

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KRALJ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KRALJ

**VPELJAVA NOVIH MOLEKULARNO GENETSKIH
PREISKAV ZA OPREDELITEV BOLNIKOV S KRONIČNO
MIELOPROLIFERATIVNO BOLEZNIJO**

**INTRODUCTION OF NEW MOLECULAR GENETIC TESTS
FOR THE DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH CHRONIC
MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Zahvala

Na tem mestu bi se najprej najlepše zahvalila celotnemu osebju Specializiranega hematološkega laboratorija na Polikliniki, ki me je sprejelo medse in mi omogočilo prijetno delo v laboratoriju. Predvsem gre moja zahvala somentorju asist. mag. Tadeju Pajiču za vodenje poteka mojega dela in gospe Anici Mihajlović za veliko pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Nič manj pa seveda niste pomembni tudi vsi ostali, predvsem starši, sestra in brat, sošolci in prijatelji, skratka vsi, ki ste me na kakršenkoli način spremljali med študijem, me spodbujali, bodrili, mi pomagali pozabiti marsikakšen neuspeh... Naloga, ki je pred vami, je tudi delo vaših prizadevanj in dobre volje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Petra Černelča, dr. med. in somentorstvom asist. mag. Tadeja Pajiča, univ. dipl. inž. kem. inž., spec. med. biokem.

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Ljubljana, 2008

VSEBINA

POVZETEK -----IV

SEZNAM OKRAJŠAV ----- V

1 UVOD -----1

1.1 KRONIČNE MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI -----1

1.1.1 PRAVA POLICITEMIJA ----- 2

1.1.2 ESENCIALNA TROMBOCITEMIJA----- 4

1.1.3 KRONIČNA IDIOPATIČNA MIELOFIBROZA ----- 7

1.2 JAK2 GEN IN PATOGENEZA MPB-----9

1.3 VLOGA SHP-1 IN SHP-2 V CELIČNI SIGNALIZACIJI ----- 12

1.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR) ----- 13

1.4.1 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU -----14

1.4.2 KVANTIFIKACIJA GENSKE EKSPRESIJE-----16

2 NAMEN DELA ----- 18

3 PREISKOVANCI IN NAČINI DELA----- 19

3.1 PREISKOVANCI----- 19

3.2 METODE----- 19

3.3 NAČIN DELA ----- 20

3.3.1 OSAMITEV NUKLEINSKIH KISLIN IZ VZORCEV VENSKE KRVI-----20

3.3.1.1 Osamitev granulocitov z razgradnjo eritrocitov s Tris-amonijevim kloridom-----20

3.3.1.2 Osamitev DNA iz granulocitov venske krvi -----21

3.3.1.3 Osamitev RNA iz levkocitov venske krvi -----23

3.3.1.4 Merjenje koncentracije in čistoče vzorcev nukleinskih kislin -----24

3.3.2 METODE ZA DOLOČANJE PRISOTNOSTI MUTACIJ V GENU *JAK2* -----25

3.3.2.1 Določanje mutacije *JAK2V617F* z alelno specifičnim PCR -----25

3.3.2.2 Določanje mutacije *JAK2V617F* z RQ-PCR in pristopom alelne diskriminacije s hidrolizo fluorescenčno označenih sond -----28

3.3.2.3 Določanje *JAK2V617F* mutacije z RQ-PCR ob uporabi umeritvene krivulje-----31

3.3.2.4 Določanje pridobljenih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* z alelno specifičnim PCR -----33

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.2.5 | Elektroforezna detekcija nukleinskih kislin ----- | 36 |
| 3.3.3 | ANALIZA IZRAŽANJA GENOV <i>PTPN6</i> IN <i>PTPN11</i> ----- | 37 |
| 3.3.3.1 | Sinteza cDNA ----- | 37 |
| 3.3.3.2 | Kvantitativno določanje genov <i>PTPN6</i> in <i>PTPN11</i> z RQ-PCR ----- | 38 |
| 3.4 | STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV ----- | 41 |
| 4 | <u>REZULTATI -----</u> | 42 |
| 4.1 | DOLOČANJE PRISOTNOSTI <i>JAK2V617F</i> PRI BOLNIKI S KMPB ----- | 42 |
| 4.1.1 | PRIMERJAVA OBČUTLJIVOSTI RAZLIČNIH METOD VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO (PCR) ZA DOLOČANJE PRISOTNOSTI <i>JAK2V617F</i> MUTACIJE ----- | 42 |
| 4.1.2 | PONOVLJIVOST REZULTATOV DOLOČANJA DELEŽA <i>JAK2V617F</i> Z RQ-PCR S POMOČJO UMERITVENE KRIVULJE ----- | 43 |
| 4.1.3 | DELEŽ MUTIRANEGA ALELA <i>JAK2V617F</i> PRI BOLNIKI S KMPB IN NJEGOVA KORELACIJA - S PARAMETRI KRVNE SLIKE ----- | 47 |
| 4.2 | REZULTATI ELEKTROFOREZE PCR PRIDELKOV ZA DOLOČANJE MUTACIJE <i>JAK2</i> V EKSONU 12 ----- | 51 |
| 4.3 | KVANTIFIKACIJA IZRAŽANJA GENOV <i>PTPN6</i> IN <i>PTPN11</i> S PRIMERJALNO $\Delta\Delta C_T$ METODO ----- | 53 |
| 4.3.1 | VPELJAVA $\Delta\Delta C_T$ METODE ----- | 53 |
| 4.3.2 | IZRAČUN RELATIVNE GENSKE EKSPRESIJE <i>PTPN6</i> IN <i>PTPN11</i> ZA VZORCE BOLNIKOV S PP IN ET PO PRIMERJALNI $\Delta\Delta C_T$ METODI ----- | 56 |
| 5 | <u>RAZPRAVA -----</u> | 63 |
| 6 | <u>ZAKLJUČKI -----</u> | 68 |
| 7 | <u>LITERATURA -----</u> | 69 |

POVZETEK

Kronične mieloproliferativne bolezni so skupina kronično potekajočih krvnih bolezni, pri katerih je zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične celice.

Mutacija *JAK2V617F* predstavlja nov diagnostični kriterij za opredelitev bolnikov z *BCR-ABL* negativno KMPB. Prisotna je pri 65-97 % bolnikov s pravo policitemijo (PP), 25-75 % bolnikov z esencialno trombocitemijo (ET) in 50 % bolnikov s kronično idiopatično mielofibrozo (KIM). Pri bolnikih s pravo policitemijo in odsotno *JAK2V617F* mutacijo pogosto ugotovimo *JAK2* mutacije v eksonu 12, ki so odgovorne za značilno eritrocitozo.

Pomemben vpliv na proliferacijo hematopoetskih celic imata tudi nereceptorski tirozinski fosfatazi, SHP-1 in SHP-2, ki ju kodirata gena *PTPN6* in *PTPN11*. Spremembo izražanja obeh pri človeku pogosto opazimo pri različnih vrstah levkemij in limfomov.

V raziskavo smo vključili 110 bolnikov z diagnozo ET, PP in KIM, za katere smo imeli shranjene vzorce DNA granulocitov. Z alelno specifično verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in dvema različnima načinoma kvantitativnega PCR (RQ-PCR) smo določili prisotnost mutacije *JAK2V617F*. Z najbolj občutljivo in ponovljivo metodo smo pridobili tudi delež mutiranega alela v vzorcih DNA granulocitov. Prisotnost *JAK2* mutacije v eksonu 12 pri bolniku s PP in odsotno *JAK2V617F* mutacijo smo določili s pomočjo alelno specifičnega PCR.

Za določanje relativne genske ekspresije *PTPN6* in *PTPN11* smo vzorce RNA 32 bolnikov z diagnozo ET in PP z reverzno transkriptazo najprej prepisali v cDNA, nato pa z RQ-PCR določili cDNA segment obeh preiskovanih genov in referenčnega gena za $\beta 2$ mikroglobulin (*B2M*). Relativno kvantifikacijo izražanja genov *PTPN6* in *PTPN11* smo izvedli po primerjalni $\Delta\Delta C_t$ metodi.

Uvedli smo kvantitativno določanje mutacije *JAK2V617F* in določanje prisotnosti *JAK2* mutacije v eksonu 12 z alelno specifičnim PCR. Potrdili smo različen delež *JAK2V617F* pri bolnikih z ET, PP in KIM in njen vpliv na krvno sliko. Možno je, da gre pri kroničnih mieloproliferativnih boleznih za enovito bolezen z različnimi fenotipi bolezni glede na delež mutiranega alela *JAK2V617F*. Povezave sprememb izražanja fosfataz SHP-1 in SHP-2 s krvno sliko pri PP in ET nismo dokazali.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------|--|
| cDNA | komplementarna DNA |
| Ct | cikel pri katerem fluorescenčni signal preseže predviden prag |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| dNTP | deoksinukleotid |
| EDTA | etilendiamintetraocetna kislina |
| EPO | eritropoetin |
| ET | esencialna trombocitemija |
| G-CSF | dejavnik, ki stimulira rast kolonij granulocitov |
| GM-CSF | dejavnik, ki stimulira rast kolonij granulocitov in makrofagov |
| Hb | koncentracija hemoglobina |
| HES | hipereozinofilni sindrom |
| Jak2 | Janus kinaza 2 |
| KIM | kronična idiopatična mielofibroza |
| KML | kronična mieloična levkemija |
| KMML | kronična mielomonocitna levkemija |
| KMPB | kronična mieloproliferativna bolezen |
| LDH | holesterol majhne gostote |
| MDS | mielodisplastični sindrom |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo |
| PP | prava policitemija |
| PVE | povprečni volumen eritrocitov |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| RQ-PCR | verižna reakcija s polimerazo v realnem času |
| RT-PCR | obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo |
| SHP | tirozinska fosfataza |
| STAT | molekule, ki posredujejo signal in aktivirajo prepis DNA |
| SZO | Svetovna zdravstvena organizacija |
| VSE | volumen sedimentiranih eritrocitov |

1 UVOD

1.1 KRONIČNE MIELOPROLIFERATIVNE BOLEZNI

Kronične mieloproliferativne bolezni (KMPB) so skupina kronično potekajočih krvnih bolezni, pri katerih je zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične krvotvorne celice. Hematopoeza je še učinkovita, zato poraste število eritrocitov, levkocitov in trombocitov v periferni krvi. Razraščajo se celice kostnega mozga (KM) z znaki dozorevanja brez displastičnih sprememb. Gre za klonske bolezni. Pri opredelitvi bolezni je v zadnjih letih poseben poudarek na citogenetskih in molekularno genetskih preiskavah. Bolezni imajo klinično precej skupnih značilnosti. Potek je večinoma dolgotrajen, razen pri kronični mieloični levkemiji (KML), v končnem obdobju pa pospešen ali pa ima značilnosti akutne levkemije. Ena oblika bolezni lahko preide v drugo, vendar to ni običajno (1).

Z izjemo KML, za katero je značilna prisotnost zlitega gena *BCR-ABL*, molekularno genetsko ozadje drugih KMPB dolgo ni bilo pojasnjeno. Leta 2005 pa sta dve neodvisni raziskavi dokazali, da je pri večini bolnikov s PP in pri približno polovici bolnikov z ET in KIM prisotna pridobljena somatska mutacija V617F v genu za Jak2, ki se nahaja na kromosomu 9. Mutacijo le redko najdemo pri ostalih mieloproliferativnih in mielodisplastičnih boleznih, pri zdravih osebah je do sedaj niso ugotovili (2).

Preglednica I: Razvrstitev kroničnih mieloproliferativnih bolezni po SZO (2001) (1)

| |
|--|
| Kronična mieloična levkemija (Philadelphia kromosom, t(9;22)(q34;q11), <i>BCR-ABL</i> pozitivna) |
| Kronična nevtrofilna levkemija |
| Kronična eozinofilna levkemija (in ideopatski hipereozinofilni sindrom) |
| Prava policitemija |
| Esencialna trombocitemija |
| Kronična idiopatična mielofibroza |
| Kronične mieloproliferativne bolezni, neklasificirane |

1.1.1 Prava policitemija

Prava policitemija (PP) je kronična mieloproliferativna bolezen, za katero je značilna zvečana masa eritrocitov zaradi samostojnega in nepovratnega razraščanja mieloičnih celic v kostnem mozgu, predvsem celic rdeče vrste.

Opazimo dve obdobji razvoja bolezni: 1) začetno proliferativno, policitemično obdobje s povečano maso eritrocitov in 2) post-policitemično obdobje s citopenijo, ki vključuje anemijo, zmanjšanje števila levkocitov in trombocitov, in je posledica neučinkovite hematopoeze, fibroze kostnega mozga in povečane vranice.

Znaki bolezni se razvijejo postopoma in so večinoma povezani s hipertenzijo in žilnimi zapleti, ki jih povzročita povečana masa eritrocitov in posledično povečan volumen krvi. Vene so razširjene in prenapolnjene. Viskoznost krvi je povečana. Zaradi upočasnjeneega toka krvi lahko nastanejo motnje v prekrvavitvi in hipoksija tkiv, nevarnost za trombozo je večja.

Pogostost PP je 4 do 5/1.000.000 ljudi. Pojavlja se predvsem med 40. in 60. letom starosti, bolj pogosta je pri moških kot pri ženskah. Pri otrocih je izredno redka.

Prava policitemija je neozdravljiva bolezen, nastane postopno in napreduje počasi. Najboljši način zdravljenja pri bolnikih mlajših od 60 let in benignem poteku bolezni so venepunkcije in Aspirin v odmerku 100 mg dnevno. Z venepunkcijami hitro zmanjšamo količino eritrocitov in s tem viskoznost krvi. Odvzamemo 300 do 500 mL krvi v dvo- do tridnevni presledkih, dokler se volumen sedimentiranih eritrocitov (VSE) ne zmanjša pod 0,450.

Za zdravljenje s citostatiki se odločimo pri večji trombocitozi, levkocitozi, močno povečani vranici ter pri povečanem tveganju za trombozo. Uporabljamo hidroksikarbamid in interferon alfa. Razraščanje celic v kostnem mozgu zmanjšamo tudi z radioaktivnim fosforjem (1).

Diagnoza

Pravo policitemijo moramo razlikovati od eritrocitoze zaradi drugih bolezni.

Preglednica II: Razdelitev eritrocitov (1)

| |
|--|
| Primarna eritrocitoza: |
| Prava policitemija |
| Čista primarna eritrocitoza |
| Sekundarna eritrocitoza: |
| <i>Zaradi hipoksije pri kroničnih boleznih pljuč, alveolarni hipoventilaciji, desno-levem šantu, visoki nadmorski višini, karboksihemoglobinemiji, hemoglobinopatiji z zvečano afiniteto za kisik, prirojenem pomanjkanju 2,3-difosfoglicerata v eritrocitih</i> |
| <i>Zaradi neustreznega izločanja eritropoetina pri paraneoplastičnih spremembah, ledvičnih boleznih, terapiji z androgeni</i> |

Pri PP je v krvni sliki povečana koncentracija hemoglobina (Hb), število eritrocitov in VSE nad 0,48 pri ženskah in nad 0,51 pri moških. Spremembe eritrocitov v krvi so povezane s trajanjem bolezni. Mikrocitoza in hipokromija eritrocitov nastaneta zaradi pomanjkanja železa, katerega poraba se poveča ob pospešeni eritropoezi, izgubi zaradi krvavitve ali zdravljenja z venepunkcijami. Nasičenost hemoglobina s kisikom je normalna (> 92 %).

Pri okoli dveh tretjinah bolnikov ugotovimo tudi zmerno levkocitozo v periferni krvi. Povečano je število paličastih nevtrofilcev, lahko metamielocitov in mielocitov ter krvnih bazofilcev. Aktivnost alkalne fosfataze navtrofilcev je povečana. Število trombocitov je povečano pri 50 % bolnikov s PP. Včasih jih je celo več kot $1000 \times 10^9/L$, so večji in nepravilnih oblik, spremenjena pa je tudi njihova funkcija.

Kostni mozeg je hipercelularen. Razraščajo se predvsem celice rdeče, pa tudi granulocitne in megakariocitne vrste. V retikulumskih celicah oziroma makrofagih ni železa ali pa ga je malo. Na začetku bolezni v kostnem mozgu le redko ugotovimo razraščanje vezivnega tkiva.

Koncentracija sečne kisline v serumu je pogosto povečana, vendar ima zelo malo bolnikov protin. Koncentracija serumskega železa je običajno zmanjšana, povečana pa je koncentracija transferina. Zmanjšana je tudi koncentracija eritropoetina (EPO) v serumu in seču (1).

Preglednica III: Diagnostični kriteriji za PP (SZO 2001 in 2008) (1, 15)

| Diagnostični kriteriji za PP (2001) | Diagnostični kriteriji za PP (2008) |
|---|---|
| A1. VSE moški >60 %, ženske >57 % ali masa eritrocitov moški >36 mL/kg, ženske >32 mL/kg | A1. Hb >185 g/L (moški), >165 g/L (ženske) ali |
| A2. odsotnost razlogov za sekundarno eritrocitozo (normalna nasičenost arterijske krvi s kisikom in normalna vrednost serumskega EPO) | Hb ali VSE > 99 % referenčne vrednosti za določeno starost, spol ali nadmorsko višino ali |
| A3. povečana vranica | Hb >170 g/L (moški), >150 g/L (ženske) ob dolgotrajnem zvečanju ≥ 20 g/L od običajne vrednosti, ki ni posledica pomanjkanja železa |
| A4. prisotnost pridobljene genske mutacije (izključen <i>BCR-ABL</i>) v krvnih celicah | ali |
| B1. trombocitoza (število trombocitov $>400 \times 10^9/L$) | povečana masa eritrocitov >25 % nad normalno predvideno vrednostjo |
| B2. levkocitoza (število levkocitov $>12 \times 10^9/L$) | A2. prisotnost <i>JAK2V617F</i> ali druge podobne mutacije |
| B3. biopsija kostnega mozga: razrast celic rdeče in megakariocitne vrste | B1. biopsija kostnega mozga: razrast celic mieloične vrste |
| B4. nizka koncentracija EPO v serumu | B2. nizka koncentracija EPO v serumu |
| | B3. rast endogenih eritroidnih kolonij |
| PP = A1 + A2 + A ali A1 + A2 + 2B | PP = A1 + A2 + B ali A1 + 2B |

Legenda: PP (prava policitemija), EPO (eritropoetin), VSE (volumen sedimentiranih eritrocitov), Hb (koncentracija hemoglobina)

1.1.2 Esencialna trombocitemija

Esencialna trombocitemija (ET) je klonska mieloproliferativna bolezen, ki prizadene predvsem megakariocitno vrsto. Za ET je značilna dolgotrajna trombocitoza in povečano število velikih, zrelih megakariocitov v kostnem mozgu.

Pri 20–50 % bolnikov se bolezen manifestira v obliki tromboz ali krvavitve, ki so tudi glavni vzrok smrti bolnikov. Mikrovaskularne okluzije privedejo do prehodne ishemijske možganov, parestezij in gangren, možne pa so tudi tromboze velikih arterij in ven, predvsem hepatične in vranične vene. Pri okoli 60 % bolnikov obstaja nagnjenost h krvavitvam iz gastrointestinalnega trakta, nosu, v kožo in sluznice.

Ker je naravni potek bolezni dolgotrajen, pri izbiri zdravljenja uporabljamo čim manj onkogeno zdravila, kot sta hidroksikarbamid in rekombinantni interferon alfa. Druga necitostatična zdravila v terapiji ET so še anagrelid, ki zavira proliferacijo megakariocitov, ne vpliva pa na število drugih celic v kostnem mozgu, in Aspirin v odmerku 100 mg dnevno. Slednjega dajemo pri arterijskih trombozah za preprečevanje gangrene in pri cerebrovaskularni ishemiji.

Pojavnost ET naj bi bila 1 do 2,5/100.000 prebivalcev. Bolezen je najbolj pogosta med 50. in 70. letom starosti, pogosteje obolevajo ženske (1).

Diagnoza

Pri postavljanju diagnoze ET moramo najprej izključiti vse druge vzroke za trombocitozo, kot so krvavitve, okužbe in vnetja, rak ali trombocitoza po odstranitvi vranice. Število trombocitov pri ET praviloma presega $400 \times 10^9/L$, pogosto je med 1000 in $2000 \times 10^9/L$ ali več. Trombociti imajo večji volumen, posamezni so lahko zelo veliki in nepravilnih oblik, njihova funkcija pa je lahko zmanjšana.

Kadar je prisotna anemija, je blaga, normocitna in normokromna, po krvavitvah pa hipokromna in mikrocitna. Število levkocitov in nevtrofilcev v periferni krvi je neznatno zvečano. Aktivnost alkalne fosfataze nevtrofilcev je običajno zvečana.

Kostni mozeg je v razraščanju predvsem na račun megakariocitne vrste celic, pa tudi rdeče in granulocitne. Najbolj značilno je razraščanje zelo velikih, skoraj gigantskih megakariocitov, ki imajo hiperlobulirana jedra in obilno citoplazmo. Lahko je prisotna blaga retikuloplazija (1).

Preglednica IV: Diagnostični kriteriji za ET (SZO 2001 in 2008) (1,15)

| Diagnostični kriteriji za ET (2001) | Diagnostični kriteriji za ET (2008) |
|---|--|
| potrditveni kriteriji | A1. število trombocitov $\geq 450 \times 10^9/L$ |
| - število trombocitov $> 600 \times 10^9/L$ - biopsija kostnega mozga: proliferacija celic megakariocitne vrste s povečanim številom velikih, zrelih megakariocitov | A2. proliferacija celic megakariocitne vrste s povečanim številom velikih, zrelih megakariocitov, odsotna ali majhna proliferacija celic granulocitne in rdeče vrste |
| izključitveni kriteriji | A3. ne ustreza kriterijem SZO za KML, PP, KIM, MDS ali drugo mieloično neoplazmo |
| <u>ni znakov za PP:</u> - normalna masa eritrocitov ali Hb < 185 g/L (moški), Hb < 165 g/L (ženske) - prisotnost železa v kostnem mozgu, normalna koncentracija feritina v serumu in normalen PVE | A4. prisotnost <i>JAK2V617F</i> ali drugega označevalca klonalnosti ali ni znakov za reaktivno trombocitozo |
| <u>ni znakov za KML:</u> - ni Philadelphia kromosoma in <i>BCR-ABL</i> fuzijskega gena | ET = A1 + A2 + A3 + A4 |
| <u>ni znakov za KIM:</u> - odsotnost kolagenske fibroze - malo retikulina v kostnem mozgu | |
| <u>ni znakov za MDS:</u> - odsotnost del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26) - ni disgranulopoeze, brez ali zelo malo mikromegakariocitov | |
| <u>ni znakov za reaktivno trombocitozo</u> <u>odsotnost vnetja, okužbe, maligne tvorbe</u> <u>ni stanja po odstranitvi vranice</u> | |

Legenda: KML (kronična mieloična levkemija), KIM (kronična idiopatična mielofibroza), MDS (mielodisplastični sindrom), PP (prava policitemija), ET (esencialna trombocitemija), PVE (povprečen volumen eritrocitov)

1.1.3 Kronična idiopatična mielofibroza

Gre za klonsko mieloproliferativno bolezen z značilnim razraščanjem vezivnega tkiva in včasih nastajanjem novega kostnega tkiva v kostnem mozgu ter mieloično metaplazijo v drugih organih. Bolezen ima veliko imen: agnogeno mielooidno metaplazijo, mieloskleroza z mielooidno metaplazijo, kronična granulocitna-megakariocitna mieloza, kronična idiopatična mielofibroza (KIM), primarna mielofibroza.

