Haematol, 2009. **82**(5): p. 329-38.
24. Schnittger, S., et al., *Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-*

- negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow.* Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1582-5.
25. Nischal, S., et al., *Methylome profiling reveals distinct alterations in phenotypic and mutational subgroups of myeloproliferative neoplasms.* Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1076-85.
 26. Lewandowski, K., *Diagnostyka różnicowa przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych Philadelphia-ujemnych.* Hematologia, 2010. **1**(1): p. 59-70.
 27. Shimoda, K., et al., *Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor.* Blood, 1997. **90**(2): p. 597-604.
 28. Staerk, J. and S.N. Constantinescu, *The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective.* JAKSTAT, 2012. **1**(3): p. 184-90.
 29. Ward, A.C., I. Touw, and A. Yoshimura, *The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis.* Blood, 2000. **95**(1): p. 19-29.
 30. Levine, R.L., et al., *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.* Cancer Cell, 2005. **7**(4): p. 387-97.
 31. Scott, L.M., et al., *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis.* N Engl J Med, 2007. **356**(5): p. 459-68.
 32. Pikman, Y., et al., *MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia.* PLoS Med, 2006. **3**(7): p. e270.
 33. Rampal, R., et al., *Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis.* Blood, 2014. **123**(22): p. e123-33.
 34. Nangalia, J., et al., *Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.* N Engl J Med, 2013. **369**(25): p. 2391-405.
 35. Borowczyk, M., et al., *The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms.* Thromb Res, 2014.
 36. Dupont, S., et al., *The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera.* Blood, 2007. **110**(3): p. 1013-21.
 37. Kjaer, L., et al., *A highly sensitive quantitative real-time PCR assay for determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33100.
 38. Beer, P.A., et al., *MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort.* Blood, 2008. **112**(1): p. 141-9.
 39. Besses, C., et al., *Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia patients.* Br J Haematol, 2011. **152**(4): p. 413-9.
 40. Cervantes, F., et al., *Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis.* Blood, 2013. **122**(25): p. 4047-53.
 41. NCBI. *DNA sequence and analysis of human chromosome 9.* 2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/568815589/>.
 42. GeneCards. *Tyrosine-Protein Kinase JAK2.* 2015; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAK2>.
 43. Vainchenker, W. and S.N. Constantinescu, *JAK/STAT signaling in hematological malignancies.* Oncogene, 2013. **32**(21): p. 2601-13.
 44. Funakoshi-Tago, M., et al., *Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1792-801.
 45. Shan, Y., et al., *Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase.* Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(7): p. 579-84.

46. Kouroupi, E., et al., *Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients*. Br J Haematol, 2008. **142**(4): p. 676-9.
47. Schnittger, S., et al., *Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E*. Leukemia, 2006. **20**(12): p. 2195-7.
48. Database, C. *JAK2 mutation analysis*. 2015; Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=JAK2#dist>.
49. NCBI. *The DNA sequence and biology of human chromosome 19*. 2015; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000019.10.
50. GeneCards. *Calreticulin gene*. 2015; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CALR>.
51. Vannucchi, A.M., et al., *Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value*. Leukemia, 2014. **28**(9): p. 1811-8.
52. Michalak, M., et al., *Calreticulin: one protein, one gene, many functions*. Biochem J, 1999. **344 Pt 2**: p. 281-92.
53. Desai, D., et al., *Inhibition of retinoic acid receptor function and retinoic acid-regulated gene expression in mouse melanoma cells by calreticulin. A potential pathway for cyclic AMP regulation of retinoid action*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15153-9.
54. Marty C, H.N., Pecquet C, Chachoua I, Gryshkova V, Villeval JC, Constantinescu SN, Kralovics R, Vainchenker W, Plo I, *Calr Mutants Retroviral Mouse Models Lead to a Myeloproliferative Neoplasm Mimicking an Essential Thrombocythemia Progressing to a Myelofibrosis in 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition*. 2014: San Francisco, USA.
55. NCBI. *The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1*. 2015; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000001.11.
56. Atlas, E.E. *MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor*. 2015; Available from: http://www.ensembl.org/Papio_anubis/Transcript/Summary?t=ENSPANT00000020367;r=1:45625607-45641142:g=ENSPANG00000009479.
57. Li, J., D.F. Sabath, and D.J. Kuter, *Cloning and functional characterization of a novel c-mpl variant expressed in human CD34 cells and platelets*. Cytokine, 2000. **12**(7): p. 835-44.
58. GeneCards. *MPL Proto-Oncogene, Thrombopoietin Receptor*. 2015; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MPL>.
59. UNIProt. *UniProtKB - P40238 (TPOR_HUMAN)*. 2015; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P40238>.
60. Gurney, A.L., et al., *Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5292-6.
61. Albu, R.I. and S.N. Constantinescu, *Extracellular domain N-glycosylation controls human thrombopoietin receptor cell surface levels*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 71.
62. Defour, J.P., et al., *Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(7): p. 2540-5.
63. He, X., et al., *Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases*. J Hematol Oncol, 2013. **6**: p. 11.
64. Lundberg, P., et al., *Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2014. **123**(14): p. 2220-8.
65. Tefferi, A., *Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1*. Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1128-38.
66. Beillard, E., et al., *Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual*

- disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program.* *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2474-86.
67. van Dongen, J.J., et al., *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.* *Leukemia*, 1999. **13**(12): p. 1901-28.
 68. Damaj, G., et al., *Typical essential thrombocythaemia does not express bcr-abelson fusion transcript.* *Br J Haematol*, 2002. **116**(4): p. 812-6.
 69. Ugo, V., et al., *Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients.* *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8893.
 70. Boyd, E.M., et al., *Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis.* *Br J Haematol*, 2010. **149**(2): p. 250-7.
 71. Wittwer, C.T., *High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations.* *Hum Mutat*, 2009. **30**(6): p. 857-9.
 72. Lippert, E., et al., *The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.* *Blood*, 2006. **108**(6): p. 1865-7.
 73. Larsen, T.S., et al., *Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow.* *Leukemia*, 2008. **22**(1): p. 194-5.
 74. Collier, P., et al., *Validation of standards for quantitative assessment of JAK2 c.1849G>T (p.V617F) allele burden analysis in clinical samples.* *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013. **17**(5): p. 429-37.
 75. Pallisgaard N, H.H., Cassinat A, Kjaer L, Vorland M; Dicker F, Bellosillo Beatriz, Kristensen T, Andersen M, Lippert E, Schwarz J, Bryon J, Naguib D, Nomdedeu J, Aggerholm A, Wojtaszewska M, Andrikovics H, Marušić M, Ayala R, Leibundgut E, Samuelson E, Lode L, Girodon F, Percy M, Hermouet S, *First European JAK2 V617F interlaboratory quality control study carried out by the MPN&MPNr-EuroNet*, in *18th Annual Congress of European Hematology Association (EHA)*. 2013: 13-16.06.2013 Stockholm, Szwecja.
 76. Pallisgaard N, A.J., Hasselbalch HK, Cassinat B, Pancrazzi A, Kjær L, Vorland M, Dicker F, Bellosillo B, Kristensen TK, Andersen MT0, Lippert E, Schwarz J, Bryon J, Naguib D, Nomdedeu J, Aggerholm A, Lewandowski K, Andrikovics H, Marusic M, Ayala R, Oppliger E, Samuelson E, Lodé L, Girodon F, Percy M, Hermouet S. , *European JAK2V617F interlaboratory quality control study carried out by the MPN&MPNr-EURONET (COST ACTION BM0902) in XXXIV Nordic Congress of Clinical Chemistry*. 2013: Goteborg, Szwecja.
 77. Cankovic, M., et al., *Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods.* *Am J Clin Pathol*, 2009. **132**(5): p. 713-21.
 78. Fontanelli, G., et al., *Real-Time PCR and Droplet Digital PCR: two techniques for detection of the JAK2 mutation in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms.* *Int J Lab Hematol*, 2015.
 79. Martinaud, C., P. Brisou, and M.J. Mozziconacci, *Is the JAK2(V617F) mutation detectable in healthy volunteers?* *Am J Hematol*, 2010. **85**(4): p. 287-8.
 80. Passamonti, F., et al., *JAK2 (V617F) mutation in healthy individuals.* *Br J Haematol*, 2007. **136**(4): p. 678-9.
 81. Sidon, P., et al., *The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors.* *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1622.
 82. Lange, T., et al., *JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month*