Etiologije bolezni ne poznamo, v redkih primerih pa naj bi se pojavila po ionizirajočem sevanju ali stiku z benzenom, opisana je tudi družinska mielofibroza. Fibroza kostnega mozga je sekundarna. Trombociti vsebujejo dejavnik, ki spodbuja razraščanje fibroblastov. V kostnem mozgu nastanejo vezivna vlakna. Pride do ekstramedularne hematopoeze predvsem v vranici, jetrih, pa tudi drugje, na primer v bezgavkah, ledvicah, črevesju, pljučih. Včasih so ta žarišča v obliki tumorja, sestavljenega iz vezivnih in krvotvornih celic. Posledica krvotvornega tkiva v jetrih je portalna hipertenzija z ascitesom in varicami v steni požiralnika in želodca. Za potrditev bolezni je odločilen histološki pregled biopsije kostnega mozga, saj je punkcija kostnega mozga navadno suha. Poleg KIM so lahko vzrok za fibrozo kostnega mozga tudi nekatere druge bolezni: tuberkuloza, osteomielitis, maligni limfomi, metastaze karcinoma v kostnem mozgu, občasno pa jo najdemo tudi pri KML ali akutnih levkemijah.

Za KIM zbolijo 1/100000 prebivalcev letno, večinoma so bolniki starejši, bolezen pa je enako pogosta pri moških kot pri ženskah.

Če so bolniki s KIM brez težav, jih ne zdravimo, saj z zdravljenjem ne vplivamo na potek bolezni, niti ne podaljšujemo preživetja. Največji problem je anemija, ki jo pri hudi obliki in težavah z njo zdravimo z glukokortikoidi ali eritropoetinom. Za zdravljenje s citostatiki se odločimo pri močno povečani vranici. Uporabljamo busulfan, učinkoviti pa so tudi hidroksikarbamid, 6-tiogvanin, majhni odmerki melfalana in interferon alfa.

Bolezen postopoma napreduje. Povprečno preživetje je 5 let, 25 % bolnikov pa živi tudi do 15 let (1).

Diagnoza

Pri večini bolnikov s KIM ugotovimo anemijo, ki je običajno normocitna normokromna. Vzrok zanjo je neučinkovita eritropoeza, povečano zadrževanje eritrocitov v vranici in skrajšana življenjska doba eritrocitov. Število retikulocitov je ponavadi zvečano. V krvnem razmazu so številni dakriociti. Redkokdaj je prisotno tudi pomanjkanje folatov.

Število levkocitov je zvečano pri 50 % bolnikov, pri okoli 25 % zmanjšano, pri drugih normalno. V diferencialni krvni sliki vedno najdemo tudi nezrele oblike od mieloblasta naprej, pri večini pa še eritroblaste, ki so včasih dokaj številni (levkoeritroblastna krvna slika). Aktivnost alkalne fosfataze nevtrofilcev je zvečana (25 % bolnikov), zmanjšana (25 % bolnikov) ali pa normalna.

Okoli 50 % bolnikov ima na začetku boleznii povečano število trombocitov, ko bolezen napreduje, pa nastane trombocitopenija. Trombociti so morfološko nepravilni, lahko so zelo veliki, pogoste so tudi njihove funkcijske motnje.

V začetku boleznii lahko pri punkciji še dobimo tkivo kostnega mozga, pri napredovani boleznii pa je punkcija kostnega mozga suha, zato je potrebno narediti biopsijo. Kostni mozeg je v začetku hipercelularen zaradi razraščanja vseh treh vrst mieloičnih celic, kasneje pa vedno bolj prevladujejo vezivna vlakna. Prisotni so številni megakariociti. Pri okoli 40 % bolnikov ugotovimo osteosklerozo ali osteoporozo. Približno 20 do 30 % bolnikov zajamemo v prefibrotičnem stanju, pri večini bolnikov pa gre že v začetku za fibrotični stadij. Prizadeta so predvsem vranica, medenica, stegenici in nadlaktnici (1).

Preglednica V: Diagnostični kriteriji za KIM (SZO 2008) (15)

| Diagnostični kriteriji za KIM (2008) |
|---|
| A1. proliferacija megakariocitov in atipija (majhni do veliki megakariociti z neobičajnim razmerjem jedro/citoplazma in hiperkromatičnim in nenavadno zvitim jedrom), ki jo spremlja retikulinska in/ali kolagenska fibroza ali v odsotnosti retikulinske fibroze megakariocitne spremembe spremlja hipercelularnost kostnega mozga, granulocitna proliferacija in zmanjšana eritropoeza (pre-fibrotična KIM) |

| |
|--|
| A2. ne ustreza kriterijem Svetovne zdravstvene organizacije za KML, PP, MDS ali drugo mieloično neoplazmo |
| A3. prisotnost <i>JAK2V617F</i> ali drugega označevalca klonalnosti ali ni dokazov za reaktivno fibrozo kostnega mozga |
| B1. levkoeritroblastoza (vsaj 2 nezreli celici rdeče ali mieloične vrste v periferni krvi) |
| B2. povečana serumska aktivnost LDH |
| B3. anemija |
| B4. tipna vranica |
| $KIM = A1 + A2 + A3 + 2B$ |

Legenda: KIM (kronična idiopatična mielofibroza), KML (kronična mieloična levkemija), PP (policitemija vera), MDS (mielodisplastični sindrom), LDH (holesterol majhne gostote)

1.2 JAK2 GEN IN PATOGENEZA MPB

Marca in aprila 2005 so štiri skupine raziskovalcev poročale o odkritju pridobljene mutacije *JAK2*, imenovane *JAK2V617F*, ki naj bi bila povezana s PP in sorodnimi KMPB. Gre za točkovno mutacijo (1849G→T) v genu, ki nosi zapis za Janus kinazo 2 (Jak2) in se nahaja v eksonu 14 kromosoma 9. Ta sprememba povzroči zamenjavo valina s fenilalaninom v kodonu 617 JH2 domene Jak2 proteina in s tem vpliva na njegovo kinazno aktivnost (2).

Jak2 je citoplazemska tirozinska kinaza, ki v normalnih in neoplastičnih celicah posreduje signale sprožene z ravnimi dejavniki, kot so eritropoetin, trombopoetin, interleukin-3 ter dejavnikov, ki stimulirata rast kolonij granulocitov in makrofagov (G-CSF, GM-CSF) (3). Njeno strukturo tvorijo tri domene: JH1 kinazni domeni, ki se nahaja blizu karboksilnega konca proteina, sledi JH2 psevdokoinazna domena, negativni regulator kinazne aktivnosti JH1 domene. Blizu N terminalnega dela se nahaja še FERM (4-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) homologna domena, ki je odgovorna za nekovalentno vezavo na citoplazemsko regijo tipa I citokinskih receptorjev (4, 6).

Pomemben vpogled v mehanizem aktivacije in regulacije Jak2 je omogočila razjasnitev terciarne strukture receptorja za eritropoetin. Ko EPO ni vezan na receptor, obstaja le-ta v dimerni obliki, pri čemer je razdalja med njegovima transmembranskima domenama 73 Å.

Po vezavi liganda se njegova konformacija spremeni tako, da se citoplazemski domeni približata na razdaljo 39 Å, to pa omogoči medsebojno navzkrižno fosforilacijo in aktivacijo citoplazemskega dela receptorja in na receptor vezanih Jak2 proteinov (3, 5).

Mutacija *JAK2V617F*, ki se nahaja v JH2 domeni, je razlog za moteno avtoinhibicijo JH1 s strani psevdokinazne domene in posledično stalno fosforilacijo aktivacijske zanke kinazne domene. Kinaza nekontrolirano fosforilira signalne proteine STAT5, MAPK/ERK in PI3K/AKT, kar privede do povečane odzivnosti receptorja na citokine oziroma citokinsko neodvisne proliferacije celičnih linij z izraženimi citokinskimi receptorji (8).

Začetne raziskave so pokazale, da pri mutaciji v enem samem alelu, nemutiran *JAK2* z nasprotnim učinkom tekmuje z *JAK2V617F* v celičnih linijah. Hkrati so kar pri eni tretjini bolnikov s PP zasledili izgubo heterozigotnosti v 9p kromosomu (9pLOH). Med mitozo namreč pogosto pride do rekombinacije dednega materiala in tako dobimo *JAK2V617F* homozigota s popolno izraženim fenotipom značilnim za PP. Celice z 9pLOH imajo dve kopiji mutiranega *JAK2* alela, kar še ojača celično signaliziranje in izzove popolno neodvisnost celične proliferacije od EPO (2, 4, 5).

Podoben vpliv odstotka mutiranega alela *JAK2V617F* na fenotip bolezni zasledimo tudi pri bolnikih z ET. Tako naj bi le-ta sovpadal z višjimi vrednostmi hemoglobina, hematokrita, večjim številom levkocitov ter manjšim številom trombocitov (13). Delež mutiranega alela se pri KMPB razlikuje in se stopnjuje od ET, preko PP do KIM (14). Obstaja povezava med večjim deležem *JAK2V617F* alela in agresivnejšo obliko bolezni ter večjim številom tromboz in kardiovaskularnih zapletov pri bolnikih z ET (4, 5, 12, 13).

Pogostost pojavljanja mutacije je najvišja pri bolnikih s PP, kjer je prisotna pri 65 do 97 % bolnikov, pri ET jo zaznamo v 25 do 57 % primerov, pri KIM pa v približno 50 % (5,6). Razponi v odstotkih *JAK2V617F* pozitivnih bolnikov so posledica uporabe različnih kliničnih kriterijev za postavitev diagnoze (Polycythemia Vera Study Group (PVSG) ali Svetovne zdravstvene organizacije) in občutljivosti testa s katerim mutacijo določamo. Pri številnih bolnikih z ET je namreč zaradi nepopolne klonalnosti hematopoeze *JAK2V617F* prisotna le v majhnem deležu granulocitov, kar narekuje uporabo bolj občutljivih tehnik verižne reakcije s polimerazo (PCR) ali detekcijo mutacije v samih trombocitih (6).

Preglednica VI: Pogostost mutacije *JAK2V617F* pri PP, ET in KIM; določitev z različnimi molekularno genetskimi metodami (11).

| | Metoda določanja <i>JAK2V617F</i> | PP (homozigoti) | ET (homozigoti) | KIM (homozigoti) |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| James <i>et al</i> (23) | sekveniranje | 89 (30) | 43 | 43 |
| Levine <i>et al</i> (24) | sekveniranje | 74 (25) | 32 (3) | 35 (9) |
| Kralovics <i>et al</i> (4) | sekveniranje | 65 (27) | 23 (3) | 57 (22) |
| Baxter <i>et al</i> (25) | sekveniranje/alelno specifični PCR | 97 (26) | 57 (0) | 50 (19) |
| Jones <i>et al</i> (26) | ARMS/ pirosekveniranje | 81 (33) | 41 (7) | 43 (29) |
| Levine <i>et al</i> (27) | Alelno specifična Taqman metoda | 99 | 72 | 39 |

JAK2V617F je prisotna tudi pri nekaterih drugih mieloproliferativnih boleznih, kot na primer atipični KML (20%), hipereozinofilnem sindromu (HES), kronični mielomonocitni levkemiji (KMML) in refraktarni anemiji s prstanastimi sideroplasti (RARS) (60 %), ne najdemo pa je pri akutni mieloični levkemiji, razen tisti, ki je sekundarna KMPB (5).

Zaradi dokazanih podobnosti v fenotipu *JAK2V617F* pozitivnih PP in ET, prisotnost mutacije *JAK2* odpira nove možnosti za spremenjeno klasifikacijo mieloproliferativnih bolezni, predstavlja pa tudi pomembno orodje v diagnostiki in spremljanju teh bolezni (2).

Podobne učinke na proliferacijo celic rdeče vrste imajo mutacije v eksonu 12 *JAK2* gena, ki so jih opisali Scott *et al*. Večinoma gre za delecije ali točkovne mutacije, ki sicer ne spremenijo bralnega okvirja, povzročijo pa spremembo aminokislinskega zaporedja z odstranitvijo dveh aminokislinskih ostankov: N542-E543del in E543-D544del sta najpogostejša primera teh delecij (10).

Mutacije v eksonu 12 so specifične za PP in idiopatsko eritrocitozo. Za klinično sliko je značilna izolirana eritrocitoba in nizka koncentracija serumskega eritropoetina. Le pri majhnem deležu bolnikov zasledimo tudi levkocitozo in/ali trombocitozo (9).

Podobno kot pri *JAK2V617F* tudi tu delež mutiranega alela pomembno vpliva na fenotip bolezni. Če je mutiran klon majhen in koncentracija serumskega eritropoetina mejno znižana, se bolezen izrazi kot idiopatska eritrocitoza. Pri velikem deležu mutiranega alela in koncentraciji hemoglobina nad diagnostično vrednostjo SZO pa govorimo o PP.

Delež granulocitov z mutiranim alelom je običajno majhen, zato so za določanje prisotnosti teh mutacij potrebne občutljive tehnike detekcije. Druga možnost je analiza DNA izolirane iz celic endogenih eritroidnih kolonij kostnega mozga (10).

1.3 VLOGA SHP-1 IN SHP-2 V CELIČNI SIGNALIZACIJI

SHP-1 in SHP-2 sta nereceptorski tirozinski fosfatazi, ki ju kodirata gena *PTPN6* in *PTPN11*. Prva je visoko izražena v hematopoetskih celicah, SHP-2 v vseh celicah, obe pa imata pomembno vlogo v patoloških procesih.

Aminokislinska sestava SHP-1 in SHP-2 je enaka v 55 %, podoben je tudi mehanizem regulacije obeh encimov. Vsebujeta dve Src homologni-2 (SH2) domeni (N-SH2, C-SH2), PTP domeno in karboksilno terminalno regijo. V mirujočih celicah je aktivnost PTP domene zaradi avtoinhibicije z N-SH2 domeno, majhna. Ko pa pride do stimulacije celice z rastnim dejavnikom, se fosfatazi z SH2 domeno vežeta na proteine, ki vsebujejo tirozinske ostanke (npr. Gab1 in Gab2) pri čemer pride do aktivacije PTP domene (18).

Razlika med obema fosfatazama se kaže v njuni biološki vlogi. SHP-1 defosforilira receptorje za rastne dejavnike, citokine, antigene in proteine, katerih regulacija je povezana s fosforilacijo tirozinskih ostankov. Miši z inaktivacijsko mutacijo v genu za SHP-1 razvijejo sindrom avtoimunosti in imunske pomanjkljivosti, ki se odraža v povečanem številu nekaterih krvnih celic, zato SHP-1 v splošnem smatramo za negativni regulator celične proliferacije (16). Pri človeku opazimo zmanjšano izražanje SHP-1 pri različnih vrstah levkemij in limfomov. Tako metilacija promotorja *PTPN6* povzroči odsotnost ekspresije tega gena v malignih T-limfomskih celicah (16).

Nasprotno predstavlja SHP-2 pozitiven prenašalec celičnih signalov. Uničenje *PTPN11* gena pri miših povzroči smrt zarodka v sredini gestacijskega obdobja, celice z mutacijo, ki je vzrok katalitični neaktivnosti SHP-2 encima, pa kažejo manjšo aktivnost signalnih poti posredovanih z ravnimi dejavniki in citokini. Povečano ekspresijo *PTPN11* pri človeku so

povezali s pojavom Noonan-ovega sindroma, juvenilne mielomonocitne levkemije, mielodisplastičnega sindroma, akutne limfoblastne levkemije in akutne mieloične levkemije (17, 18).

V splošnem naj bi bili torej vlogi SHP-1 in SHP-2 pri celičnem signaliziranju nasprotni, kar pa ne velja v vseh primerih. Obstajajo tudi dokazi o pozitivni vlogi SHP-1 pri regulaciji celične proliferacije in interakcijah med obema proteinoma (18).

1.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, ki omogoča eksponentno pomnoževanje kratkih odsekov DNA (običajno dolžine 100 do 600 baznih parov (bp)) znotraj daljše dvoverižne DNA. PCR vključuje uporabo para začetnih oligonukleotidov (primerjev) dolžine približno 20 nukleotidov, ki se komplementarno prilegajo specifičnemu zaporedju vsake izmed verig DNA. S podaljševanjem primerjev s pomočjo DNA polimeraze dobimo kopijo želenega zaporedja, ki ga v naslednji reakciji pomnožimo skupaj z matrično DNA. Ker je za ločitev verig dvojne vijačnice DNA nujen dvig temperature, pri PCR uporabljamo termostabilno DNA polimeraze (Taq polimeraza) izolirano iz bakterije *Thermus aquaticus*.

Glede na temperaturo, ki jo hitro in natančno uravnava ciklični pomnoževalnik, potekajo tri stopnje PCR reakcije. V prvi stopnji pride do denaturacije matrične dvoverižne DNA pri temperaturi 95 °C. V drugi stopnji temperatura 45-75 °C omogoča vezavo začetnih oligonukleotidov s komplementarnim delom matrične DNA. Polimerazna reakcija podaljševanja začetnih oligonukleotidov oziroma sinteza nove komplementarne verige DNA v smeri 5' konca proti 3' koncu, pa poteka pri 72 °C. Te tri stopnje predstavljajo en cikel. Po določenem številu ciklov pomnoževanja (pogosto 40) je pridelka PCR dovolj, da ga lahko analiziramo z elektroforezno ločitvijo na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu in barvanjem z etidijevim bromidom.

S tem postopkom lahko pomnožimo le DNA. Kadar pa imamo izolirano RNA, le-to pred samo PCR reakcijo prepíšemo v komplementarno DNA (cDNA), s pomočjo encima reverzna transkriptaza. V tem primeru se reakcija PCR imenuje obratno prepisovanje in

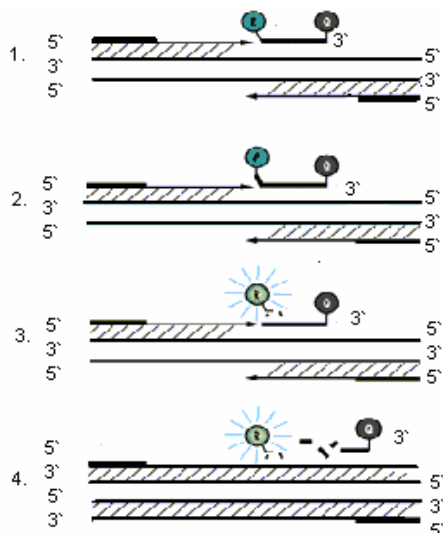
verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR: Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction) (28, 29).

1.4.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Zgoraj opisan postopek omogoča v najboljšem primeru semi-kvantitativno detekcijo DNA produkta, največkrat pa gre le za kvalitativno ugotavljanje prisotnosti specifičnega zaporedja DNA. Kvantitativne rezultate PCR lahko hitro dobimo z zaznavo fluorescentnih signalov v realnem času, kar pomeni, da PCR pridelke detektiramo med ali po vsakem ciklu reakcije. Trenutno so na voljo trije glavni načini zaznave: RQ-PCR analiza z barvilom SYBR Green I, hidrolizirajočimi sondami ali hibridizacijskimi sondami.

Pri analizi s hidrolizirajočimi sondami uporabljamo dvojno označeno oligonukleotidno sondo (TaqMan sonda). Označena je s fluorescenčnim barvilom na 5' koncu in z lovilec fluorescenčnega signala, ki se nahaja na 3' koncu sonde. Ker lovilce signala ujame signal, ki ga pošilja fluorescenčno barvilo na drugi strani sonde, sonda ne fluorescira. Kadar se med PCR reakcijo izgrajuje iskano zaporedje (tarčni gen), takrat se sonda veže na ustrezno mesto v novo nastajajoči verigi. Encim Taq polimeraza s 5' eksonukleazno aktivnostjo sondo razgradi, fragment sonde, ki vsebuje fluorescenčno barvilo, se oddalji od fragmenta na katerem je lovilce in zato lahko zaznamo fluorescenco (Slika 1).

Fluorescenčni signal detektiramo samo takrat, ko je iskano zaporedje komplementarno sondi, zato je povečanje signala fluorescence po vzbujanju s svetlobo določene valovne dolžine direktno proporcionalno pomnožitvi tarčnega gena med PCR reakcijo. Po določenem ciklu fluorescenčni signal preseže prag (angl. threshold). To je tako imenovana točka prehoda oziroma Ct vrednost, ki je sorazmerna številu kopij DNA segmenta v začetku reakcije. Prej se bo signal ločil od bazne linije oziroma praga, več kopij DNA segmenta je v vzorcu, nižja bo Ct vrednost. Druga fluorescenčna komponenta prisotna v postopku je ROX barvilo, ki je dodano v reakcijsko mešanico v konstantni koncentraciji. Služi nam za normalizacijo fluorescenčnega signala, ko določimo bazno linijo. Bazno linijo običajno postavimo med 3 in 15 cikel PCR reakcije (21, 22).



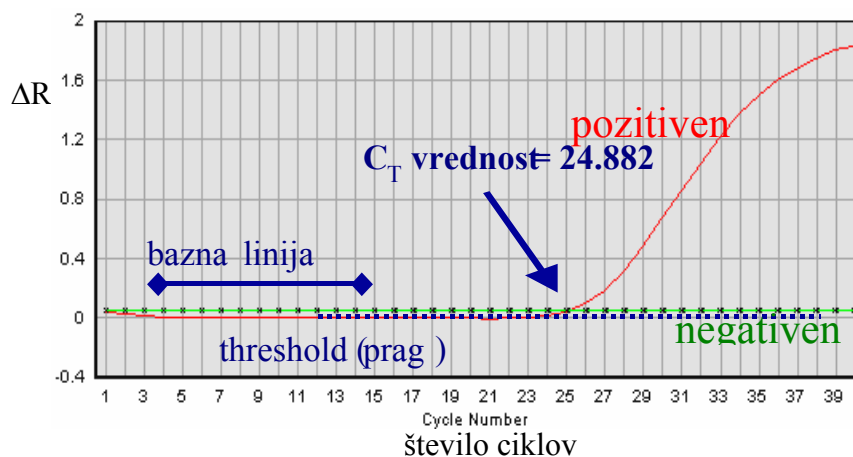
Slika 1: Prikaz principa kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času

R: fluorescenčni signal

Q: lovilec signala

1. Prileganje začetnih oligonukleotidov
2. Izgradnja verige
3. Cepitev sonde: fluorescenčni signal se oddaljuje od lovilca signala
4. Sinteza PCR pridelka se zaključi: porast jakosti fluorescenčnega signala v vsakem ciklu

Število kopij iskanega nukleotidnega zaporedja v vzorcu najlažje izračunamo s pomočjo standardne krivulje s prikazom C_T vrednosti proti logaritmu števila kopij v standardu. Pripravimo jo s serijskimi razredčitvami posebej za to pripravljene plasmida. Zaradi razlik v kakovosti DNA sočasno pomnožujemo in določamo kontrolni oziroma hišni gen. Rezultat podamo kot razmerje med številom kopij iskanega in številom kopij kontrolnega nukleotidnega zaporedja v vzorcu. Za kontrolni gen izberemo tisti gen, ki se konstantno izraža tako v spremenjenih kot tudi v normalnih celicah (30).



Slika 2: Prikaz intenzitete normaliziranega fluorescentnega signala verižne reakcije s polimerazo v realnem času; ΔR . normalizirana intenziteta fluorescentnega signala

1.4.2 Kvantifikacija genske ekspresije

RQ-PCR nam poleg ugotavljanja prisotnosti specifičnih genov omogoča tudi analizo genske ekspresije. Kadar sumimo, da gre pri patološkem procesu za zmanjšano ali prekomerno izražanje določenih genov, lahko s pomočjo kvantifikacije celične mRNA, ki nosi zapis za tarčni gen, ocenimo celično aktivnost genske transkripcije. Kvantifikacijo produktov RT-PCR lahko izvedemo na tri različne načine.

Metode standardne krivulje

- **Absolutna standardna krivulja** zahteva uporabo standardov z znano absolutno količino DNA ali RNA, ki je bila predhodno določena z neko neodvisno metodo. Za pripravo tovrstnih standardov običajno uporabljamo raztopine plazmidne DNA ali *in vitro* pripravljene RNA, katerim spektrofotometrično izmerimo koncentracijo pri A_{260} in z upoštevanjem molekulske mase DNA ali RNA izračunamo absolutno število kopij v standardu.
- **Metoda relativne standardne krivulje** pri kateri je količina DNA ali RNA v vzorcu izražena relativno glede na nek osnovni vzorec ali kalibrator. Količino tarčnega gena v vseh eksperimentalnih vzorcih določimo iz umeritvene krivulje, nato pa jo delimo s količino tarčnega gena v kalibratorju. Kalibrator torej predstavlja vrednost 1, vse druge količine pa so izražene kot n-kratnik vrednosti kalibratorja.

Prednost relativne kvantifikacije je v uporabi katerekoli RNA ali DNA, ki vsebuje tarčni gen. Ker količini genskega materiala v vzorcu in v kalibratorju delimo, enota odpade, zato je za pripravo relativne standardne krivulje pomembno le poznavanje redčitve standardov. Z uporabo iste osnovne raztopine RNA ali DNA, na podlagi katere narišemo umeritveno krivuljo za različne mikrotitrne ploščice, lahko rezultate vzorcev med ploščicami primerjamo.

Primerjalna $\Delta\Delta C_t$ metoda omogoča ob uporabi aritmetične formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$ pridobivanje enakih rezultatov relativne kvantifikacije, kot jih dobimo z metodo standardne krivulje, zahteva pa predhodno izvedbo validacijskega poskusa.

Z validacijskim poskusom je potrebno dokazati, da sta učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena približno enaki. To ugotavljamo s spremljanjem

spreminjanja ΔC_t (razlika C_t za tarčni in referenčni gen) v odvisnosti od redčenja matrične DNA. Učinkovitosti sta približno enaki, če je absolutna vrednost naklona premice na grafu $\Delta C_t = f(\log \text{ začetne količine DNA})$ manjša od 0,1. Ta dokaz nam omogoča izračun količine tarčnega gena, normalizirane na endogeno kontrolo in relativno glede na kalibrator po enačbi:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

, kjer je X_N z referenčnim genom normalizirana količina tarčnega gena (X_0/R_0), K konstanta razmerja C_t za tarčni in referenčni gen (X_T/R_T), E učinkovitost pomnoževanja obeh genov, $\Delta C_{T,q}$ ali $\Delta C_{T,cb}$ razlika v C_t za tarčni in referenčni gen pri vzorcu (q) oziroma kalibratorju (cb).

Če je učinkovitost pomnoževanja izračunana po formuli $E = 10^{-(1/\text{naklon})} - 1$ za vse tri gene blizu 1, kar velja v primeru, ko je naklon premice na grafu $C_t = f(\log \text{ začetne koncentracije DNA})$ med -3,1 in -3,4, lahko zgornji izraz poenostavimo in dobimo:

$$2^{-\Delta \Delta C_T}, \text{ kjer je } \Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}.$$

Izpeljava te funkcije iz izraza, ki opisuje eksponentno pomnoževanje PCR produkta, je v celoti navedena v prilogi User Bulletin #2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 12/1997 (updated 10/2001).

2 NAMEN DELA

Odkritje pridobljene mutacije *JAK2V617F* in pridobljenih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* predstavlja pomemben napredek v diagnostiki prave policitemije, esencialne trombocitemije in kronične idiopatične mielofibroze, treh *BCR-ABL* negativnih kroničnih mieloproliferativnih boleznih, katerih molekularno ozadje še do pred kratkim ni bilo pojasnjeno.

Menimo, da bo kvantitativno spremljanje prisotnosti *JAK2V617F* mutacije kmalu postalo aktualno tudi v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo UKC LJ, saj nam po podatkih iz literature (14, 20) delež mutiranega alela lahko služi kot označevalec bolezni pri oceni uspešnosti zdravljenja, ugotavljanju minimalne preostale bolezni in zgodnje ponovitve bolezni (molekularni relaps).

Namen našega dela je bil:

- primerjati občutljivosti alelno specifičnega PCR in dveh različnih pristopov RQ-PCR (uporaba reagenčnih kompletov *JAK2 MutaScreen™ Kit* in *JAK2 MutaQuant™ Kit*) za ugotavljanje mutacije *JAK2V617F*
- oceniti ponovljivost rezultatov določitve deleža mutiranega alela *JAK2V617F* z RQ-PCR in umeritveno krivuljo (reagenčni komplet *JAK2 MutaQuant™ Kit*)
- določiti deleže bolnikov s pravo policitemijo, esencialno trombocitemijo in kronično idiopatično mielofibrozo in prisotno *JAK2V617F* mutacijo
- ugotoviti delež mutiranega *JAK2V617F* alela pri pravi policitemiji, esencialni trombocitemiji in kronični idiopatični mielofibrozi in njegov vpliv na krvno sliko
- uvedba alelno specifičnega PCR za določanje mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* pri bolnikih s pravo policitemijo in odsotno *JAK2V617F* mutacijo

V drugem delu smo na manjši skupini preiskovancev preučevali ekspresijo SHP-1 in SHP-2, fosfataz, ki igrata pomembno vlogo pri proliferaciji in diferenciaciji hematopoetskih celic. Naš namen je bil ugotoviti morebitne spremembe v izražanju *PTPN6* in *PTPN11* genov, ki nosita zapis za omenjeni fosfatazi, in povezavo teh sprememb s krvno sliko.

3 PREISKOVANCI IN NAČINI DELA

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 110 bolnikov, od tega 43 (39 %) moških in 67 (61 %) žensk. Mediana starost je znašala 59 let (razpon 20-89 let). 87 bolnikov je imelo ET, 18 bolnikov PP in 5 bolnikov KIM. Diagnoza ET, PP ali KIM je bila postavljena po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije.

Zdravilo se je 22 bolnikov z ET, 12 bolnikov s PP in 2 bolnika s KIM. Za nadaljnjo obdelavo smo poiskali bolnike s prisotno mutacijo *JAK2V617F*, ki se niso zdravili in pri katerih zaradi PP nismo opravljali venepunkcij. Takšnih bolnikov je bilo 34 z ET, 5 s PP in 3 s KIM.

V Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo imeli za vse preiskovane bolnike shranjene vzorce DNA granulocitov odvzete v obdobju od februarja do decembra 2007. Pri vseh bolnikih smo imeli na razpolago podatke o krvni sliki, kliničnem statusu in zdravljenju ob odvzemu krvi za preiskavo dokazovanja mutacije *JAK2V617F*.

V drugem delu naloge smo za ugotavljanje spremenjenega izražanja fosfataz v raziskavo vključili 32 bolnikov, od tega 13 (41 %) moških in 19 (59 %) žensk. Mediana starosti je znašala 61 let (razpon 27-85 let). 27 bolnikov je imelo ET, 5 bolnikov pa PP.

3.2 METODE

- ◆ Odvzem venske krvi v 10 mL epruveto z antikoagulantom EDTA

Osamitev nukleinskih kislin iz vzorcev venske krvi

- ◆ Osamitev granulocitov iz venske krvi z gostotno gradientnim centrifugiranjem preko fikola (Ficoll Paque Plus) in razgradnjo eritrocitov s Tris amonijevim kloridom
- ◆ Osamitev genomske DNA iz granulocitov z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

- ◆ Osamitev RNA iz levkocitov z reagenčnim kompletom High Pure RNA Isolation Kit (Roche)

Metode za določanje prisotnosti JAK2 mutacij

- ◆ Določanje mutacije *JAK2V617F* z alelno specifičnim PCR
- ◆ Določanje deleža mutacije *JAK2V617F* z RQ-PCR in pristopom alelne diskriminacije s hidrolizo fluorescenčno označenih sond
- ◆ Določanje deleža mutacije *JAK2V617F* z RQ-PCR s pomočjo umeritvene krivulje
- ◆ Določanje prisotnosti mutacij *JAK2* v eksonu 12 z alelno specifičnim PCR
- ◆ Elektroforezna detekcija nukleinskih kislin

Analiza izražanja genov *PTPN6* in *PTPN11*

- ◆ sinteza cDNA
- ◆ kvantitativno določanje genov *PTPN6* in *PTPN11* s RQ-PCR

3.3 NAČIN DELA

3.3.1 Osamitev nukleinskih kislin iz vzorcev venske krvi

3.3.1.1 Osamitev granulocitov z razgradnjo eritrocitov s Tris-amonijevim kloridom

Odvzeli smo 10 mL venske krvi v epruveto Vacuntainer z antikoagulantom EDTA. V 15 mL plastične Falcon epruvete smo odpipetirali 2 mL fikola. Vensko kri smo redčili z 1 x fosfatnim pufrom s soljo (PBS) v razmerju 1:1 in nato ob steni epruвет previdno pipetirali vzorce na fikol, da je ostala meja med fikolom in krvjo popolnoma ostra. Nato smo vzorce centrifugirali 22 minut pri 2200 obratih/minuto (centrifuga Labofuge 400, Heraeus) pri sobni temperaturi. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali plazmo, ki predstavlja zgornji sloj, sloj mononuklearnih celic tik nad fikolom in fikol, ter vse skupaj zavrgli.

Ostanek celic (granulociti, erirociti) v epruветah smo prenesli v 50 mL plastično Falcon epruveto, dopolnili do 50 mL z raztopino za razgradnjo eritrocitov s Tris amonijevim

kloridom, vse skupaj premešali in pustili inkubirati 10 minut pri sobni temperaturi. Vmes smo vsebino epruvete nekajkrat premešali z obračanjem.

Po 10 minutah smo epruvete centrifugirali 5 minut pri 1600 obratih/min, da so se levkociti usedli na dno. Potem smo previdno odstranili supernatant, levkocite prenesli v 15 mL plastično Falcon epruveto ter jih dvakrat sprali z raztopino 1x PBS.

Suspenziji granulocitov smo določili koncentracijo, kar smo storili s pomočjo hematološkega analizatorja (Beckman Coulter® LH 750). Tako smo lahko preračunali potrebno število granulocitov za izolacijo genomske DNA. Optimalno število celic za osamitev DNA je 5×10^6 celic v 200 μ L fosfatnega pufra s soljo. Tako pripravljene granulocite smo do izolacije shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C .

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ fikol (Ficoll-Paque Plus, Amersham)
- ❖ delovna raztopina 1 x fosfatnega pufra s soljo (PBS) (NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ; pH = 7,4)
- ❖ 10 mL epruveta z EDTA antikoagulantom
- ❖ plastične sterilne epruvete 15 mL (Falcon)
- ❖ 200 μ L in 1000 μ L pipete
- ❖ 200 μ L in 1000 μ L nastavki (RNAz in DNAz prosti s filtrom)
- ❖ centrifuga Labofuge 400 (Heraeus)
- ❖ Tris amonijev klorid (NH_4Cl , KHCO_3 , EDTA, redestilirana voda)

3.3.1.2 Osamitev DNA iz granulocitov venske krvi

Izolacija DNA iz suspenzije granulocitov izoliranih iz venske krvi je potekala z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Postopek izolacije temelji na razgradnji celic z inkubacijo vzorcev v posebnem pufri za liziranje, sočasno pa v vzorcu, deluje tudi proteinaza K, ki hidrolizira prisotne proteine. DNA se veže na površino steklenih vlaken kolone. Po spiranju nečistoč s pufri za spiranje nečistoč, eluiramo DNA z elucijskim pufrom.

Izolacijo DNA iz granulocitov smo začeli s pipetiranjem 20 μ L QIAGEN proteinaze K ob strani sterilne 1,5 mL epruvice. Temu smo nato dodali 200 μ L vzorca ter 200 μ L lizirnega pufru AL in močno stresali na Vortex stresalniku 15 sekund. Učinkovitost razgradnje celic smo zagotovili z mešanjem vzorca in lizirnega pufru AL toliko časa, da je postala raztopina homogena. Vzorec smo nato inkubirali na 56 °C 10 minut. Po hitrem centrifugiranju s katerim smo odstranili kapljice s sten epruvice, smo vzorcu dodali 200 μ L absolutnega etanola (96-100 %) in močno stresali na Vortex stresalniku 15 sekund. Mešanico vzorca smo ponovno centrifugirali (Biofuge pico, Heraeus) in potem previdno prenesli v *QIAamp Spin* kolono z 2 mL zbiralno epruvetko tako, da nismo omočili roba kolone. Da bi se izognili nastanku aerosola, smo kolono zaprli in centrifugirali 1 minuto pri 9000 obratih/minuto. Potem smo zavrgli zbiralno epruvetko s filtratom, *QIAamp Spin* kolono pa prenesli v čisto zbiralno epruvetko. Na kolono smo nato pipetirali 500 μ L pufru za spiranje AW1, kolono spet zaprli in centrifugirali 1 minuto pri 9000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo kolono prenesli v čisto 2 mL zbiralno epruvetko in dodali 500 μ L pufru za spiranje AW2. Po 3 minutah centrifugiranja pri 13000 obratih/minuto smo kolono *QIAamp Spin* prenesli v sterilno 1,5 mL epruvetko ter na kolono pipetirali 200 μ L elucijskega pufru AE ali destilirane vode. Inkubacija je potekala 5 minut na sobni temperaturi. Po 1 minutnem centrifugiranju pri 9000 obratih/minuto smo v sterilni epruvetki dobili izolirano DNA, ki smo jo do uporabe shranili pri -20 °C.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
 - pufer za razgradnjo celic (Lysis Buffer-AL)
 - pufer za spiranje (Wash Buffer- AW1 in AW2)
 - elucijski pufer (Elution Buffer- AE)
 - QIAGEN Proteinase K
 - kolone *QIAamp Spin* Columns z 2 mL zbiralnimi epruvetkami
- ❖ etanol (96-100 %)
- ❖ 1,5 mL sterilne epruvice (Eppendorf, BioPure)
- ❖ 200 μ L in 1000 μ L pipete
- ❖ 200 μ L in 1000 μ L nastavki (RNAz in DNAz prosti s filtrom)
- ❖ centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

3.3.1.3 Osamitev RNA iz levkocitov venske krvi

Osamitev RNA iz 200 μL (od 1×10^6 do 5×10^6) levkocitov smo izvedli s kompletom High Pure RNA Isolation Kit (Roche), ki je namenjen osamitvi celotne RNA iz celic različnih bioloških vzorcev. Zaradi velike občutljivosti RNA na morebitno prisotnost encimov, pri delu uporabljamo sterilne epruvete, ki ne vsebujejo RNAz in DNAz.

Osamitev smo začeli s pripravo raztopine encima DNAze I. V 1,5 mL epruvetko (Eppendorf, BioPure) smo odpipetirali 90 μL pufru za inkubacijo DNAz I in mu dodali 10 μL DNAze I. Epruvetko smo zaprli, premešali in kratko centrifugirali 10 sekund pri 9000 obratih/minuto (Biofuge pico, Heraeus).

V drugi 1,5 mL epruvetki smo levkocite resuspendirali v 200 μL PBS, nato pa dobljeni suspenziji dodali 400 μL pufru za liziranje in vezavo, vse skupaj dobro premešali ter vzorec večkrat pipetirali do homogene viskoznosti.

Tako pripravljen vzorec smo pipetirali v rezervoar kolone z zbiralno epruvetko, katero smo nato centrifugirali pri 9000 obratih/minuto 15 sekund. V naslednji stopnji smo na steklena vlakna v rezervoarju kolone pipetirali 100 μL pripravljene DNAzne mešanice I in vse skupaj inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi (15 do 25°C). Potem smo v kolono dodali pufer za spiranje I in centrifugirali 15 sekund pri 9000 obratih/minuto. Filtrat smo zavrgli, namestili novo zbiralno epruvetko in na kolono pipetirali 500 μL pufru za spiranje II. Ponovno smo centrifugirali 15 sekund pri 9000 obratih/minuto, filtrat zavrgli in na kolono z novo zbiralno epruvetko pipetirali 200 μL pufru za spiranje II. To smo nato centrifugirali 2 minuti pri 11700 obratih/minuto, zavrgli filtrat z zbiralno epruvetko, kolono pa vstavili v 1,5 mL epruvetko. Na kolono smo potem odpipetirali 50 μL elucijskega pufru in centrifugirali 1 minuto pri 9000 obratih/minuto. Eluirano RNA smo ponovno pipetirali na kolono in še enkrat centrifugirali 1 minuto pri 9000 obratih/minuto. V 1,5 mL epruvetki smo tako dobili eluirano RNA, ki smo jo do nadaljnje analize shranili pri -70°C.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
 - pufer za razgradnjo celic in vezavo RNA (4,5 mM gvanidinijev hidroklorid, 50 mM Tris-HCl in 30 % Triton X-100, pH 6,6 (25 °C))

- liofilizat DNAze I
- pufer za inkubacijo DNAze (1M NaCl, 20 mM Tris-HCl in 10 mM MnCl₂, pH 7,0 (25 °C))
- pufer za spiranje I (5 M gvanidinijev hidroklorid in 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C))
- pufer za spiranje II (20 mM NaCl in 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C))
- elucijski pufer
- filtrirne epruvetke z volumnom 700 µL
- zbiralne epruvetke z volumnom 2 mL
- ❖ fosfatni pufer s soljo (PBS)
- ❖ sterilne 1,5 mL epruvetke (Eppendorf, BioPure)
- ❖ centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

3.3.1.4 Merjenje koncentracije in čistoče vzorcev nukleinskih kislin

Koncentracijo in čistočo nukleinskih kislin smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbanca pri valovnih dolžinah 260 nm (A_{260}) in 280 nm (A_{280}).

Koncentracijo DNA in RNA v vzorcu smo določili pri valovni dolžini 260 nm. Za zagotavljanje pravih meritev s spektrofotometrično metodo mora biti merjena absorbanca A_{260} večja od 0,15. Če je absorbanca $A_{260} = 1$, pomeni, da imamo v vzorcu 50 µg/mL DNA oziroma 40 µg/mL RNA (podatki iz Roche Molecular Biochemicals, Lab FAQs, Cat. No. 2 115 972). Ta povezava velja samo za meritve pri nevtralnem pH. Če je potrebno vzorec predhodno redčiti, moramo to obvezno storiti s pufrom z nevtralnim pH.

Čistočo vzorcev smo preverili z določanjem razmerja absorbanca DNA in RNA pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Za vzorec v katerem se nahaja čista nukleinska kislina je značilno, da je $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$ za DNA oziroma 1.9-2.1 za RNA. $A_{260}/A_{280} < 1,7$ kaže na onečiščenje vzorca s proteini in aromatskimi spojinami (fenol), $A_{260}/A_{280} > 2,0$ za vzorce DNA pa na sočasno prisotnost RNA (podatki iz Roche Molecular Biochemicals, Lab FAQs, Cat. No. 2 115 972).

Postopek:

V čisto 2 mL epruvetko (Eppendorf, BioPure) smo odpipetirali 45 μ L redestilirane vode (RNAz in DNAz prosta), dodali 5 μ L vzorčne RNA ter dobro premešali.

Nato smo priključili spektrofotometer in zagnali program *Lambda 20 Bio*. Z ukazom *Wp* smo določili aplikacijo (pri določanju čistosti in koncentracije RNA izberemo *aplikacija 17*, za DNA pa *aplikacija 15*). Sledil je ukaz *Sample*, nato pa smo v kiveto dali RNAz in DNAz prosto vodo in pritisnili ukaz *Autozero* (odstranitev ozadja). Merjenje koncentracije RNA ali DNA v vzorcih pri valovnih dolžinah 260 nm (A_{260}) in 280 nm (A_{280}) smo začeli z ukazom *Start*. Računalnik je na podlagi izmerjenih absorbanč in ob upoštevanju faktorja redčitve podal koncentracijo RNA ali DNA v vzorcu.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ raztopine za spiranje spektrofotometra:
 - 70 % etanol
 - 0,1 M in 1 M NaOH
 - redestilirana voda
 - DNAz in RNAz prosta deionizirana voda
- ❖ 2 mL epruvetke (Eppendorf, BioPure)
- ❖ spektrofotometer Parkin Elmer (program Lambda 20 Bio)

3.3.2 Metode za določanje prisotnosti mutacij v genu *JAK2*

3.3.2.1 Določanje mutacije *JAK2V617F* z alelna specifičnim PCR

Mutacijo *JAK2V617F* smo dokazali s predhodno objavljeno metodo alelna specifičnega PCR (Bexter, Lancet 2005). Vzorce DNA izolirane iz celic granulocitov smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo. Reakcija je vsebovala 36 ciklov. V reakciji smo uporabili dva smerna oligonukleotidna začetnika JAK – F in JAK – F-IC, ter en protismerni oligonukleotidni začetnik JAK – R. Prvi smerni oligonukleotidni začetnik JAK – F, se pripne na tarčno sekvenco mutiranega alela in povzroči pomnožitev specifičnega

mutiranega alela. Vsebuje napako na tretjem nukleotidu od 3' konca, kar omogoča večjo specifičnost pomnoževanja in produkt velik 203 bp. Drugi smerni oligonukleotidni začetnik JAK – F-IC pa se pripne na tarčno sekvenco obeh alelov in povzroči pomnožitev produkta velikega 364 bp pri obeh, mutiranem in nemutiranem alelu. Služi kot interna kontola PCR. Reakcija pomnožitve steče le v primeru, ko se oligonukleotidna začetnika s 3'-konci popolnoma prilegata tarčni sekvenci.

Postopek:

1. Najprej samo pripravili reakcijsko mešanico za vse vzorce in za slepo kontrolo in jo nato oddelili po 20 μL v posamezne sterilne in označene 200 μL epice.