- after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse.* Haematologica, 2013. **98**(5): p. 722-8.
83. Mattocks, C.J., et al., *A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests.* Eur J Hum Genet, 2010. **18**(12): p. 1276-88.
 84. Zimmern, R.L. and M. Kroese, *The evaluation of genetic tests.* J Public Health (Oxf), 2007. **29**(3): p. 246-50.
 85. Agarwal, R., et al., *KIT D816V mutation detection: a comparative study using peripheral blood, bone marrow aspirate and bone marrow trephine samples for detection of KIT mutations in patients with systemic mastocytosis.* Leuk Lymphoma, 2014. **55**(9): p. 2202-3.
 86. Sakhinia, E., et al., *Comparison of gene-expression profiles in parallel bone marrow and peripheral blood samples in acute myeloid leukaemia by real-time polymerase chain reaction.* J Clin Pathol, 2006. **59**(10): p. 1059-65.
 87. Takahashi, K., et al., *JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms.* Blood, 2013. **122**(23): p. 3784-6.
 88. Raymaekers, M., et al., *Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays.* J Clin Lab Anal, 2009. **23**(3): p. 145-51.
 89. Sacha, T., et al., *[Standardization of quantitative detection of BCR-ABL gene expression by RQ-PCR in patients with chronic myeloid leukemia in cooperation with European Leukemia Net].* Przegl Lek, 2010. **67**(7): p. 454-9.
 90. Girodon, F. *COMPARISON of 3 TECHNICAL APPROACHES IN CALRETICULINE MUTATIONS.* in *Tenth MPN&MPNr Euronet Meeting Zagreb.* 2015. Croatia.
 91. Bilbao-Sieyro, C., et al., *High resolution melting analysis: a rapid and accurate method to detect CALR mutations.* PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103511.
 92. Jones, A.V., et al., *Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms.* Leuk Res, 2015. **39**(1): p. 82-7.
 93. Langabeer, S.E., et al., *Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms.* Eur J Haematol, 2015.
 94. Righetti, P.G. and C. Gelfi, *Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics: an update.* J Capill Electrophor Microchip Technol, 1999. **6**(3-4): p. 119-24.
 95. Ohyashiki, J.H., et al., *Detection of low allele burden of JAK2 exon 12 mutations using TA-cloning in patients with erythrocytosis.* Jpn J Clin Oncol, 2009. **39**(8): p. 509-13.
 96. Pancrazzi, A., et al., *A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in chronic myeloproliferative disorders with locked nucleic acid-modified probes and real-time polymerase chain reaction.* J Mol Diagn, 2008. **10**(5): p. 435-41.
 97. Skoda, R.C., A. Duek, and J. Grisouard, *Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms.* Exp Hematol, 2015. **43**(8): p. 599-608.
 98. Vannucchi, A.M., et al., *Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal.* Leukemia, 2008. **22**(7): p. 1299-307.
 99. Rumi, E., et al., *JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes.* Blood, 2014. **123**(10): p. 1544-51.
 100. Li, N., et al., *Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations.* Leuk Res, 2015. **39**(5): p. 510-4.
 101. Diep K, M.W., Albitar F, De Dios I, Agersborg S, Thangavelu M, Brodie S, Albitar M, *Determining Tumor Load and Biallelic Mutation in Patients with CALR Mutation Using Peripheral Blood Plasma* in *56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition.* 2014: San Francisco, USA.
 102. Palandri, F., et al., *Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential*

- thrombocythemia or early primary myelofibrosis*. Leukemia, 2015. **29**(6): p. 1344-9.
103. Andrikovics, H., et al., *Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1184-90.
104. Gong, J.Z., et al., *Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 2013. **15**(6): p. 733-44.
105. Kiladjan, J.J., *The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 561-6.
106. Rumi, E., et al., *Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis*. Blood, 2014. **124**(7): p. 1062-9.
107. Larsen, T.S., et al., *The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype*. Eur J Haematol, 2007. **79**(6): p. 508-15.
108. Vannucchi, A.M., L. Pieri, and P. Guglielmelli, *JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment*. Ther Adv Hematol, 2011. **2**(1): p. 21-32.
109. Passamonti, F. and E. Rumi, *Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden*. Haematologica, 2009. **94**(1): p. 7-10.
110. Passamonti, F., et al., *Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2813-6.
111. Chen, C.C., et al., *Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia*. Ann Hematol, 2014. **93**(12): p. 2029-36.