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi

| Reagenti | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 μL) |
|--|-----------------------|--|
| 10 X PCR Gold pufer (Gibco) | 2,5 μL | 1 X |
| dNTP (2 mM) | 1,5 μL | 0,12 pmol/ μL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,5 μL | 0,50 pmol/ μL |
| JAK2 – R (100 pmol/ μL) | 0,25 μL | 1,00 pmol/ μL |
| JAK2 – F-IC (100 pmol/ μL) | 0,125 μL | 0,50 pmol/ μL |
| JAK2 – F (100 pmol/ μL) | 0,125 μL | 0,50 pmol/ μL |
| AmpliTaq Gold polimeraza (5 U/ μL) | 0,125 μL | 0,025 U/ μL |
| demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta) | 14,9 μL | |
| celotna reakcijska zmes | 20,0025 μL | |

2. Reakcijski mešanici smo dodali 5 μL vzorčne DNA izolirane iz celic granulocitov venske krvi, tako da smo dobili končni volumen 25 μL . S pipeto smo raztopino premešali in vzorčke postavili v ciklični pomnoževalnik Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer).

Preglednica VIII: Pogoji za alelni specifično PCR reakcijo

| Temperatura | Čas | Postopek | |
|-------------|-----------|--------------------------------|---------------|
| 95 °C | 12 minut | aktivacija Taq gold polimeraze | |
| 94 °C | 30 sekund | 36 ciklov | denaturacija |
| 58 °C | 1 minuta | | prileganje |
| 72 °C | 1 minuta | | podaljševanje |
| 72 °C | 10 minut | končno podaljševanje | |
| 4 °C | neskončno | konec reakcije | |

3. Po končani reakciji smo vzorce kratko centrifugirali in do nadaljnjega shranili pri 2 do 8 °C ali pri -20 °C.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ 10 X PCR Gold pufer (150mM Tris HCl, 100 mM KCl) (Applied Biosystems)
- ❖ 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystems)
- ❖ dNTP Blend, 10 mM (2,5 μM vsakega od nukleotidov: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems)
- ❖ smerni oligonukleotidni začetnik 10 nM JAK2 – F (Applied Biosystems):
- ❖ 5-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3 (30 NT)
- ❖ smerni oligonukleotidni začetnik 10 nM JAK2 – F-IC (Applied Biosystems):
- ❖ 5-ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-3 (30 NT)
- ❖ protismerni oligonukleotidni začetnik 10 nM JAK – R (Applied Biosystems):
- ❖ 5-CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA-3 (30 NT)
- ❖ AmpliTaq Gold DNA polimeraza, 5 U/μL (Applied Biosystems)
- ❖ demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ 200 μL sterilne epice (Eppendorf, BioPure)
- ❖ centrifuga Biofuge pico, Heraeus
- ❖ ciklični pomnoževalnik Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer)

3.3.2.2 Določanje mutacije *JAK2V617F* z RQ-PCR in pristopom alelne diskriminacije s hidrolizo fluorescenčno označenih sond

JAK2 MutaScreen™ Kit (Ipsogene, CancerProfiler, 2007) je raziskovalno orodje namenjeno natančni detekciji *JAK2V617F* mutacije in določanju deleža mutiranega alela v genomski DNA. Princip določanja mutacije je alelna diskriminacija, metoda osnovana na verižni reakciji s polimerazo v realnem času s hidrolizo fluorescenčno označenih oligonukleotidnih sond.

Reakcijo smo izvedli po navodilu priloženem kompletu JAK2 MutaScreen™ Kit & Reference Scale (Ipsogene, CancerProfiler, julij 2007). Vzorce DNA izolirane iz celic granulocitov smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo. V reakciji smo uporabili smerni in protismerni oligonukleotidni začetnik ter par sond označenih s 5' reporterskim barvilom. Pri alelni diskriminaciji reakcijska mešanica vsebuje za vsak alel specifično fluorescenčno označeno sondo (v našem primeru je bil mutiran alel označen z reporterskim barvilom FAM™, nemutiran pa z VIC®), kar omogoča spremljanje pomnoževanja posameznega alela. Med PCR reakcijo je prišlo na delu DNA med smernim in protismernim oligonukleotidom v prisotnosti tarčnega alela do specifične vezave označenih sond, 5'-3'eksonukleazna aktivnost Taq polimeraze, pa je pri pomnoževanju DNA cepila sondo in tako omogočila porast fluorescence (22).

Postopek:

1. Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico za vse vzorce in za slepo kontrolo in jo nato oddelili po 20 µL v posamezne vdolbinice na mikrotitrski ploščici.

Preglednica IX: *Sestava reakcijske zmesi*

| Reagenti | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 µL) |
|--|---------------------|--|
| 2 X univerzalna reakcijska mešanica (TaqMan® Universal PCR Master Mix) | 12,5 µL | 1 X |
| 10 X IPSOGEN Primers and Probes mix | 2,5 µL | 1 X |
| demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta) | 5,0 µL | |
| celotna reakcijska zmes | 20,0 µL | |

2. Vsak eksperiment je vseboval v dvojniku pozitivno in negativno kontrolo, slepo kontrolo (demineralizirana voda), 6 referenčnih vzorcev in do 19 preiskovanih vzorcev.
3. Reakcijski mešanici smo dodali 5 μL vzorčne DNA izolirane iz celic granulocitov venske krvi, tako da smo dobili končni volumen 25 μL . S pipeto smo raztopino v vsaki vdolbinici malo premešali, mikrotitrsko ploščico pokrili s prozorno samolepilno folijo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems), centrifugirali (Labofuge 400, Heraeus) pri 1600 obratih/minuto 1 min in ploščico vstavili v ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems).

Preglednica X: RQ-PCR program

| Temperatura | Čas | Postopek | |
|-------------|-----------|----------------|---------------------------|
| 50 °C | 2 minuti | 1 cikel | aktivacija Taq polimeraze |
| 95 °C | 10 minut | 1 cikel | začetna denaturacija |
| 92 °C | 15 sekund | 50 ciklov | prileganje |
| 60 °C | 1 minuta | | podaljševanje |
| 4 °C | neskončno | konec reakcije | |

4. Po 50 ciklih PCR smo na cikličnem pomnoževalniku ABI PRISM® 7000 SDS za 1 minuto pognali program alelna diskriminacija (ang.: Allelic Discrimination, Post-Read). Aparat je pri 60°C izvedel 1 cikel in zaznal jakost fluorescence posameznega barvila.

Preglednica XI: Alelna diskriminacija- Post read program

| Temperatura | Čas | Postopek |
|-------------|----------|----------|
| 60 °C | 1 minuta | 1 cikel |

5. Iz dobljenih vrednosti jakosti fluorescence za barvili FAM™ in VIC® smo izračunali njuno razmerje, nato pa na podlagi rezultatov tega razmerja za referenčne vzorce določili odstotek alela *JAK2V617F* v preiskovanih vzorcih.

Preglednica XII: Vsebnost JAK2V617F v referenčnih vzorcih

| Povprečna vrednost razmerja FAM™/VIC® | % V617F |
|---------------------------------------|--------------------------|
| S < M1 | divji tip ali nezaznavno |
| M1 < S < M2 | 2-5 % |
| M2 < S < M3 | 5-12,5 % |
| M3 < S < M4 | 12,5-31 % |
| M4 < S < M5 | 31-50 % |
| M5 < S < M6 | 50-78 % |
| M6 < S | 78-100 % |

M1, M2, M3, M4, M5, M6: referenčni vzorci, S: preiskovani vzorec

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ univerzalna mešanica TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ❖ PPM- JAK2V617F 10X (mešanica specifičnih smernih in protismernih oligonukleotidov za gen JAK2 ter specifičnih sond za mutacijo (JAK2V617F) FAM™ in divji tip (WT) VIC®) (IPSOGEN)
- ❖ kontrole in vzorci za referenčno skalo (IPSOGEN)

Preglednica XIII: Kontrole in vzorci za referenčno skalo

| | | |
|--------------------------|-------|--------------------------------|
| V617F pozitivna kontrola | MP-VF | 100 % VF alela |
| V617F negativna kontrola | MN-VF | 0 % VF alela |
| referenčni vzorec M1 | M1-VF | 2 % VF alela, limita detekcije |
| referenčni vzorec M2 | M2-VF | 5 % VF alela |
| referenčni vzorec M3 | M3-VF | 12,5 % VF alela |
| referenčni vzorec M4 | M4-VF | 31% VF alela |
| referenčni vzorec M5 | M5-VF | 50% VF alela |
| referenčni vzorec M6 | M6-VF | 78% VF alela |

- ❖ demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems)
- ❖ centrifuga Labofuge 400 (Heraeus)
- ❖ ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems)

3.3.2.3 Določanje *JAK2V617F* mutacije z RQ-PCR ob uporabi umeritvene krivulje

JAK2 MutaQuant™ Kit (Ipsogen, CancerProfiler, 2007) je raziskovalno orodje namenjeno natančni kvantifikaciji *JAK2* mutiranega (V617F) in nemutiranega alela in določanju deleža *JAK2V617F* alela v vzorcu DNA. Princip določanja mutacije je alelno specifična reakcija s polimerazo v realnem času.

Reakcijo smo izvedli po navodilu priloženem kompletu JAK2 MutaQuant™ Kit (Ipsogene, CancerProfiler, november 2007). Za vsak vzorec DNA s koncentracijo 5 ng/μL smo izvedli dve ločeni reakciji z različnima reakcijskima mešanicama. Obe reakcijski mešanici sta vsebovali enak protismerni oligonukleotidni začetnik ter fluorescenčno označeno FAM-TAMRA sondo, razlikovali pa sta se v specifičnih smernih oligonukleotidnih začetnikih, značilnih za mutiran (*JAK2V617F*) oziroma nemutiran (WT) alel. Vzorce DNA izolirane iz celic granulocitov smo pomnožili v 50 ciklih verižne reakcije s polimerazo, pri čemer je samo popolno ujemanje smernega oligonukleotida s tarčno DNA omogočilo nastanek in pomnoževanje PCR produkta. Pri podaljševanju začetnih oligonukleotidov je prišlo zaradi 5'-3' eksonukleazne aktivnosti Taq polimeraze do cepitve fluorescenčno označene sonde in do porasta fluorescence, ki smo jo detektirali med PCR (21).

Postopek:

1. Najprej samo pripravili reakcijsko mešanico za vse vzorce in za slepo kontrolo in jo nato oddelili po 20 μL v posamezne vdolbinice na mikrotitrski ploščici.

Preglednica XIV: *Sestava reakcijske zmesi za določanje V617F alela*

| Reagenti za V617F Pre-mix | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 μL) |
|--|---------------------|--|
| 2 X univerzalna reakcijska mešanica (TaqMan® Universal PCR Master Mix) | 12,5 μL | 1 X |
| 25 X IPSOGEN PPM-VF Primers & Probe mix | 1,0 μL | 1 X |
| demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta) | 6,5 μL | |
| celotna reakcijska zmes | 20,0 μL | |

Preglednica XV: Sestava reakcijske zmesi za določanje WT alela

| Reagenti za WT Pre-mix | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 µL) |
|--|---------------------|--|
| 2 X univerzalna reakcijska mešanica (TaqMan® Universal PCR Master Mix) | 12,5 µL | 1 X |
| 25 X IPSOGEN PPM-WT Primers and Probe mix | 1,0 µL | 1 X |
| demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta) | 6,5 µL | |
| celotna reakcijska zmes | 20,0 µL | |

2. Vsak eksperiment je vseboval v dvojniku pozitivno in negativno kontrolo, slepo kontrolo (demineralizirana voda), 4 referenčne standarde in do 8 preiskovanih vzorcev.
3. Vzorcem DNA izolirane iz celic granulocitov venske krvi smo s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri 260 nm, pri čemer je bilo razmerje A_{260}/A_{280} med 1,7 in 1,9. Tako smo določili koncentracijo izhodne DNA, ki smo jo nato do koncentracije 5 ng/µL redčili z vodo, ki ni vsebovala DNAz in RNAz.
4. Reakcijski mešanici smo dodali 5 µL vzorčne DNA, tako da je reakcija potekala v 25 µL reakcijske raztopine. S pipeto smo raztopino v vsaki vdolbinici malo premešali, mikrotitrsko ploščico pokrili s prozorno samolepilno folijo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems), centrifugirali (Labofuge 400, Heraeus) pri 1600 obratih/minuto 1 min in ploščico vstavili v ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS.

Preglednica XVI: RQ-PCR program

| Temperatura | Čas | Postopek | |
|-------------|------------|----------------|---------------------------|
| 50 °C | 2 minuti | 1 cikel | aktivacija Taq polimeraze |
| 95 °C | 10 minut | 1 cikel | začetna denaturacija |
| 95 °C | 15 sekund | 50 ciklov | prileganje |
| 63 °C | 1,5 minute | | podaljševanje |
| 4 °C | neskončno | konec reakcije | |

5. Program SDS v2.2 je kot rezultat podal vrednosti Ct (Cycle threshold) pri predpisanem fluorescenčnem pragu 0,1. Na podlagi Ct za referenčne standarde z znanim številom kopij DNA je računalnik izračunal število kopij pomnožene DNA za posamezen alel v preiskovanih vzorcih. Iz tega smo nato po enačbi $Ct \text{ V617F}/(Ct \text{ V617F}+Ct \text{ WT}) \cdot 100$ izračunali odstotek *JAK2*V617F alela.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ PPM- *JAK2*V617F 25 X (mešanica specifičnih smernih in protismernih oligonukleotidov ter specifične sonde FAM-TAMRA za *JAK2*V617F), IPSOGEN
- ❖ PPM- *JAK2* WT 25 X (mešanica specifičnih smernih in protismernih oligonukleotidov ter specifične sonde FAM-TAMRA za nemutiran alel *JAK2* WT), IPSOGEN
- ❖ kontrole in standardi za umeritveno krivuljo, IPSOGEN

Preglednica XVII: Kontrole in standardi za umeritveno krivuljo

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| V617F pozitivna kontrola | PC-VT | 100 % V617F alela |
| WT pozitivna kontrola | PC-WF | 100 % WT alela |
| M1 V617F/WT | M1 | 10^1 VF kopij+ 10^5 WT kopij/5 μ L |
| M2 V617F/WT | M2 | 10^2 VF kopij+ 10^4 WT kopij/5 μ L |
| M3 V617F/WT | M3 | 10^4 VF kopij+ 10^2 WT kopij/5 μ L |
| M4 V617F/WT | M4 | 10^5 VF kopij+ 10^1 WT kopij/5 μ L |

- ❖ univerzalna mešanica TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ❖ redistirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems)
- ❖ centrifuga Biofuge (Heraeus)
- ❖ ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems)

3.3.2.4 Določanje pridobljenih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* z alelno specifičnim PCR

Mutacijo v eksonu 12 *JAK2* gena smo določali s pomočjo smernih in protismernih oligonukleotidov (*JAK2*ex12 – F-IC in *JAK2*ex12 – R), s katerima smo pomnožili DNA

odsek dolžine 496 baznih parov, ter štirih smernih oligonukleotidov (JAK2ex12 – F) specifičnih za tarčno sekvenco mutiranih alelov. Omenjene oligonukleotide smo izbrali na podlagi navedb avtorjev Scott *et al.* (N Engl J Med 2007;356:459-68). Tako smo z alelno specifičnim PCR preverili prisotnost štirih najpogostejših mutacij v eksonu 12 *JAK2* gena in sicer: F537-K539delinsL, H538QK539L, K539L in N542-E543del.

Mutacije v eksonu 12 *JAK2* gena smo določali s kompetitivno in nekompetitivno PCR reakcijo. Pri kompetitivni reakciji smo za vsako izmed mutacij pripravili specifično reakcijsko mešanico, v kateri smo uporabili dva smerna oligonukleotidna začetnika (JAK2ex12 – F in JAK2ex12 – F-IC) ter en protismerni oligonukleotidni začetnik (JAK2ex12 – R). JAK – F, se pripne na tarčno sekvenco mutiranega alela in povzroči pomnožitev specifičnega odseka mutirane DNA. Drugi smerni oligonukleotidni začetnik JAK2ex12 – F-IC pa se pripne na tarčno sekvenco obeh alelov in povzroči pomnožitev produkta velikega 496 bp pri obeh mutiranem in nemutiranem alelu. Služi kot interna kontola PCR. Reakcija pomnožitve steče le v primeru, ko se oligonukleotidna začetnika s 3'-konci popolnoma prilegata tarčni sekvenci.

Pri nekompetitivni reakciji pa smo za vsako izmed mutacij pripravili specifično reakcijsko mešanico z enim samim smernim (JAK2ex12 – F ali JAK2ex12 – F-IC) in protismernim (JAK2ex12 – R) oligonukleotidnim začetnikom. S tem smo dosegli večjo občutljivost določanja mutacije, saj se v reakcijskih mešanicah z JAK2ex12 – F, ki se prilega mutiranemu zaporedju, pomnožuje le mutiran alel in zato ne pride do prevlade pomnoževanja *JAK2* z JAK2ex12 – F-IC, ki sicer služi kot interna kontrola PCR.

Postopek:

1. Najprej samo pripravili reakcijsko mešanico za vse vzorce in za slepo kontrolo in jo nato oddelili po 20 μL v posamezne sterilne in označene 200 μL epice.

Preglednica XVIII: Sestava reakcijske zmesi

| Reagenti | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 μL) |
|------------------------------------|---------------------|--|
| 10 \times PCR GOLD pufer (Gibco) | 2,5 μL | 1 x |
| dNTP (2 mM) | 1,5 μL | 0,12 pmol/ μL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,5 μL | 0,50 pmol/ μL |

| | | |
|---|------------|--------------|
| JAK2ex12 – R (100 pmol/μL) | 0,25 μL | 1,00 pmol/μL |
| JAK2ex12 – F-IC (100 pmol/μL) | 0,125 μL | 0,50 pmol/μL |
| JAK2ex12 – F (100 pmol/μL) | 0,125 μL | 0,50 pmol/μL |
| AmpliTaq Gold polimeraza (5 U/μL) | 0,125 μL | 0,025 U/μL |
| demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta) | 14,9 μL | |
| celotna reakcijska zmes | 20,0025 μL | |

Opomba: Pri nekompetitivni reakciji uporabimo le en smerni oligonukleotidni začetnik (bodisi JAK2ex12 – F ali JAK2ex12 – F-IC) in sicer v koncentraciji, ki je enaka koncentraciji JAK2ex12 – R (1,00 pmol/μL).

2. Reakcijski mešanici smo dodali 5 μL vzorčne DNA izolirane iz celic granulocitov venske krvi, tako da smo dobili končni volumen 25 μL. S pipeto smo raztopino premešali in vzorčke postavili v Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer).

Preglednica XIX: Pogoji za alelna specifično PCR reakcijo

| Temperatura | Čas | Postopek | |
|-------------|-----------|--------------------------------|---------------|
| 95 °C | 12 minut | aktivacija Taq Gold polimeraze | |
| 94 °C | 30 sekund | 36 ciklov | denaturacija |
| 62 °C | 1 minuta | | prileganje |
| 72 °C | 1 minuta | | podaljševanje |
| 72 °C | 10 minut | končno podaljševanje | |
| 4 °C | neskončno | konec reakcije | |

3. Po končani reakciji smo vzorčke na kratko centrifugirali in do nadaljnjega postavili na led.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ 10 X PCR Gold pufer (150mM Tris HCl, 100 mM KCl) (Applied Biosystems)
- ❖ 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystems)
- ❖ dNTP Blend, 10 mM (2,5 μM vsakega od nukleotidov: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems)

- ❖ smerni in protismerni oligonukleotidni začetniki (10 nM):
 JAK2ex12Forward (20 NT): 5-CTCCTCTTTGGAGCAATTCA-3 (JAK2ex12 – F-IC)
 JAK2ex12Reverse (21 NT): 5-GAGAAGTTGGGAGTTGCGATA-3 (JAK2ex12 – R)
 F535-K539delinsL (24 NT): 5-CATATGAACCAAATGGTGTTAATC-3 (JAK2ex12 – F)
 H538QK539L (27 NT): 5-CATATGAACCAAATGGTGTTCATT-3 (JAK2ex12 – F)
 K539L (27 NT): 5-CATATGAACCAAATGGTGTTCATT-3 (JAK2ex12 – F)
 542-E543del (28 NT): 5-CAAATGGTGTTCACAAAATCAGAGATT-3 (JAK2ex12– F)
- ❖ AmpliTaq Gold DNA polimeraza, 5 U/μL, (Applied Biosystems)
- ❖ demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ 200 μL sterilne epice (Eppendorf, BioPure)
- ❖ centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- ❖ ciklični pomnoževalnik Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer)

3.3.2.5 Elektroforezna detekcija nukleinskih kislin

Pridelke alelni specifičnih PCR reakcij smo ločili po velikosti na osnovi hitrosti potovanja nukleinskih kislin na 4 % agaroznem gelu. S pomočjo označevalca velikosti DNA smo tako določili dolžine posameznih PCR produktov in jih na ta način identificirali.

Najprej smo pripravili vzorce za nanos na agarozni gel. Na para-film (FUJI) smo nanесли 10 μL demineralizirane vode in jo previdno s pipeto zmešali z 10 μL vzorca. Na prvo in zadnje mesto na agaroznem gelu smo nanесли 2 μL DNA označevalca z barvilom, na ostala mesta pa vzorce. Vključili smo elektroforezni E-gel. Po pol ure smo detektirali rezultate na sistemu BIO-RAD Gel Doc 1000, ki omogoči prenos in shrani sliko s pomočjo CCD kamere v računalniškem programu.

MATERIAL in REAGENTI:

- ❖ označevalec DNA velikosti, velikostni razred 100 – 1000 bp (Abgene)
- ❖ para-film (FUJI)
- ❖ 4% agarozni gel z etidijevim bromidom (E-gel, InVitrogen)
- ❖ demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ detekcijski sistem BIO-RAD Gel Doc 1000

3.3.3 Analiza izražanja genov *PTPN6* in *PTPN11*

Kvantifikacijo izražanja genov *PTPN6* in *PTPN11* za fosfatazi SHP-1 in SHP-2 smo izvedli v dvostopenjski reakciji, pri kateri smo v prvem koraku z encimom reverzno transkriptazo na podlagi vzorčne RNA izolirane iz celic granulocitov sintetizirali cDNA, nato pa v drugem koraku z uporabo specifičnih oligonukleotidov in fluorescenčno označene sonde želeno gensko zaporedje pomnožili v verižni reakciji s polimerazo v realnem času.

3.3.3.1 Sinteza cDNA

cDNA sintezo iz matrice RNA smo izvedli s pomočjo encima reverzne transkriptaze in drugih reagentov.

Preglednica XX: *Sestava reakcijske zmesi*

| Reagenti za reakcijsko mešanico I | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (12 μ L) |
|--|---------------------|---|
| dNTP (10 mM) | 1 μ L | 0,5 pmol/ μ L |
| heksamerni oligonukleotidi (100 pmol/ μ L) | 2 μ L | 5 μ M |
| celotna reakcijska zmes | 3 μ L | |

Preglednica XXI: *Sestava reakcijske zmesi II*

| Reagenti za reakcijsko mešanico II | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (20 μ L) |
|------------------------------------|---------------------|---|
| 5 X RT-PCR pufer | 4 μ L | 1 X |
| 100 mM DTT | 2 μ L | 10 mM |
| inhibitor RNaz (PE) | 1 μ L | 20 U/20 μ L |
| RT encim –SuperScript II | 1 μ L | 200 U/20 μ L |
| celotna reakcijska zmes | 8 μ L | |

Postopek:

9 μL RNA (1 μg RNA) raztopljene v vodi smo odpipetirali v 0,2 mL epruvice. Med pripravo cDNA sinteze smo morali vzorce RNA ves čas hraniti na ledu. Vzorcem smo dodali 3 μL reakcijske mešanice I in jih inkubirali v aparatu GeneAmp Thermo Cyclor 9600 (Perkin Elmer) pri 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 minut. Po končanem segrevanju smo epruvice iz aparata takoj postavili na led. Epruvice smo potem najprej centrifugirali (spin down, Biofuge pico) nato pa vzorcem dodali še 8 μL reakcijske mešanice II. Reakcijo PCR smo izvedli v cikličnem pomnoževalniku GeneAmp Thermo Cyclor 9600, Perkin Elmer po programu: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 50 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 4 $^{\circ}\text{C}$. Pripravljeno cDNA smo nato redčili z DNaz in RNaz prosto vodo do končnega volumna 50 μL in jo shranili pri – 20 $^{\circ}\text{C}$.

MATERIAL IN REAGENTI:

- ❖ 0,2 mL epruvice RNaz in DNaz proste (Eppendorf, BioPure)
- ❖ 100 mM ditioneitol-DTT (InVitrogen)
- ❖ 10 mM dNTP Blend (Applied Biosystems)
- ❖ heksamerni oligonukleotidi (Applied Biosystems)
- ❖ 5 X RT-PCR pufer (InVitrogen)
- ❖ inhibitor RNaz (Applied Biosystems)
- ❖ RT encim –SuperScript II (InVitrogen)
- ❖ centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

3.3.3.2 Kvantitativno določanje genov *PTPN6* in *PTPN11* z RQ-PCR

Pomnožitev pripravljene cDNA smo izvedli z uporabo reagentov TaqMan® Gene Expression Assay (P/N 4331182) (Applied Biosystems). Gre za mešanico dveh specifičnih neoznačenih oligonukleotidnih začetnikov potrebnih za pomnožitev zelenega nukleotidnega zaporedja in TaqMan® MGB (Minor groove binder) sonde konjugirane z molekulo, ki se veže v mali jarek dvovertične DNA in označene z fluorescenčnim barvilom FAM™, s katero to zaporedje detektiramo.

Reakcijsko mešanico za PCR reakcijo smo pripravili po navedenem protokolu. Kot vzorec smo uporabili iz vzorčne RNA sintetizirano cDNA. Kontrolo so predstavljali vzorci RNA z odsotno mutacijo v *JAK2* genu.

Za izvedbo validacijskega poskusa smo eno izmed vzorčnih cDNA serijsko redčili z demineralizirano vodo, tako da smo dobili raztopine s koncentracijami 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 in 0,01. Te raztopine smo nato podobno kot ostale vzorce v dvojniku nanесли v vsako izmed reakcijskih zmesi.

Postopek:

1. Najprej smo pripravili reakcijske mešanice za *PTPN6*, *PTPN11* in *B2M* za največ 15 vzorcev in za slepo kontrolo (vse v dvojniku) in jih nato oddelili po 20 μL v posamezne vdolbinice na mikrotitrski ploščici.

Preglednica XXII: Sestava reakcijske zmesi za *PTPN6* in *PTPN11*

| Reagenti za reakcijsko mešanico | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 μL) |
|--|---------------------|--|
| 2 X TaqMan® Universal PCR Master Mix | 12,5 μL | 1 X |
| 20 X TaqMan® Gene Expression Assay Mix | 1,25 μL | 1 X |
| demineralizirana voda | 6,25 μL | |
| celotna reakcijska zmes | 20 μL | |

Preglednica XXIII: Sestava reakcijske zmesi za *B2M*

| Reagenti za reakcijsko mešanico | Volumen za 1 vzorec | Koncentracija v končni raztopini (25 μL) |
|--------------------------------------|---------------------|--|
| 2 X TaqMan® Universal PCR Master Mix | 12,5 μL | 1 X |
| ENF 1302 (7,5 pmol/ μL) | 1 μL | 0,3 pmol/ μL |
| ENP 1342 (5 pmol/ μL) | 1 μL | 0,2 pmol/ μL |
| ENR 1362 (7,5 pmol/ μL) | 1 μL | 0,3 pmol/ μL |

| | | |
|-------------------------|--------|--|
| demineralizirana voda | 4,5 µL | |
| celotna reakcijska zmes | 20 µL | |

2. Reakcijski mešanici smo dodali 5 µL vzorčne cDNA, tako da je reakcija potekala v 25 µL reakcijske raztopine. S pipeto smo raztopino v vsaki vdolbinici malo premešali, mikrotitrsko ploščico pokrili s prozorno samolepilno folijo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems), centrifugirali (Labofuge, Heraeus) pri 1600 obratih 1 min in ploščico vstavili v ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems)

Preglednica XXIV: RQ-PCR program

| Temperatura | Čas | Postopek | |
|-------------|-----------|----------------|---------------------------|
| 50 °C | 2 minuti | 1 cikel | aktivacija Taq polimeraze |
| 95 °C | 10 minut | 1 cikel | začetna denaturacija |
| 95 °C | 15 sekund | 40 ciklov | prileganje |
| 63 °C | 1 minuta | | podaljševanje |
| 4 °C | neskončno | konec reakcije | |

3. Kot rezultat je program SDS v2.2 (Applied Biosystems) podal vrednosti Ct (Cycle threshold) pri fluorescenčnem pragu 0,2.

MATERIAL IN REAGENTI:

- ❖ univerzalna mešanica TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ❖ TaqMan® Gene Expression Assay za *PTPN6* (Hs00169359_m1) in *PTPN11* (Hs00275784_m1) (Applied Biosystems)
- ❖ smerni oligonukleotidni začetnik ENF 1302 (Applied Biosystems)
- ❖ ENF 1302 (18NT): 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3'
- ❖ protismerni oligonukleotidni začetnik ENR 1362 (Applied Biosystems)
- ❖ ENR 1362 (18NT): 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3'
- ❖ fluorescenčno označena sonda ENP 1342 (Applied Biosystems)
- ❖ ENP 1342 (26NT): 5'- CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-3'

- ❖ demineralizirana voda (DNAz in RNAz prosta)
- ❖ centrifuga Labofuge (Heraeus)
- ❖ ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS (Applied Biosystems)

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s pomočjo statističnega programa SPSS (Statsoft Inc, ZDA).

Normalnost porazdelitve vrednosti parametrov krvne slike in odstotka *JAK2* mutiranega alela, ki smo jo ovrednotili s testom Kolmogorov-Smirnov, nam je omogočila uporabo parametričnih testov pri obdelavi teh podatkov. Tako smo razlike v mutaciji na *JAK2* pri različnih boleznih opredelili z enostranskim ANOVA preizkusom, s post hoc Tukey-evim testom pa smo ugotavljali razlike med posameznimi boleznimi. Korelacijo med deležem prisotnega mutiranega alela in številom trombocitov, levkocitov in koncentracijo hemoglobina smo opredelili s Pearson-ovim dvostranskim poskusom.

Pri obdelavi rezultatov analize relativne genske ekspresije *PTPN6* in *PTPN11*, smo se zaradi majhnega števila preiskovancev odločili za uporabo neparametričnih testov in primerjavo vrednosti median. Medsebojno povezanost relativne genske ekspresije s parametri krvne slike smo ugotavljali s Spearmanovim koeficientom korelacije (ρ). Za primerjavo vrednosti relativne genske ekspresije med različnimi skupinami bolnikov pa smo uporabili Mann-Whitney-ev test.

Ponovljivost v seriji analiz smo podali s koeficientom variacije. Naklone premic smo pridobili z linearno regresijo.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE PRISOTNOSTI JAK2V617F PRI BOLNIKIH S KMPB

4.1.1 Primerjava občutljivosti različnih metod verižne reakcije s polimerazo (PCR) za določanje prisotnosti JAK2V617F mutacije

Prisotnost pridobljene mutacije *JAK2V617F* smo preverili s tremi različnimi metodami verižne reakcije s polimerazo: alelnu specifičnim PCR ter z dvema različnima metodama RQ-PCR, pri čemer smo uporabili reagenčna kompleta JAK2 MutaScreen™ Kit in JAK2 MutaQuant™ Kit (Ipsogen). Vse tri metode smo izvedli vzporedno in tako primerjali njihovo občutljivost.

Preglednica XXV: Število bolnikov s prisotno/odsotno *JAK2V617F* mutacijo pri detekciji z različnimi PCR metodami ter delež *JAK2V617F* pozitivnih bolnikov pri PP, ET in KIM

| | <i>JAK2V617F</i> | alelnu specifični PCR | RQ-PCR | | % bolnikov z <i>JAK2V617F</i> |
|-----|------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------|
| | | | JAK2 MutaScreen™ Kit | JAK2 MutaQuant™ Kit | |
| ET | neg. | 36 | 34 | 34 | |
| | poz. | 51 | 53 | 53 | 61 |
| PP | neg. | 1 | 1 | 0 | |
| | poz. | 17 | 17 | 18 | 100 |
| KIM | neg. | 0 | 0 | 0 | |
| | poz. | 5 | 5 | 5 | 100 |

Opomba: Delež *JAK2V617F* pozitivnih bolnikov je izračunan iz podatkov pridobljenih z RQ-PCR in umeritveno krivuljo (JAK2 MutaQuant™ Kit)

Za bolj občutljivo metodo se je izkazal RQ-PCR, s katerim smo mutacijo v *JAK2* genu zaznali tudi pri treh bolnikih (2 z ET in 1 s PP), ki so bili sicer *JAK2V617F* negativni pri

analizi s klasičnim alelnim specifičnim PCR. Pri enem bolniku s PP mutacije v genu *JAK2* nismo zaznali ob uporabi reagenčnega kompleta JAK2 MutaScreen™ Kit, medtem ko sta ostali dve metodi dali močno pozitiven rezultat (39,6 % *JAK2V617F* alela). Največjo občutljivost detekcije *JAK2* mutacije smo torej dosegli z RQ-PCR in določitev deleža mutiranega alela s pomočjo umeritvene krivulje (reagenčni komplet JAK2 MutaQuant™ Kit).

Deleži bolnikov s prisotno *JAK2V617F* mutacijo, izračunani iz podatkov pridobljenih z reagenčnim kompletom JAK2 MutaQuant™ Kit, je bil 61 % (51/87) pri ET, 100 % (18/18) pri PP in 100 % (5/5) pri KIM.

4.1.2 Ponovljivost rezultatov določanja deleža *JAK2V617F* z RQ-PCR s pomočjo umeritvene krivulje

Prisotnost *JAK2V617F* mutacije pri 110 bolnikih smo z reakcijo RQ-PCR s kompletom JAK2 MutaQuant™ Kit določali v 9 analiznih poskusih.

Ponovljivost detekcije *JAK2* mutacije med eksperimenti smo določili s primerjavo Ct vrednosti za standarde, priložene kompletu JAK2 MutaQuant™ Kit, ki so vsebovali 10, 100, 10000 in 100000 kopij DNA z mutiranim oziroma nemutiranim *JAK2* alelom.

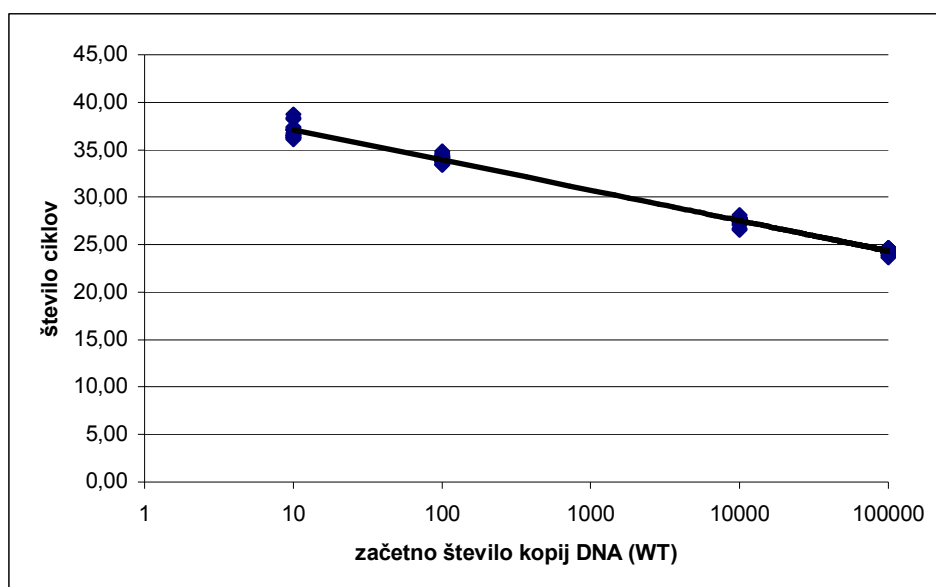
Meritev posameznega standarda smo pri vsakem poskusu izvedli v dvojniku, nato pa iz povprečja meritev za različne koncentracije DNA pri vsakem poskusu narisali umeritveno krivuljo z določenim naklonom in presečiščem z ordinato. Izračunali smo tudi povprečne vrednosti Ct za posamezen standard, ki smo jih dobili pri različnih poskusih ter narisali umeritveno krivuljo iz povprečja vrednosti Ct vseh poskusov.

Preglednica XXVI: *Ct vrednosti standardov z različnim številom kopij DNA z nemutiranim *JAK2* alelom, ki so bile pridobljene v 9 analiznih poskusih*

| | | število kopij DNA (WT) | | | | | |
|------------|-----------|------------------------|-------|-------|--------|--------|----------------|
| | ponovitev | 10 | 100 | 10000 | 100000 | naklon | R ² |
| Ct (exp.1) | 1 | 36,49 | 34,14 | 27,23 | 24,27 | -3,129 | 0,9934 |
| | 2 | 36,50 | 34,63 | 27,60 | 24,41 | | |

| | | | | | | | |
|--|---|------------|------------|------------|------------|--------|--------|
| Ct (exp.2) | 1 | 38,38 | 34,81 | 28,13 | 24,67 | -3,408 | 0,9975 |
| | 2 | 36,07* | 34,23 | 27,85 | 24,29 | | |
| Ct (exp.3) | 1 | 37,06 | 34,41 | 27,83 | 24,19 | -3,222 | 0,9983 |
| | 2 | 36,33* | 33,97 | 27,73 | 24,36 | | |
| Ct (exp.4) | 1 | 38,74 | 34,20 | 27,69 | 24,52 | -3,319 | 0,9927 |
| | 2 | 37,09 | 34,14 | 27,57 | 24,66 | | |
| Ct (exp.5) | 1 | 36,29 | 33,84 | 27,44 | 24,10 | -3,081 | 0,9984 |
| | 2 | 36,45 | 33,49 | 27,06 | 24,25 | | |
| Ct (exp.6) | 1 | 36,71 | 34,37 | 27,74 | 24,10 | -3,172 | 0,9973 |
| | 2 | 37,24 | 33,81 | 27,83 | 24,44 | | |
| Ct (exp.7) | 1 | 35,10* | 33,70 | 26,59 | 23,86 | -3,289 | 0,9975 |
| | 2 | 35,25* | 33,39 | 26,70 | 23,66 | | |
| Ct (exp.8) | 1 | 36,21 | 34,16 | 27,64 | 24,63 | -3,164 | 0,9892 |
| | 2 | 38,25 | 33,77 | 27,58 | 24,56 | | |
| Ct (exp.9) | 1 | 37,35 | 34,28 | 27,61 | 24,25 | -3,227 | 0,9981 |
| | 2 | 37,09 | 33,47 | 27,46 | 24,28 | | |
| povprečje Ct | | 37,13±0,97 | 34,05±0,39 | 27,52±0,39 | 24,31±0,27 | -3,220 | 0,9999 |
| Z * so označene meritve, ki zaradi velikih odstopanj pri izračunu povprečij niso upoštevane. | | | | | | | |

Graf 1: Standardna krivulja, narisana na podlagi Ct vrednosti standardov (pridobljene pri vseh analiznih poskusih) z različnim številom kopij DNA z nemutiranim alelom

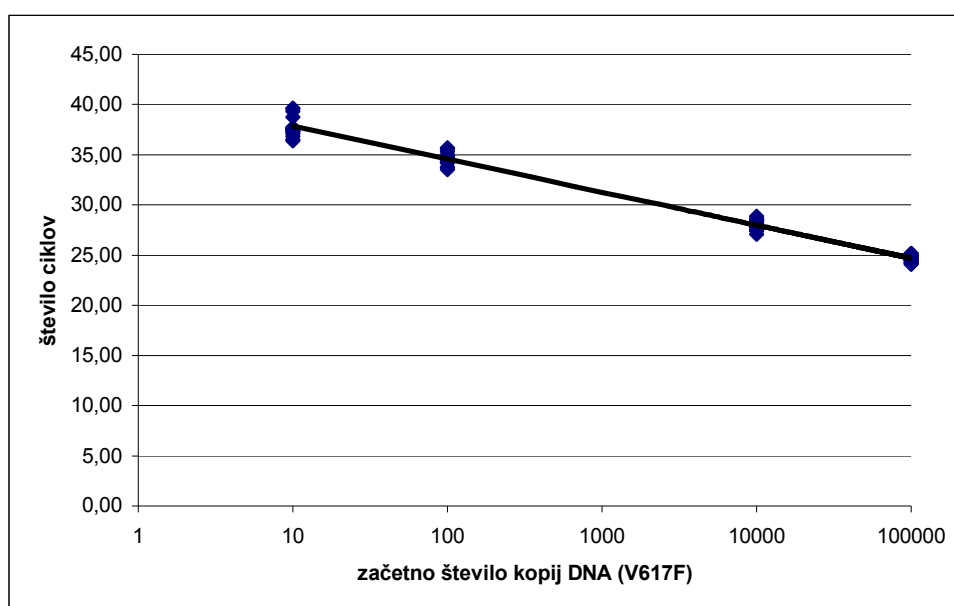


Preglednica XXVII: Ct vrednosti standardov z različnim številom kopij DNA z JAK2V617F alelom, ki so bile pridobljene v 9 analiznih poskusih

| | ponovitev | število kopij DNA (V617F) | | | | naklon | R ² |
|------------|-----------|---------------------------|-------|-------|--------|--------|----------------|
| | | 10 | 100 | 10000 | 100000 | | |
| Ct (exp.1) | 1 | 37,65 | 33,76 | 27,08 | 24,07 | -3,156 | 0,9960 |
| | 2 | 36,50 | 34,26 | 27,51 | 24,46 | | |
| Ct (exp.2) | 1 | 37,26 | 35,51 | 28,56 | 24,98 | -3,252 | 0,9894 |
| | 2 | 36,38* | 35,60 | 28,59 | 24,96 | | |
| Ct (exp.3) | 1 | 37,69 | 35,32 | 28,60 | 24,71 | -3,236 | 0,9940 |
| | 2 | 37,57 | 34,30 | 27,95 | 24,90 | | |
| Ct (exp.4) | 1 | 39,61 | 35,67 | 28,85 | 25,16 | -3,493 | 0,9956 |
| | 2 | 38,74 | 35,02 | 28,04 | 25,16 | | |
| Ct (exp.5) | 1 | 37,07 | 34,29 | 27,51 | 24,27 | -3,287 | 0,9988 |
| | 2 | 37,41 | 34,46 | 27,51 | 24,21 | | |
| Ct (exp.6) | 1 | 36,50 | 34,86 | 28,39 | 24,78 | -3,405 | 0,9983 |

| | | | | | | | |
|--|---|------------|------------|------------|------------|--------|--------|
| | 2 | 35,36* | 36,37* | 28,18 | 24,51 | | |
| Ct (exp.7) | 1 | 39,64* | 33,70 | 27,42 | 24,20 | -3,105 | 0,9994 |
| | 2 | 36,87 | 33,51 | 27,57 | 24,50 | | |
| Ct (exp.8) | 1 | 37,30 | 34,16 | 28,43 | 24,63 | -3,243 | 0,9960 |
| | 2 | 37,73 | 34,94 | 27,79 | 24,40 | | |
| Ct (exp.9) | 1 | 39,32 | 34,71 | 28,47 | 24,95 | -3,375 | 0,9926 |
| | 2 | 37,58 | 35,00 | 28,11 | 24,77 | | |
| povprečje Ct | | 37,69±0,96 | 34,65±0,77 | 28,03±0,51 | 24,65±0,34 | -3,270 | 0,9997 |
| Z * so označene meritve, ki zaradi velikih odstopanj pri izračunu povprečja niso upoštevane. | | | | | | | |

Graf 2: Standardna krivulja, narisana na podlagi Ct vrednosti za standarde (pridobljene pri vseh analiznih poskusih) z različnim številom kopij DNA z JAK2V617F alelom



Visoka vrednost regresijskega koeficienta ($R^2=0,99$ ali več) med Ct meritvami za različne standarde pri vseh poskusih kaže na to, da komplet JAK2MutaQuant™ Kit omogoča natančno določanje prisotnosti *JAK2* mutacije v neznanih vzorcih.

Podobne vrednosti Ct za posamezen standard, dobljene pri različnih poskusih, kažejo na ustrezno ponovljivost, ki je zelo visoka pri večjem začetnem številu kopij DNA (10000 in

100000), z manjšanjem začetne koncentracije DNA pa so tudi odstopanja v vrednosti Ct med poskusi pričakovano večja.

4.1.3 Delež mutiranega alela JAK2V617F pri bolnikih s KMPB in njegova korelacija s parametri krvne slike

a) Delež mutiranega alela JAK2V617F pri bolnikih s KMPB

Delež mutiranega alela JAK2V617F smo določili pri bolnikih s KMPB, ki niso prejeli zdravljenja (preglednica XXV).

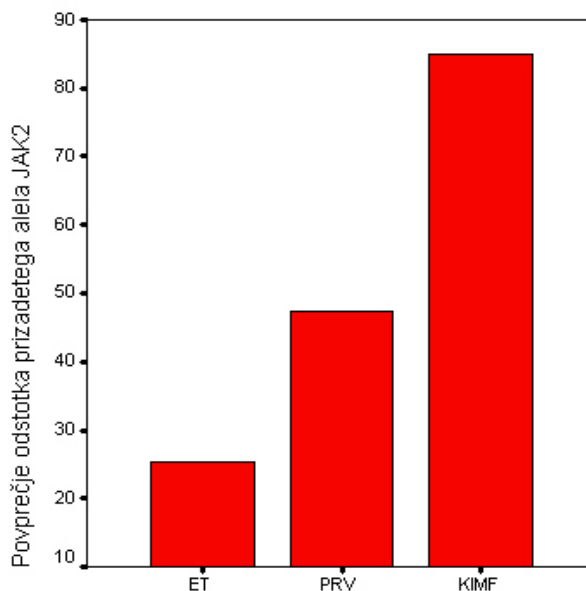
Preglednica XXVIII: Rezultati določanja JAK2V617F in ocena koncentracije hemoglobina, števila levkocitov in trombocitov pri nezdravljenih bolnikih

| Značilnost | Število bolnikov ali mediana vrednost (razpon) |
|---|--|
| Bolniki z ET | 87 |
| Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) | 53 (61 %) |
| Število zdravljenih (%) | 22 (25 %) |
| Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) | 34 (39 %) |
| Hemoglobin, g/L | 139 (103-173) |
| Število trombocitov, x 10 ⁹ /L | 660 (354-2155) |
| Število levkocitov, x 10 ⁹ /L | 8.3 (4.6-22.7) |
| Bolniki s PP | 18 |
| Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) | 17 (94 %) |
| Število zdravljenih (%) | 12 (67 %) |
| Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) | 5 (28 %) |
| Hemoglobin, g/L | 166 (128-195) |
| Število trombocitov, x 10 ⁹ /L | 475 (411-610) |
| Število levkocitov, x 10 ⁹ /L | 12.2 (4.2-25.8) |
| Bolniki s KIM | 5 |
| Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) | 5 (100 %) |
| Število zdravljenih (%) | 2 (40 %) |
| Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) | 3 (60 %) |
| Hemoglobin, g/L | 133 (128-138) |

| | | |
|---|---|------------------|
| | Število trombocitov, x 10 ⁹ /L | 364 (111-679) |
| | Število levkocitov, x 10 ⁹ /L | 13.3 (12.4-25.3) |
| Koncentracija hemoglobina, število trombocitov in levkocitov se nanaša na bolnike s prisotno mutacijo <i>JAK2</i> brez zdravljenja. | | |

Povprečna vrednost deleža mutiranega alela *JAK2V617F* znaša 25 % za bolnike z ET, 47 % za bolnike s PP in 85 % za bolnike s KIM. Graf 3 prikazuje delež mutiranega alela pri ET, PP in KIM.

Graf 3: Povprečni delež mutiranega alela *JAK2V617F* pri bolnikih z ET, PP in KIM brez zdravljenja



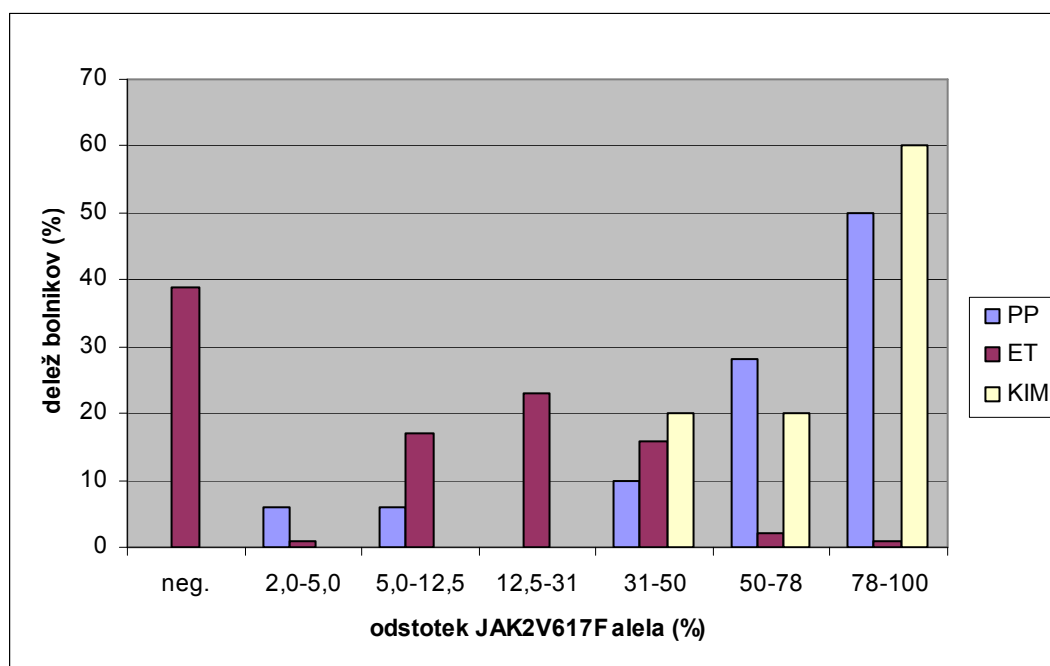
Ugotovili smo, da obstaja statistično pomembna ($p < 0,001$) razlika za delež mutiranega alela med bolniki z ET in KIM. Statistično pomembne razlike med ostalimi kombinacijami nismo dokazali.

S kompletoma *JAK2 MutaScreen™ Kit* in *JAK2 MutaQuant™ Kit* smo določili tudi deleže bolnikov z določenim deležem *JAK2V617F*. Rezultate prikazujeta preglednica XXIX in graf 4.

Preglednica XXIX: Primerjava deležev bolnikov z določenim odstotkom mutiranega *JAK2* alela pri PP, ET in KIM pridobljenih s kompleti *JAK2 MutaScreen™* in *JAK2 MutaQuant™ Kit*

| % <i>JAK2V617F</i> alela | <i>JAK2 MutaScreen™ Kit</i> (% bolnikov) | | | <i>JAK2 MutaQuant™ Kit</i> (% bolnikov) | | |
|--------------------------|---|----|-----|--|----|-----|
| | PP | ET | KIM | PP | ET | KIM |
| neg. | 6 | 39 | 0 | 0 | 39 | 0 |
| 2,0-5,0 | 6 | 1 | 0 | 6 | 1 | 0 |
| 5,0-12,5 | 6 | 13 | 0 | 6 | 17 | 0 |
| 12,5-31 | 0 | 26 | 0 | 0 | 23 | 0 |
| 31-50 | 0 | 18 | 20 | 10 | 16 | 20 |
| 50-78 | 22 | 3 | 20 | 28 | 2 | 20 |
| 78-100 | 61 | 1 | 60 | 50 | 1 | 60 |

Graf 4: Delež bolnikov z določenim odstotkom *JAK2V617F* alela pri PP, ET in KIM (*MutaQuant™ Kit*)



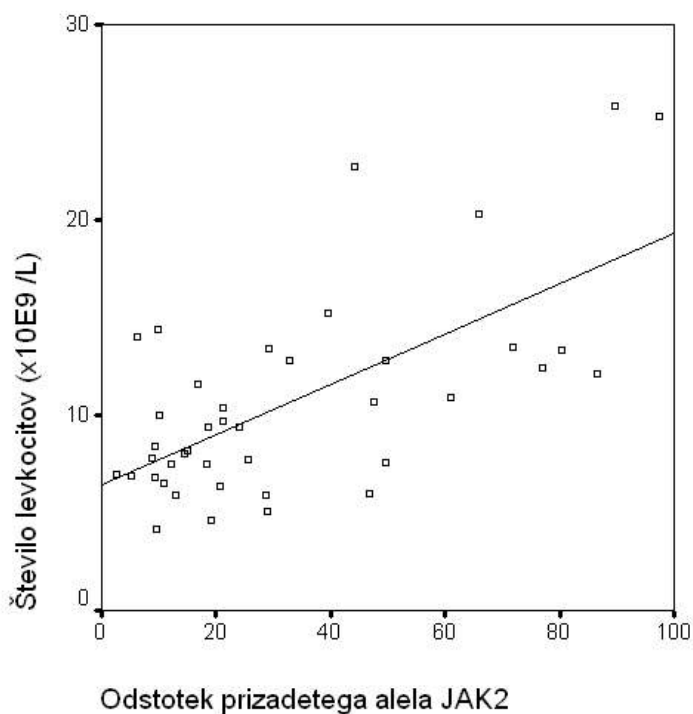
Rezultati RQ-PCR kažejo, da je pri bolnikih z ET, pri katerih *JAK2V617F* mutacijo zaznamo, le-ta večinoma prisotna v 5 do 50 % granulocitov, medtem ko je njen delež pri PP in KIM precej višji (31-100%).

Pri določanju deležev *JAK2V617F* mutacije s kompletoma JAK2 MutaScreen™ Kit in JAK2 MutaQuant™ Kit pomembnih razlik v ugotovljenem deležu mutacije nismo zaznali.

b) Korelacija med odstotkom mutiranega alela *JAK2V617F* in parametri krvne slike

Preizkušali smo domnevo objavljeno v literaturi (12-14), da odstotek mutiranega alela *JAK2V617F* vpliva na fenotip bolezni. Napravili smo Pearson-ov dvostranski preizkus korelacije. Dokazali smo statistično pomembno korelacijo med odstotkom mutiranega alela in številom levkocitov (Pearson-ov koeficient korelacije $r = 0.657$, $p < 0.001$). Graf 5 prikazuje porazdelitev števila levkocitov pri različnih odstotkih mutiranega alela *JAK2V617F*. Pri dobljenih rezultatih sicer opazamo manjše število trombocitov in večjo vrednost hemoglobina z večanjem odstotka mutiranega alela *JAK2V617F*, vendar za te korelacije nismo dosegli statističnega pomena.

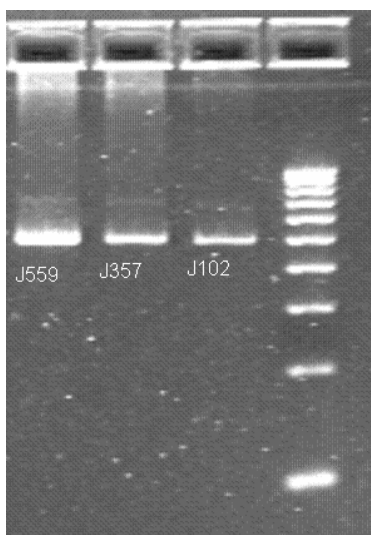
Graf 5: Porazdelitev števila levkocitov pri različnih odstotkih mutiranega alela *JAK2V617F* ($r = 0.657$, $p < 0.001$)



4.2 REZULTATI ELEKTROFOREZE PCR PRIDELKOV ZA DOLOČANJE MUTACIJE JAK2 V EKSONU 12

Neodvisno od skupine 110 preiskovancev smo z alelno specifičnim PCR določali prisotnost mutacij v eksonu 12 *JAK2* gena pri bolniku z diagnosticirano PP in odsotno *JAK2V617F* mutacijo.

Po kompetitivnem alelno specifičnem PCR smo ob uporabi dveh smernih oligonukleotidnih začetnikov (*JAK2 - F* in *JAK2 – F-IC*) na gelu zaznali eno samo liso velikosti 496 bp. Ker je mutacija v eksonu 12 prisotna v nizkem deležu, smo predpostavili, da je v reakciji prišlo do prevlade pomnoževanja *JAK2* z *JAK2 – F-IC* oligonukleotidnim začetnikom, ki sicer služi kot interna kontrola PCR. To je onemogočilo zadostno pomnožitev mutiranega alela, in njegovo detekcijo na gelu.

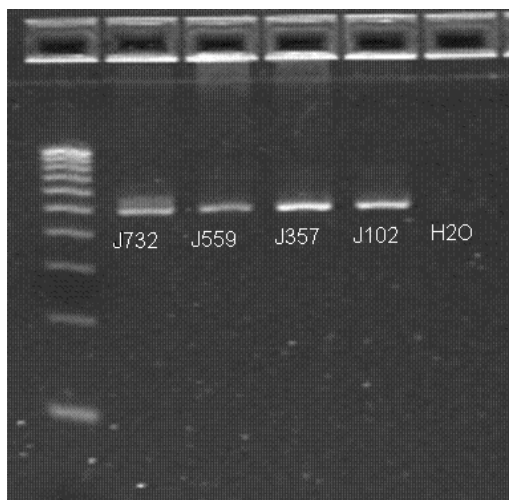


Slika 3: Agarozna gelska elektroforeza po kompetitivnem alelno specifičnem PCR: vidna lisa, ki ustreza pomnožitvi DNA z *JAK2ex12-F-IC*.

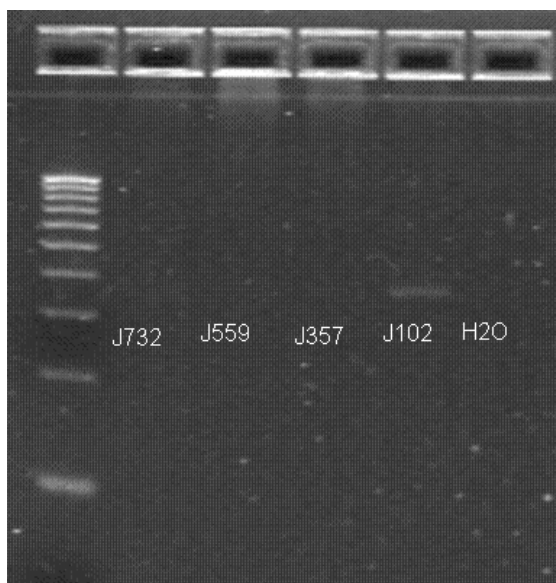
Reakcijo smo zato ponovili še enkrat, tako da smo izvedli nekompetitivni alelno specifični PCR. Pri tem smo uporabili en sam smerni oligonukleotidni začetnik (bodisi *JAK2 – F* ali *JAK2 – F-IC*), s čimer smo povečali možnost pomnoževanja mutiranih alelov.

Po agarozni gelski elektroforezi smo v primeru, ko je bil uporabljen *JAK2 – F-IC* ponovno detektirali liso velikosti 496 bp. Šibka lisa pa je bila tokrat prisotna tudi v primeru, ko smo

kot smerni oligonukleotidni začetnik uporabili JAK2 – F (N542-E543del). Uporaba ostalih začetnih oligonukleotidov ni dala pozitivnih rezultatov.



Slika 4: Agarozna gelska elektroforeza po nekompetitivni reakciji: vidna lisa, ki ustreza pomnožitvi DNA z JAK2ex12-F-IC



Slika 5: Agarozna gelska elektroforeza po nekompetitivnem alelnu specifičnem PCR: slabo vidna lisa pri J102 ustreza pomnožitvi DNA z JAK2ex12-F, N542-E543del

Pri slepih vzorcih vode, na agaroznem gelu lis nismo zaznali, kar pomeni, da med pripravo kot tudi med PCR reakcijo ni prišlo do kontaminacije vzorca s pridelki prejšnjih reakcij ali tuje DNA.

Z agarozno gelsko elektroforezo PCR produktov pridobljenih z nekompetitivnim alelnim specifičnim PCR smo torej pri bolniku s pravo policitemijo in odsotno mutacijo *JAK2V617F* določili prisotnost N542-E543del mutacije v eksonu 12.

4.3 KVANTIFIKACIJA IZRAŽANJA GENOV *PTPN6* IN *PTPN11* S PRIMERJALNO $\Delta\Delta Ct$ METODO

4.3.1 Vpeljava $\Delta\Delta Ct$ metode

a) **Dokaz enakosti učinkovitosti pomnoževanja genov *PTPN6*, *PTPN11* in *B2M***

Da bi potrdili enakost učinkovitosti pomnoževanja tarčnega (*PTPN6* oziroma *PTPN11*) in referenčnega gena (*B2M*), ki je predpogoj za uporabo $\Delta\Delta Ct$ metode, smo najprej izvedli validacijski poskus. Pri tem smo spremljali spreminjanje ΔCt ($Ct(PTPN)-Ct(B2M)$) v odvisnosti od redčenja vzorčne cDNA.

Preglednica XXX: *Povprečne vrednosti Ct za *PTPN6* in *B2M* ter ΔCt pri različnih koncentracijah cDNA*

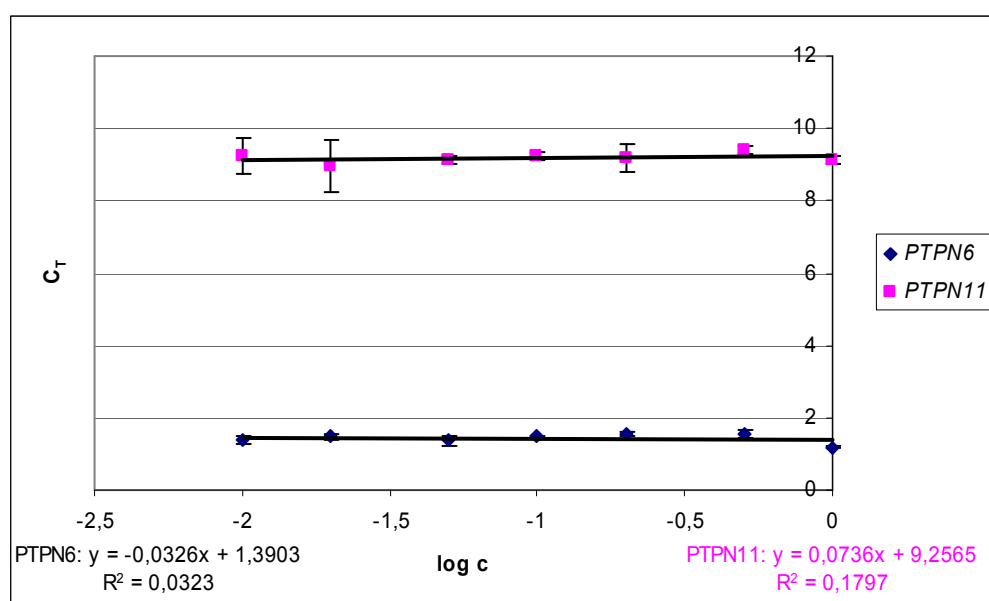
| konc. cDNA | <i>PTPN6</i> , povprečje Ct | <i>B2M</i> , povprečje Ct | ΔCt (<i>PTPN6</i> - <i>B2M</i>) |
|------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 21,77±0,02 | 20,60±0,02 | 1,17±0,03 |
| 0,5 | 22,82±0,01 | 21,27±0,11 | 1,55±0,11 |
| 0,2 | 24,255±0,02 | 22,815±0,05 | 1,54±0,05 |
| 0,1 | 25,82±0,04 | 24,345±0,01 | 1,48±0,04 |
| 0,05 | 26,68±0,14 | 25,31±0,04 | 1,37±0,15 |
| 0,02 | 27,625±0,01 | 26,16±0,08 | 1,47±0,08 |
| 0,01 | 28,52±0,05 | 27,14±0,12 | 1,38±0,13 |

Preglednica XXXI: *Povprečne vrednosti Ct za *PTPN11* in *B2M* ter ΔCt pri različnih koncentracijah cDNA*

| konc. cDNA | <i>PTPN11</i> , povprečje Ct | <i>B2M</i> , povprečje Ct | ΔCt (<i>PTPN6</i> - <i>B2M</i>) |
|------------|------------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 29,75±0,11 | 20,60±0,02 | 9,15±0,11 |
| 0,5 | 30,65±0,01 | 21,27±0,11 | 9,38±0,11 |

| | | | |
|------|------------|------------|-----------|
| 0,2 | 32,00±0,37 | 22,82±0,05 | 9,18±0,37 |
| 0,1 | 33,59±0,10 | 24,35±0,01 | 9,24±0,10 |
| 0,05 | 34,46±0,11 | 25,31±0,04 | 9,15±0,11 |
| 0,02 | 35,12±0,71 | 26,16±0,08 | 8,96±0,71 |
| 0,01 | 36,36±0,47 | 27,14±0,12 | 9,22±0,49 |

Graf 6: Krivulja relativne učinkovitosti pomnoževanja *PTPN6/PTPN11* in *B2M*



Absolutni vrednosti naklonov za gena *PTPN6* (0,0326) in *PTPN11* (0,0736) sta manjši od 0,1, kar pomeni, da so učinkovitosti pomnoževanja vseh treh genov približno enake. Ustreznost validacijskega poskusa dovoljuje uporabo primerjalne $\Delta\Delta C_T$ metode.

b) Določanje učinkovitosti pomnoževanja genov *PTPN6*, *PTPN11* in *B2M*

Za končni izračun lahko namesto enačbe $\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$ uporabimo poenostavljen izraz $2^{-\Delta\Delta C_T}$, če dokažemo, da je učinkovitost pomnoževanja (E) vseh treh genov blizu 1.

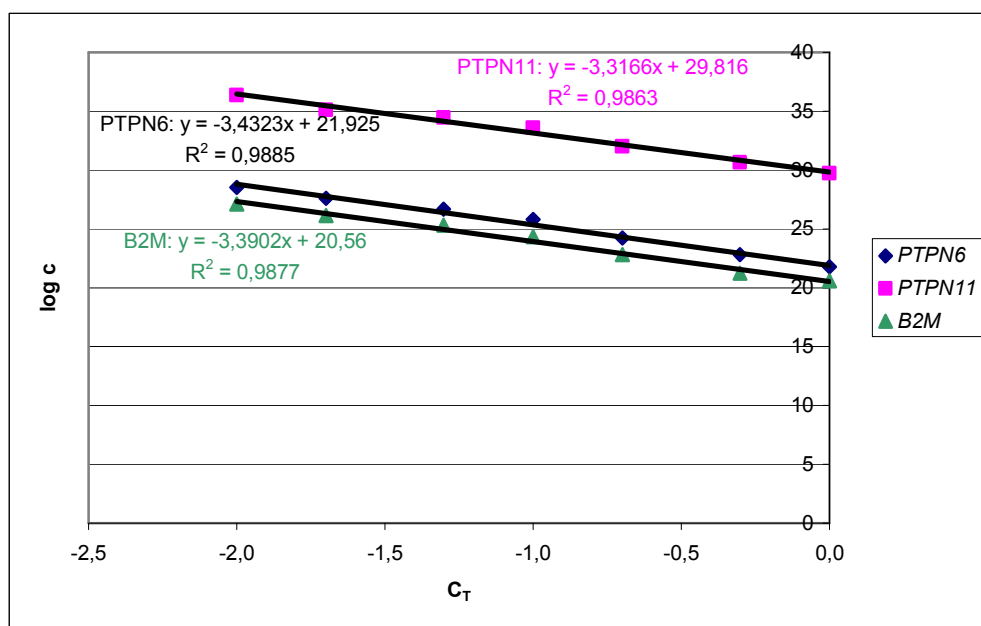
Eksponentnost pomnoževanja podano z enačbo $10^{(-1/\text{naklon})}$, oziroma učinkovitost pomnoževanja produktov PCR, ki jo izračunamo po enačbi $E = [10^{(-1/\text{naklon})}] - 1$, smo določili

s pomočjo naklona krivulje na grafu Ct v odvisnosti od logaritma koncentracije cDNA za posamezen gen. Optimalno učinkovitost $E=1,0$ določimo v primeru, ko je naklon premice med -3,3 in -3,4.

Preglednica XXXII. Povprečne vrednosti Ct za PTPN6, PTPN11 in B2M pri različnih koncentracijah cDNA

| konc. cDNA | Ct(PTPN6) | Ct(PTPN11) | Ct(B2M) |
|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 21,77±0,02 | 29,75±0,11 | 20,60±0,02 |
| 0,5 | 22,82±0,01 | 30,65±0,01 | 21,27±0,11 |
| 0,2 | 24,26±0,02 | 32,00±0,37 | 22,82±0,05 |
| 0,1 | 25,82±0,04 | 33,59±0,10 | 24,35±0,01 |
| 0,05 | 26,68±0,14 | 34,46±0,11 | 25,31±0,04 |
| 0,02 | 27,63±0,01 | 35,12±0,71 | 26,16±0,08 |
| 0,01 | 28,52±0,05 | 36,36±0,47 | 27,14±0,12 |
| naklon | -3,3166 | -3,4323 | -3,3902 |
| R^2 | 0,9863 | 0,9885 | 0,9877 |

Graf 7: Krivulje spreminjanja Ct v odvisnosti od logaritma koncentracije cDNA za PTPN6, PTPN11 in B2M



Ker so nakloni dobljenih krivulj za *PTPN6*, *PTPN11* in *B2M* približno -3,3 to pomeni, da je učinkovitost pomnoževanja $E \approx 1$.

Končni rezultat genske ekspresije dobljen s primerjalno $\Delta\Delta Ct$ metodo zato izračunamo po enačbi $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3.2 Izračun relativne genske ekspresije *PTPN6* in *PTPN11* za vzorce bolnikov s PP in ET po primerjalni $\Delta\Delta Ct$ metodi

Relativno kvantifikacijo izražanja genov *PTPN6* in *PTPN11* smo izvedli s primerjalno $\Delta\Delta Ct$ metodo, ki nam poda količino tarčne DNA normalizirano na endogeno kontrolo in relativno glede na kalibrator (preglednici XXXIV in XXXV).

V našem primeru je endogeno kontrolo predstavljala ekspresija gena za $\beta 2$ mikroglobulin (*B2M*), kalibrator pa povprečje ΔCt ($Ct(PTPN) - Ct(B2M)$) za normalne vzorce (preglednica XXXIII).

Preglednica XXXIII. Povprečje ΔCt za normalne vzorce

| vzorec | $Ct(PTPN6)$ povprečje | $Ct(PTPN11)$ povprečje | $Ct(B2M)$ povprečje | $Ct(PTPN6) -$ $Ct(B2M)$ | $Ct(PTPN11) -$ $Ct(B2M)$ |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| JN7 | 21,88±0,03 | 29,34±0,11 | 20,3±0,04 | 1,58±0,05 | 9,04±0,11 |
| JN8 | 22,15±0,05 | 29,54±0,18 | 20,98±0,08 | 1,17±0,09 | 8,56±0,19 |
| JN9 | 22,12±0,01 | 30,39±0,04 | 21,79±0,01 | 0,33±0,01 | 8,60±0,04 |
| JN11 | 22,11±0,00 | 29,96±0,20 | 21,12±0,06 | 0,99±0,06 | 8,84±0,20 |
| JN12 | 21,89±0,09 | 30,21±0,06 | 21,04±0,03 | 0,85±0,09 | 9,17±0,07 |
| kalibrator povprečje | 22,03±0,13 | 29,89±0,43 | 21,04±0,50 | 0,99±0,52 | 8,85±0,66 |

Preglednica XXXIV: Relativna genska ekspresija *PTPN6* za vzorce bolnikov

| vzorec | Dg. | $Ct(PTPN6)$ povprečje | $Ct(B2M)$ povprečje | ΔCt $PTPN6 - B2M$ | $\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct_{kal.}$ | | $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ |
|------------|-----|--------------------------|------------------------|------------------------------|---|------|--------------------------|
| kalibrator | | 22,03±0,13 | 21,04±0,50 | 0,99±0,52 | 0,00±0,52 | 1,00 | 0,70-1,43 |

| | | | | | | | |
|------|-----|------------|------------|-----------|------------|------|-----------|
| J600 | ET | 20,34±0,16 | 19,08±0,05 | 1,26±0,17 | 0,27±0,17 | 0,83 | 0,74-0,93 |
| J602 | ET | 19,80±0,12 | 17,96±0,28 | 1,84±0,30 | 0,85±0,30 | 0,55 | 0,45-0,68 |
| J621 | PP | 21,18±0,03 | 20,15±0,33 | 1,03±0,33 | 0,04±0,33 | 0,97 | 0,77-1,22 |
| J622 | KIM | 20,42±0,09 | 18,48±0,01 | 1,94±0,09 | 0,95±0,09 | 0,52 | 0,49-0,55 |
| J623 | ET | 21,16±0,11 | 20,13±0,63 | 1,03±0,64 | 0,04±0,64 | 0,97 | 0,62-1,52 |
| J624 | ET | 22,03±0,06 | 21,36±0,12 | 0,67±0,13 | -0,32±0,13 | 1,25 | 1,14-1,37 |
| J626 | ET | 20,51±0,20 | 19,78±0,02 | 0,73±0,20 | -0,26±0,20 | 1,20 | 1,04-1,38 |
| J632 | ET | 22,13±0,01 | 20,68±0,20 | 1,45±0,20 | 0,46±0,20 | 0,73 | 0,63-0,84 |
| J634 | ET | 20,62±0,08 | 19,93±0,13 | 0,69±0,15 | -0,30±0,15 | 1,23 | 1,11-1,37 |
| J637 | ET | 20,12±0,12 | 18,10±0,15 | 2,02±0,19 | 1,03±0,19 | 0,49 | 0,43-0,56 |
| J643 | ET | 19,58±0,04 | 17,70±0,14 | 1,88±0,15 | 0,89±0,15 | 0,54 | 0,49-0,60 |
| J645 | ET | 22,18±0,03 | 20,62±0,11 | 1,56±0,11 | 0,57±0,11 | 0,67 | 0,62-0,73 |
| J646 | ET | 21,20±0,11 | 19,81±0,12 | 1,39±0,16 | 0,40±0,16 | 0,76 | 0,68-0,85 |
| J655 | ET | 24,52±0,02 | 23,08±0,04 | 1,44±0,04 | 0,45±0,04 | 0,73 | 0,71-0,75 |
| J656 | ET | 23,67±0,07 | 22,00±0,04 | 1,67±0,08 | 0,68±0,08 | 0,62 | 0,59-0,66 |
| J657 | ET | 28,71±0,04 | 24,63±0,21 | 4,08±0,21 | 3,09±0,21 | 0,12 | 0,10-0,14 |
| J660 | PP | 24,95±0,03 | 22,76±0,21 | 2,19±0,21 | 1,20±0,21 | 0,44 | 0,38-0,50 |
| J662 | ET | 22,87±0,02 | 21,43±0,05 | 1,44±0,05 | 0,45±0,05 | 0,73 | 0,71-0,76 |
| J666 | ET | 22,07±0,08 | 20,70±0,02 | 1,37±0,08 | 0,38±0,08 | 0,77 | 0,73-0,81 |
| J667 | PP | 25,58±0,10 | 24,30±0,12 | 1,28±0,16 | 0,29±0,16 | 0,82 | 0,73-0,91 |
| J669 | PP | 21,93±0,04 | 21,24±0,18 | 0,69±0,18 | -0,30±0,18 | 1,23 | 1,09-1,39 |
| J670 | ET | 20,95±0,13 | 19,10±0,09 | 1,85±0,16 | 0,86±0,16 | 0,55 | 0,49-0,62 |
| J671 | ET | 27,31±0,05 | 24,29±0,04 | 3,02±0,06 | 2,03±0,06 | 0,24 | 0,23-0,26 |
| J672 | ET | 26,75±0,23 | 23,74±0,00 | 3,01±0,23 | 2,02±0,23 | 0,25 | 0,21-0,29 |
| J691 | ET | 28,81±0,09 | 27,10±0,04 | 1,71±0,10 | 0,72±0,10 | 0,61 | 0,57-0,65 |
| J693 | ET | 28,97±0,01 | 24,93±0,05 | 4,04±0,05 | 3,05±0,05 | 0,12 | 0,12-0,13 |
| J705 | PP | 25,90±0,10 | 24,53±0,09 | 1,37±0,13 | 0,38±0,13 | 0,77 | 0,70-0,84 |
| J707 | ET | 23,65±0,06 | 22,16±0,12 | 1,49±0,13 | 0,50±0,13 | 0,71 | 0,65-0,77 |
| J740 | ET | 22,08±0,01 | 21,43±0,15 | 0,65±0,15 | -0,34±0,15 | 1,27 | 1,14-1,40 |
| J741 | ET | 23,62±0,01 | 22,58±0,01 | 1,04±0,01 | 0,05±0,01 | 0,97 | 0,96-0,97 |
| J749 | ET | 24,32±0,01 | 24,18±0,03 | 0,14±0,03 | -0,85±0,03 | 1,80 | 1,77-1,84 |

| | | | | | | | |
|------|----|------------|------------|-----------|------------|------|-----------|
| J755 | ET | 23,86±0,10 | 22,82±0,15 | 1,04±0,18 | 0,05±0,18 | 0,97 | 0,85-1,09 |
| J758 | ET | 21,30±0,11 | 20,59±0,09 | 0,71±0,14 | -0,28±0,14 | 1,21 | 1,10-1,34 |

Preglednica XXXV. Relativna genska ekspresija *PTPN11* za vzorce bolnikov

| vzorec | Dg. | Ct(<i>PTPN11</i>) | Ct(<i>B2M</i>) | Δ Ct | $\Delta\Delta$ Ct | $2^{(-\Delta\Delta$ Ct) | |
|------------|-----|---------------------|------------------|-------------------|--|-------------------------|-----------|
| | | povprečje | povprečje | <i>PTPN11-B2M</i> | Δ Ct- Δ Ct _{kal.} | | |
| kalibrator | | 29,89±0,43 | 21,04±0,50 | 8,85±0,66 | 0,00±0,66 | 1,00 | 0,63-1,58 |
| J600 | ET | 29,44±0,15 | 20,18±0,00 | 9,26±0,15 | 0,41±0,15 | 0,75 | 0,68-0,84 |
| J602 | ET | 27,65±0,00 | 19,00±0,24 | 8,65±0,24 | -0,20±0,24 | 1,15 | 0,97-1,36 |
| J621 | PP | 29,52±0,19 | 21,16±0,21 | 8,36±0,28 | -0,49±0,28 | 1,40 | 1,16-1,71 |
| J622 | KIM | 28,94±0,13 | 19,68±0,01 | 9,26±0,13 | 0,41±0,13 | 0,75 | 0,69-0,82 |
| J623 | ET | 29,76±0,15 | 21,27±0,60 | 8,49±0,62 | -0,36±0,62 | 1,28 | 0,84-1,97 |
| J624 | ET | 31,08±0,01 | 22,43±0,13 | 8,65±0,13 | -0,20±0,13 | 1,15 | 1,05-1,26 |
| J626 | ET | 29,53±0,05 | 21,03±0,10 | 8,50±0,11 | -0,35±0,11 | 1,27 | 1,18-1,38 |
| J632 | ET | 30,35±0,09 | 21,91±0,09 | 8,44±0,13 | -0,41±0,13 | 1,33 | 1,21-1,45 |
| J634 | ET | 30,04±0,12 | 21,18±0,08 | 8,86±0,14 | 0,01±0,14 | 0,99 | 0,90-1,09 |
| J637 | ET | 29,18±0,14 | 19,33±0,08 | 9,85±0,16 | 1,00±0,16 | 0,50 | 0,45-0,56 |
| J643 | ET | 28,37±0,13 | 18,96±0,16 | 9,41±0,21 | 0,56±0,21 | 0,68 | 0,59-0,78 |
| J645 | ET | 30,21±0,01 | 20,62±0,11 | 9,59±0,11 | 0,74±0,11 | 0,60 | 0,55-0,65 |
| J646 | ET | 30,10±0,06 | 20,77±0,08 | 9,33±0,10 | 0,48±0,10 | 0,72 | 0,67-0,77 |
| J655 | ET | 31,33±0,26 | 23,08±0,04 | 8,25±0,26 | -0,6±0,26 | 1,52 | 1,27-1,82 |
| J656 | ET | 30,76±0,11 | 22,00±0,04 | 8,76±0,12 | -0,09±0,12 | 1,06 | 0,98-1,16 |
| J657 | ET | 34,34±0,37 | 24,63±0,21 | 9,71±0,43 | 0,86±0,43 | 0,55 | 0,41-0,74 |
| J660 | PP | 32,81±0,29 | 22,76±0,21 | 10,05±0,36 | 1,2±0,36 | 0,44 | 0,34-0,56 |
| J662 | ET | 30,88±0,32 | 21,43±0,05 | 9,45±0,32 | 0,6±0,32 | 0,66 | 0,53-0,82 |
| J666 | ET | 30,22±0,07 | 20,70±0,02 | 9,52±0,07 | 0,67±0,07 | 0,63 | 0,60-0,66 |
| J667 | PP | 32,44±0,06 | 24,30±0,12 | 8,14±0,13 | -0,71±0,13 | 1,64 | 1,49-1,79 |
| J669 | PP | 30,08±0,13 | 21,24±0,18 | 8,84±0,22 | -0,01±0,22 | 1,01 | 0,86-1,17 |
| J670 | ET | 28,04±0,07 | 19,10±0,09 | 8,94±0,11 | 0,09±0,11 | 0,94 | 0,87-1,01 |
| J671 | ET | 33,00±0,21 | 24,29±0,04 | 8,71±0,21 | -0,14±0,21 | 1,10 | 0,95-1,27 |

| | | | | | | | |
|------|----|------------|-------------|-----------|------------|------|-----------|
| J672 | ET | 33,28±0,25 | 23,74±0,002 | 9,54±0,25 | 0,69±0,25 | 0,62 | 0,52-0,74 |
| J691 | ET | 35,87±0,63 | 27,10±0,04 | 8,77±0,63 | -0,08±0,63 | 1,06 | 0,68-1,64 |
| J693 | ET | 34,29±0,08 | 24,93±0,05 | 9,36±0,09 | 0,51±0,09 | 0,70 | 0,66-0,75 |
| J705 | PP | 32,91±0,11 | 24,53±0,09 | 8,38±0,14 | -0,47±0,14 | 1,39 | 1,26-1,53 |
| J707 | ET | 31,58±0,09 | 22,16±0,12 | 9,42±0,15 | 0,57±0,15 | 0,67 | 0,61-0,75 |
| J740 | ET | 28,63±0,08 | 21,43±0,15 | 7,2±0,17 | -1,65±0,17 | 3,14 | 2,79-3,53 |
| J741 | ET | 29,77±0,06 | 22,58±0,01 | 7,19±0,06 | -1,66±0,06 | 3,16 | 3,03-3,29 |
| J749 | ET | 32,50±0,01 | 24,18±0,03 | 8,32±0,03 | -0,53±0,03 | 1,44 | 1,41-1,47 |
| J755 | ET | 31,86±0,05 | 22,82±0,15 | 9,04±0,16 | 0,19±0,16 | 0,88 | 0,78-0,98 |
| J758 | ET | 28,76±0,06 | 20,59±0,09 | 8,17±0,11 | -0,68±0,11 | 1,60 | 1,48-1,73 |

Dobljeni rezultati izračuna relativne genske ekspresije za skupino 32 preiskovancev kažejo, da je izražanje gena *PTPN6* povečano pri 1 (4 %) bolniku z ET, pri katerem smo hkrati določili tudi *JAK2* mutacijo, ter zmanjšano pri 9 (33 %) bolnikih z ET (od tega 4 pozitivni za *JAK2* mutacijo) in 1 (10 %) bolniku s PP. Izražanje gena *PTPN11* je bilo povečano pri 3 (11 %) bolnikih z ET (od tega 2 pozitivna za *JAK2* mutacijo) in 1 (10 %) bolniku s PP ter zmanjšano pri 4 (15 %) bolnikih z ET (od tega 1 s prisotno *JAK2* mutacijo) in 1 (10 %) bolniku s PP. Pri vseh bolnikih s PP smo določili tudi *JAK2* mutacijo.

Podrobnejšo analizo rezultatov poskusa prikazuje preglednica XXXVI.

Preglednica XXXVI: Značilnosti bolnikov

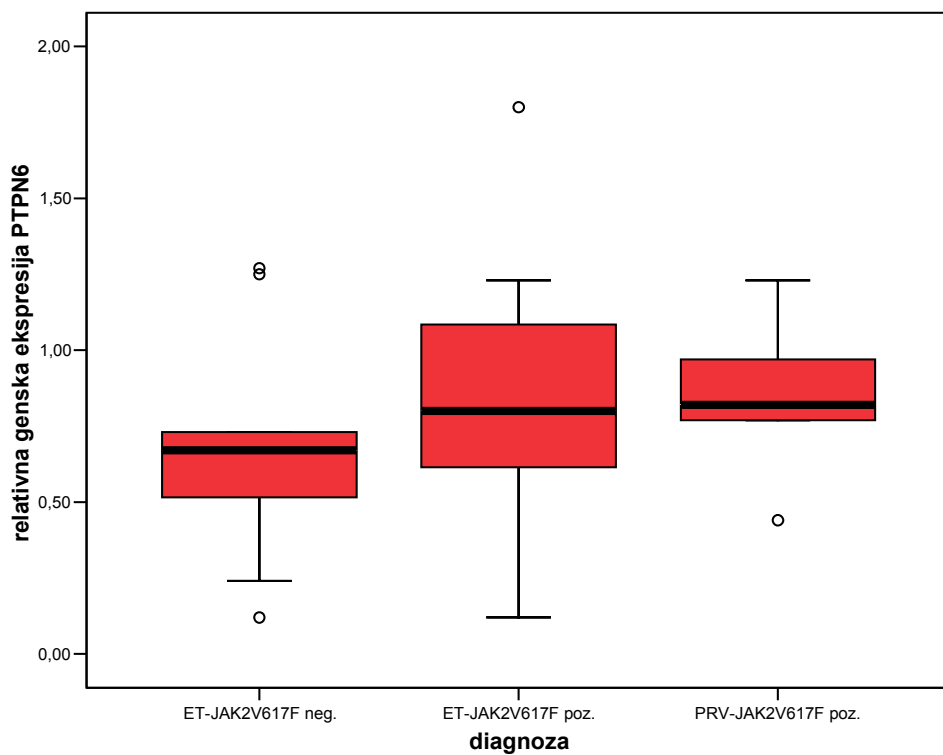
| Značilnost | Število bolnikov ali mediana oz. povprečna vrednost |
|--|---|
| Bolniki z ET | 27 |
| Število bolnikov s prisotno <i>JAK2</i> mutacijo (%) | 16 (59 %) |
| Povprečje odstotka mutiranega <i>JAK2</i> alela | 27,9 % |
| Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 1 (6 %) |
| Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 4 (25 %) |
| Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN6</i> | 0,80 |
| Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 2 (13 %) |

| | | |
|--|---|-----------|
| | Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 1 (6 %) |
| | Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN11</i> | 1,03 |
| Število bolnikov brez <i>JAK2</i> mutacije (%) | | 11 (41 %) |
| | Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 0 (0 %) |
| | Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 5 (45 %) |
| | Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN6</i> | 0,67 |
| | Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 1 (9 %) |
| | Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 3 (27%) |
| | Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN11</i> | 0,94 |
| Bolniki s PP | | 5 |
| Število bolnikov s prisotno <i>JAK2</i> mutacijo (%) | | 5 (100 %) |
| | Povprečje odstotka mutiranega <i>JAK2</i> alela | 80,3 % |
| | Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 0 (0 %) |
| | Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN6</i> | 1 (20 %) |
| | Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN6</i> | 0,82 |
| | Povečana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 1 (20 %) |
| | Zmanjšana relativna genska ekspresija <i>PTPN11</i> | 1 (20 %) |
| | Mediana relativne genske ekspresije <i>PTPN11</i> | 1,39 |

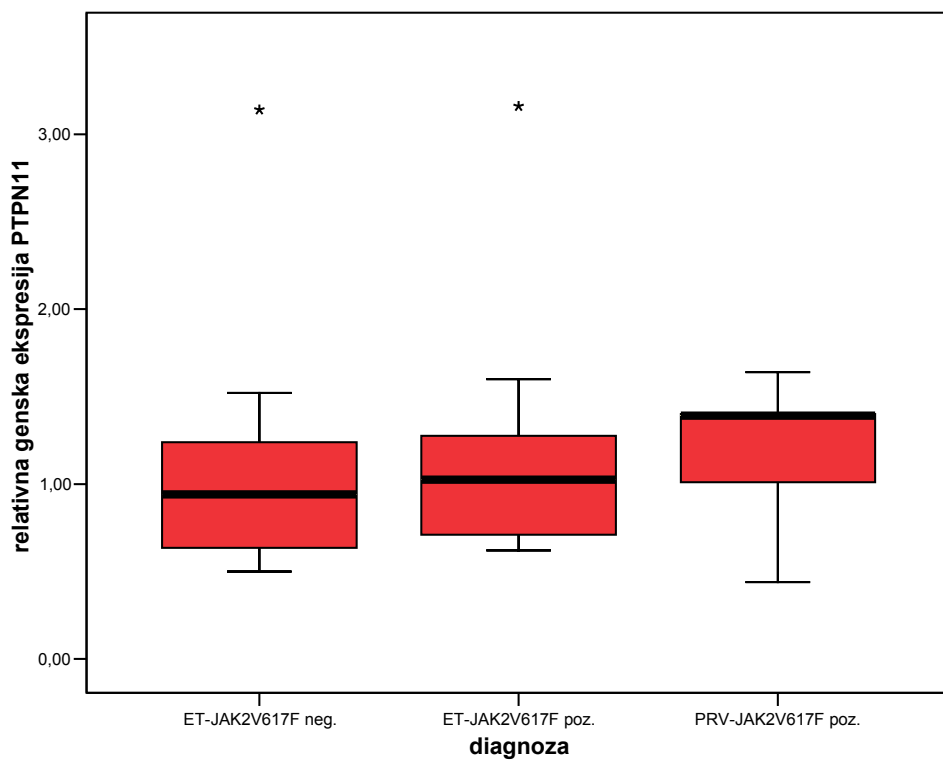
Mediana vrednosti relativne genske ekspresije *PTPN6* za bolnike z ET in prisotno *JAK2* mutacijo je bila 0,80, če mutacija ni bila prisotna pa 0,67. Pri bolnikih s PP je bila ta vrednost 0,82. Mediana vrednosti relativne genske ekspresije *PTPN11* pri bolnikih z ET in prisotno *JAK2* mutacijo je bila 1,03, če mutacija ni bila prisotna pa 0,94. Pri bolnikih s PP je bila ta vrednost nekoliko višja, in sicer 1,39.

Grafa 8 in 9 prikazujeta naraščanje mediane vrednosti relativne genske ekspresije za *PTPN6* in *PTPN11* začenši pri bolnikih z ET, pri katerih mutacije *JAK2V617F* nismo detektirali, sledijo bolniki z ET in prisotno mutacijo, najvišjo vrednost mediane, pa imajo v obeh primerih bolniki s PP.

Graf 8: Mediana vrednosti relativne genske ekspresije za *PTPN6*



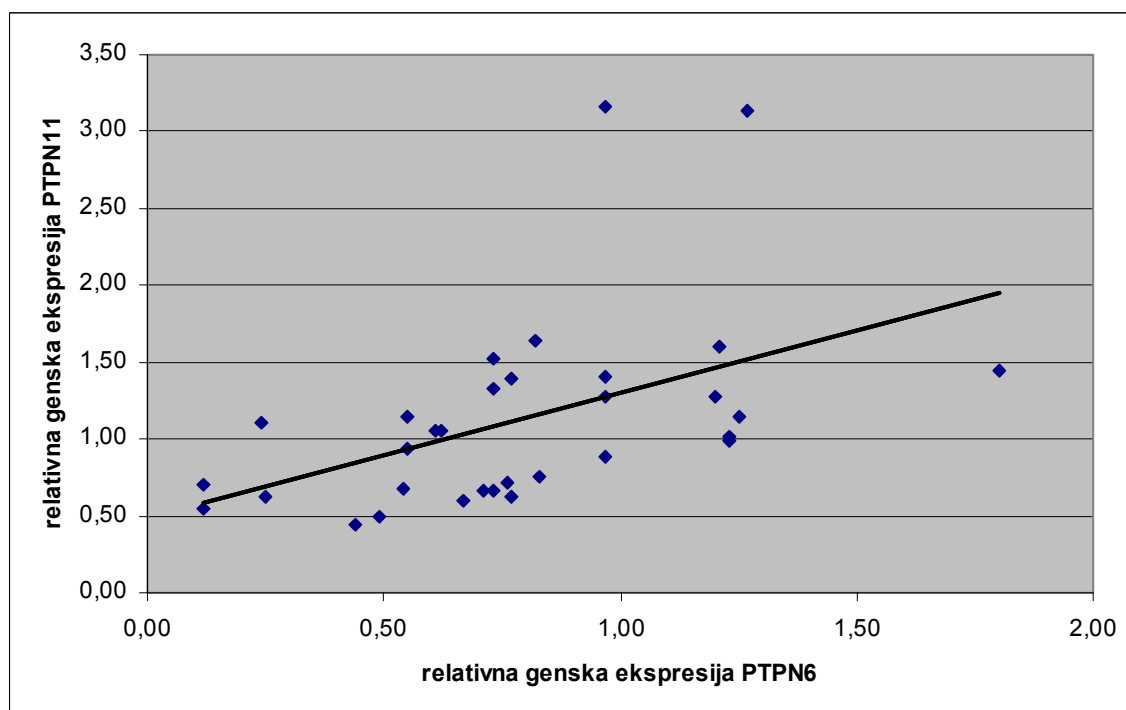
Graf 9: Mediana vrednosti relativne genske ekspresije *PTPN11*



Z neparametričnimi Mann-Whitney-evim U testom statistično pomembnih razlik v relativni ekspresiji obeh genov pri omenjenih treh skupinah bolnikov nismo zaznali. Prav tako ne obstaja razlika v relativni genski ekspresiji *PTPN6* in *PTPN11* med *JAK2V617F* pozitivnimi in negativnimi bolniki.

Korelacija relativne genske ekspresije obeh genov s parametri krvne slike in odstotkom *JAK2V617F* alela ni dala statistično pomembnih rezultatov. Smo pa ugotovili, da obstaja pozitivna povezava med relativno gensko ekspresijo *PTPN6* in *PTPN11* (Spearman-ov korelacijski koeficient = 0,610, $p < 0,001$), kar prikazuje graf 10.

Graf 10: Medsebojna odvisnost relativnih genskih ekspresij *PTPN6* in *PTPN11*



5 RAZPRAVA

Točkovna mutacija v genu *JAK2*, ki nosi zapis za tirozinsko kinazo, je po navedbah iz literature prisotna pri 65-97 % bolnikov s PP, 25-57 % bolnikov z ET in pri 50 % bolnikov s KIM. Razponi vrednosti so posledica uporabe različnih diagnostičnih kriterijev za opredelitev bolezni in občutljivosti testa, s katerim mutacijo zaznamo (6).

Primerjava rezultatov ugotavljanja mutacije *JAK2V617F* na izbrani skupini 110 bolnikov s PP, ET in KIM (diagnoza postavljena po kriterijih SZO), s tremi različnimi načini verižne reakcije s polimerazo, potrjuje nekoliko večjo občutljivost RQ-PCR metode v primerjavi s klasičnim alelnim specifičnim PCR. S to metodo smo namreč zaznali prisotnost mutacije tudi pri treh bolnikih, ki so bili sicer *JAK2V617F* negativni pri analizi z že vpeljanim načinom alelnega specifičnega PCR.

Največjo občutljivost ugotavljanja *JAK2V617F* smo dosegli z RQ-PCR, ko smo uporabili reagenčni komplet JAK2 MutaQuant™ Kit. S primerjavo umeritvenih krivulj, ki smo jih pripravili na podlagi meritev standardov z znanim številom kopij DNA z *JAK2V617F* oziroma nemutiranim alelom smo preverili tudi ponovljivost rezultatov omenjenega načina detekcije. Visok regresijski koeficient ($R^2 = 0,99$ ali več) zagotavlja točno določanje deleža *JAK2V617F* alela v preiskovanih vzorcih. Zaradi visoke občutljivosti in ponovljivosti rezultatov pridobljenih s kompletom JAK2 MutaQuant™ Kit, smo le-tega uporabili tudi za nadaljnje določanje deleža *JAK2V617F* alela pri nezdravljenih bolnikih s PP, ET in KIM.

Vzorec DNA bolnika, pri katerem mutacije nismo ugotovili ob uporabi reagenčnega kompleta JAK2 MutaScreen™ Kit, medtem ko sta dali drugi dve metodi močno pozitiven rezultat, je potrebno nadalje analizirati. Predvidevamo, da gre pri tem bolniku za prisotnost polimorfizma ali dodatne mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov oziroma sonde, kar bi onemogočilo pomnoževanje želenega odseka DNA ali porast fluorescence med PCR reakcijo.

S kompletom JAK2 MutaQuant™ Kit smo v našem vzorcu preiskovancev *JAK2V617F* mutacijo ugotovili pri 53 (61 %) bolnikih z ET, 18 (100 %) bolnikih s PP in 5 (100 %) bolnikih s KIM. Vrednosti se ujemajo z objavljenimi podatki iz literature (3, 6). Odstopanje je bilo prisotno le pri bolnikih s KIM, kjer smo našli mutacijo pri vseh

bolnikih, medtem ko je opisana v literaturi pri približno 50 % bolnikov. Dobljeno vrednost zaradi zelo malega vzorca bolnikov (5 bolnikov) težko razložimo. Prisotnost mutacije pri KIM je povezana z večjimi vrednostmi koncentracije hemoglobina in manjšim številom trombocitov (19). Možno je, da se zdravnik odloča za določanje mutacije pri tistih bolnikih s KIM, ki imajo višje vrednosti koncentracije hemoglobina in ne povsem jasno diagnozo. Določanje pri teh bolnikih bi imelo za posledico večji delež mutacije *JAK2V617F* pri pregledanem vzorcu bolnikov.

Preverili smo tudi, če obstaja med bolniki s KMPB razlika v deležu mutiranega alela. Povprečni delež mutiranega alela je znašal 25 % za bolnike z ET, 47 % za bolnike s PP in 85 % za bolnike s KIM. Le razlika med ET in KIM je bila statistično pomembna ($p < 0.001$). Statističnega pomena med drugimi skupinami najverjetneje nismo dosegli zaradi majhnega števila bolnikov. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da delež mutiranega alela verjetno vpliva na fenotip bolezni. Prav tako smo ugotovili statistično pomembno ($p < 0.001$) korelacijo med odstotkom mutiranega alela in številom levkocitov. Podobna korelacija se je sicer nakazovala tudi za število trombocitov in koncentracijo hemoglobina, vendar ni bila statistično pomembna. Pri obdelavi podatkov smo obravnavali samo tiste bolnike s prisotno mutacijo, ki se niso zdravili. Bolniki z večjim številom trombocitov in večjimi vrednostmi hemoglobina so pogosto zdravljeni. Tako je bilo v izbranem vzorcu zdravljenih 67 % bolnikov s PP in 25 % bolnikov z ET in so imeli posledično normalno vrednost koncentracije hemoglobina ter manjše vrednosti števila trombocitov. S tem smo za obdelavo podatkov izgubili večino bolnikov s huje potekajočo boleznijo in večjo koncentracijo hemoglobina oziroma večjim številom trombocitov. Omenjena razlaga je verjetno razlog zakaj nismo dosegli statističnega pomena za korelacijo odstotka mutiranega alela z večjo koncentracijo hemoglobina in manjšim številom trombocitov. Dobljeni rezultati so potrdili izsledke iz literature (12-14).

Ker odstotek mutiranega alela *JAK2V617F* sovпада z večjimi vrednostmi levkocitov (naši rezultati), manjšim številom trombocitov, večjimi vrednostmi hemoglobina (podatki iz literature) in posledično tudi klinično diagnozo, se odpira možnost, da KMPB predstavlja enovito bolezen z različnim kliničnim fenotipom. Ob majhnem deležu mutiranega alela se bolezen izrazi kot ET, medtem ko se pri večjem deležu mutiranega alela izrazi kot PP ali KIM. Podobno razliko opazimo med bolniki z ET in prisotno oziroma odsotno mutacijo v genu *JAK2*. Tako imajo bolniki s prisotno mutacijo večje vrednosti hemoglobina in manjše

število trombocitov (14). Pri bolnikih z odsotno mutacijo *JAK2V617F* je verjetno prisotna druga mutacija, ki povzroči klonsko rast celic. V naravnem poteku KMPB bolezní tako obstaja zaenkrat nepoznana mutacija, ki povzroči nekontrolirano rast celic. Ob pojavu novih mutacij, vključno s poznano mutacijo *JAK2V617F*, pride do značilnega fenotipa bolezní. Opisan stopenjski razvoj KMPB sovпада z uveljavljeno tezo o nastanku rakastih bolezní.

Obstajajo podatki o pomenu mutacije *JAK2V617F* za prognozo bolezní. Ker naša raziskava ni bila prospektivna, pač pa presečna, na ta problem ne moremo odgovoriti. Prav tako je število zapletov pri KMPB dokaj majhno, tako da bi za dosego statističnega pomena potrebovali znatno večjo skupino opazovanih bolnikov. Pomen kvantitativne določitve mutacije *JAK2V617F* obstaja tudi v sledenju bolezní in učinka zdravljenja. Tako tekom zdravljenja pri bolnikih s PP pride do manjšanja deleža mutiranega alela (20), pri majhnem številu bolnikov pa so ugotovili celo popolno molekularno remisijo bolezní z odsotnostjo mutiranega alela tudi po prekinitvi zdravljenja (14). Tako se odpira možnost sledenju bolezní, podobno kot je to možno pri bolnikih s KML.

JAK2V617 mutacijo ugotovimo pri praktično 100 % bolnikov s PP, kar dokazuje tudi naša raziskava. Ker pa smo imeli v Specializiranem hematološkem laboratoriju na Polikliniki shranjen tudi vzorec bolnika z diagnosticirano PP in odsotno *JAK2V617F* mutacijo smo neodvisno od omenjene skupine preiskovancev še enkrat analizirali tudi njegovo DNA. Na podlagi poročil o novo odkritih mutacijah v eksonu 12 *JAK2* gena pri nekaterih bolnikih s PP in idiopatsko eritrocitozo (9,10), smo na podlagi navedb v literaturi izbrali začetne oligonukleotide specifične za štiri najpogostejše mutacije v eksonu 12 *JAK2* gena. Z alelno specifičnim PCR in elektroforezno ločitvijo dobljenih PCR pridelkov smo določili prisotnost N542-E543del mutacije in tako potrdili pomen določanja *JAK2* mutacije v eksonu 12 pri diagnostiki PP.

V drugem delu naše raziskave smo na skupini 32 bolnikov ugotavljali pomen spremenjene ekspresije *PTPN6* in *PTPN11* genov, ki kodirata nereceptorski tirozinski fosfatazi SHP-1 in SHP-2 pri ET in PP.

Relativno kvantifikacijo genskega izražanja smo izvedli po primerjalni $\Delta\Delta C_t$ metodi, ki nam omogoča izračun količine tarčnega gena normalizirane na endogeno kontrolo in relativno glede na kalibrator. Tarčni gen sta predstavljal(a) gena *PTPN6* oziroma *PTPN11*,

referenčni gen $\beta 2$ mikroglobulin (*B2M*), kalibrator pa povprečje vrednosti razlik $Ct(PTPN)-Ct(B2M)$ za vzorce zdravih prostovoljcev. S predhodno izvedbo validacijskega poskusa smo najprej dokazali, da sta učinkovitosti pomnoževanja za tarčni in referenčni gen približno enaki, določitev učinkovitosti pomnoževanja, ki je bila blizu 1, pa nam je omogočila izračun relativne genske ekspresije po poenostavljeni enačbi $2^{-\Delta\Delta Ct}$, kjer je $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{t,q} - \Delta Ct_{t,cb}$, pri čemer sta $\Delta Ct_{t,q}$ in $\Delta Ct_{t,cb}$ razliki v Ct za tarčni in referenčni gen pri vzorcu (q) oziroma kalibratorju (cb)

Ker SHP-1 v splošnem smatramo za negativni regulator celične proliferacije, katere zmanjšano izražanje pri človeku opazimo pri različnih vrstah levkemij in limfomov (16), smo tudi pri analizi izbranih bolnikov pričakovali podoben rezultat. Mediana vrednosti relativne genske ekspresije *PTPN6* je bila dejansko zmanjšana in je znašala od 0,67 pri bolnikih z ET in odsotno mutacijo *JAK2V617F* do 0,80 pri bolnikih z ET in 0,82 pri bolnikih s PP, pri katerih je bila mutacija prisotna.

Nasprotno je bila mediana relativne genske ekspresije *PTPN11*, ki kodira SHP-2, skoraj normalna pri bolnikih z ET in je znašala 0,98 pri odsotni *JAK2* mutaciji in 1,03 če je bila mutacija *JAK2V617F* prisotna. Njena vrednost je bila torej povečana le pri bolnikih s PP in prisotno mutacijo in je znašala 1,39. Povečana relativna genska ekspresija *PTPN11* je skladna s številnimi raziskavami, ki poročajo o visoki stopnji ekspresije SHP-2 v hematopoetskih celicah in njeni vpletenosti v signalizacijo sproženo z hematopoetskimi rastnimi dejavniki, pri kateri naj bi omenjena fosfataza delovala kot pozitivni regulator celične proliferacije in diferenciacije (17, 18).

Statistično pomembnih razlik v relativni genski ekspresiji pri bolnikih z *JAK2V617F* pozitivno in negativno ET ter PP nismo dokazali. Prav tako nismo našli statistično pomembne korelacije genskega izražanja *PTPN6* in *PTPN11* s parametri krvne slike in deležem *JAK2V617F* alela.

Nekoliko pa preseneča dejstvo, da obstaja pozitivna korelacija (Spearman-ov koeficient korelacije = 0,610, $p < 0,001$) med izražanjem obeh genov, kar pomeni, da se ob povečani ekspresiji *PTPN6* v večji meri izraža tudi *PTPN11* oziroma obratno. Naklon premice na grafu 10 kaže na nesorazmerne spremembe izražanja obeh genov. Ker je razmerje relativnih genskih ekspresij *PTPN11* in *PTPN6* večje od 1 (1,23), to pomeni, da je pri nizkih vrednostih izražanja *PTPN6*, ekspresija *PTPN11* praktično normalna (bolniki z ET),

medtem ko je pri povečanem izražanju *PTPN11*, ekspresija *PTPN6* bližje normalni vrednosti (bolniki s PP). Iz navedenih razmerij bi lahko sklepali na večji vpliv ene izmed fosfataz na spremenjeno celično signalizacijo. Naši podatki nakazujejo na morebiten pomembnejši vpliv zmanjšane izražanja SHP-1 pri ET in povečanega izražanja SHP-2 pri PP. Ker smo pri analizi uporabili zelo majhen vzorec bolnikov, so za potrditev te domneve potrebne nadaljnje raziskave.

Odsotnost statistično pomembnih povezav z drugimi kliničnimi znaki bolezni nam kljub nakazani zmanjšani ekspresiji *PTPN6* in povečani ekspresiji *PTPN11* onemogoča, da bi na osnovi te preliminarne raziskave na manjšem vzorcu bolnikov lahko sklepali na pomemben vpliv celičnih fosfataz SHP-1 in SHP-2 na razvoj ET in PP. Za podrobnejše analize bi bila potrebna vključitev večjega števila preiskovancev, kar bi omogočilo natančnejšo statistično obdelavo dobljenih rezultatov izražanja obeh genov.

6 ZAKLJUČKI

S primerjavo treh različnih načinov verižne reakcije s polimerazo, smo potrdili največjo občutljivost določanja *JAK2V617F* mutacije pri bolnikih s PP, ET in KIM z RQ-PCR in določitvijo deleža mutiranega alela iz umeritvene krivulje (komplet reagentov *JAK2 MutaQuant™ Kit*, Ipsogen). S tem smo v Specializiran hematološki laboratorij Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana uvedli kvantitativno določanje omenjene mutacije.

Deleži bolnikov s PP, ET in KIM, pri katerih smo mutacijo *JAK2V617F* ugotovili, se ujemajo s podatki v literaturi. Prav tako smo potrdili različen delež mutacije pri bolnikih z ET, PP in KIM in vpliv mutacije na krvno sliko. Možno je, da gre pri KMPB za enovito bolezen z različnimi kliničnimi fenotipi, ki so posledica različnega deleža mutiranega alela *JAK2V617F*. Metoda ob nezadostnih podatkih o kliničnem pomenu sledenja boleznim še ni uporabna za vsakdanje klinično spremljanje bolnikov s KMPB. Potrebne bodo dodatne prospektivne raziskave, ki bodo potrdile pomen sledenja bolnikov s to metodo.

Z določitvijo mutacije v eksonu 12 *JAK2* gena pri bolniku s PP in odsotno *JAK2V617F* mutacijo smo potrdili pomen določanja teh mutacij pri ugotavljanju PP. Zaradi majhnega deleža granulocitov s prisotno mutacijo v eksonu 12, smo le-to lahko zaznali le z nekompetitivnim alelno specifičnim PCR, kar narekuje uporabo bolj občutljivih metod detekcije pri določanju teh mutacij.

Vpeljali smo tudi primerjalno $\Delta\Delta C_t$ metodo, ki omogoča relativno kvantifikacijo genskega izražanja. S preliminarno raziskavo na manjši skupini bolnikov z ET in PP smo zaznali manjše spremembe v ekspresiji SHP-1 in SHP-2, ki pa ne kažejo statističnega pomena. Ugotovili smo povezavo v izražanju obeh fosfataz, ne pa tudi njenega vpliva na krvno sliko.

Z našo študijo pomena SHP-1 in SHP-2 pri nastanku PP in ET nismo dokazali. Za nadaljnje ugotavljanje vloge fosfataz pri KMPB bodo potrebne poglobljene raziskave in analiza večjega števila bolnikov, kar bo omogočilo tudi lažjo statistično obdelavo dobljenih rezultatov.

7 LITERATURA

1. Modic M: Kronične mieloproliferativne bolezni; V Poglavje 12: Bolezni krvi in krvotvornih organov (urednik Andolšek D.), Interna medicina, glavni urednik Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D, 3. izdaja, Littera Picta, d.o.o., 2005: 1240-1249.
2. Tefferi A: JAK2 mutations in polycythemia vera- Molecular mechanisms and clinical applications, *N Engl J Med* 2007; 356:444.
3. Kaushansky K: On the molecular origins of chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense, *Hematology* 2005: 533-537.
4. Kralovics R, Teo S, Tichelli A: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352:1779-90.
5. Campbell PJ, Green AR: The myeloproliferative disorders, *N Engl J Med* 2006; 355:2458.
6. Vainchenker W, Constantinescu SN: A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology* 2005: 195-200.
7. Pahl HL: Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 3395-3401.
8. Vainchenker W, Delhommeau F, Villeval J-L: Molecular pathogenesis of the myeloproliferative diseases. *Hematology Education* 2007; 1:239-246.
9. Scott LM, Scott MA, Stratton MR, Erber WN, Harrison CN, Gilliland DG, Green AR: JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-68.
10. Cassola M: Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92(12).
11. Levine RL, Warnig G: Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology* 2006; 233-239.

12. Harrison CN: Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology* 2005; 409-415.
13. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, Ponziani V, Tozzi L, Pieri L, Santini V, Bosi A, Vannucchi AM: Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008; 93(1):41-48.
14. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB: The JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis- impact on disease phenotype. *Eur j Hematol.* 2007; 79: 508-15.
15. Tefferi A, Vardiman JW: Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organisation criteria and point of care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008, 22; 14-22.
16. Paling NRD, Welham MJ: Role of protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling. *Biochem. J.* 2002, 368: 885-894.
17. Xu R, Yu Y, Zheng S, Zhao X, Dong Q, He Z, Liang Y, Lu Q, Fang Y, Gan X, Xu X, Zhang S, Dong Q, Zhang X, Feng G: Overexpression of Shp2 tyrosine phosphatase is implicated in leukemogenesis in adult human leukemia. *Blood* 2005, 106:3142-3149.
18. Ren Y, Chen Z, Chen L, Woods NT, Reuther GW, Cheng JQ, Wang H, Wu J: Shp2E76K mutant confers cytokine-independent survival of TF-1 myeloid cells by up-regulating Bcl-XL.
19. Rudzki Z, Sacha T, Stój A, Czekalska S, Wójcik M, Skotnicki AB, Grabowska B, Zduńczyk A, Okoń K, Stachura J: The gain-of-function JAK2V617F mutation shifts the phenotype of essential thrombocythemia and chronic idiopathic myelofibrosis to more "erythremic" and less "thrombocytopenic": a molecular, histologic, and clinical study. *Int J Hematol.* 2007; 86:130-6.
20. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Menot ML, Massonnet G, Dutel JL, Ghomari K, Rousselot P, Grange MJ, Chait Y, Vainchenker W, Parquet N, Abdelkader-Aljasseem L, Bernard JF, Rain JD, Chevret S, Chomienne C,

Fenaux P: High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood*. 2006; 2037-40.

21. JAK2 MutaQuant™ Kit. Instructions for use, Ipsogen Cancer Profiler, Version 02, November 2007.

22. JAK2 MutaScreen™ Kit & Reference Scale. Instructions for use, Ipsogen Cancer Profiler, Version 02 July 2007.

23. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148..

24. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.

25. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench A, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.

26. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, and Cross: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162-2168.

27. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, David Zahrieh, Stephanie Lee, Chagnon P, Gilliland DG, and Busque L: X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in

PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107:4139-4141.

28. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science, 2002; 299-347:469-546

29. Pajič T, Černelč P: Kronična Mieloična levkemija in molekularno genetični način ugotavljanja bolezni. *Zdravstveni vestnik* 1998;57:69-72

30. User Bulletin #2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 12/1997 (updated 10/2001)