

# Mjerenje količine mutiranog alela V617F gena JAK2 u tijeku liječenja kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi

---

Veletić, Ivo

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:234191>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivo Veletić**

**Mjerenje količine mutiranog alela V617F  
gena *JAK2* u tijeku liječenja kroničnih  
mijeloproliferativnih neoplazmi**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2014.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

## POPIS KRATICA

<b>AB</b>	opterećenje alelom (prema engl. <i>allele burden</i> )
<b>b</b>	odrezak na osi y (prema engl. <i>Y-intercept</i> )
<b>BCS</b>	Budd-Chiari sindrom
<b>C<sub>t</sub></b>	prag broja ciklusa (prema engl. <i>cycle threshold</i> )
<b>DNA</b>	deosiribonukleinska kiselina (prema engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ELN</b>	European LeukemiaNet
<b>ET</b>	esencijalna trombocitemija
<b>FAM</b>	karboksifluorescein
<b>HU</b>	hidroksiurea
<b>IFN</b>	interferon
<b>JAK</b>	Janus kinaza
<b>KML</b>	kronična mijeloidna leukemija
<b>KS</b>	koštana srž
<b>m</b>	nagib pravca (prema engl. <i>slope</i> )
<b>MAPK</b>	mitogenom aktivirana proteinska kinaza
<b>MPN</b>	mijeloproliferativne neoplazme
<b>pb</b>	parovi baza
<b>PCR</b>	umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom (prema engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PI3K</b>	fosfoinozimid 3-kinaza (prema engl. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> )
<b>PMF</b>	primarna mijelofibroza
<b>PTK</b>	protein tirozin kinaza
<b>PV</b>	policitemija vera
<b>qPCR</b>	kvantitativni PCR u realnom vremenu (prema engl. <i>quantitative real time PCR</i> )
<b>RX</b>	ruksolitinib
<b>sMF</b>	sekundarna mijelofibroza
<b>STAT</b>	prijenosnik signala i aktivator transkripcije (prema engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
<b>SVT</b>	splanhnička venska tromboza
<b>SZO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija
<b>TAMRA</b>	tetrametilrodamin
<b>TVP</b>	tromboza vene porte
<b>v.</b>	vena
<b>V617F</b>	mutacija 617. kodona koja dovodi do zamjene valina fenilalaninom
<b>WT</b>	divlji tip (prema engl. <i>wild type</i> )

# Sadržaj

1. Sažetak .....	I
2. Summary.....	II
3. Uvod.....	1
3.1. Mijeloproliferativne neoplazme .....	1
3.1.1. Definicija i klasifikacija .....	1
3.1.2. Epidemiologija .....	1
3.1.3. Etiologija i patogeneza.....	1
3.1.4. Klinička slika .....	2
3.1.5. Vaskularne komplikacije .....	4
3.1.6. Liječenje.....	4
3.2. Mutacija V617F gena <i>JAK2</i> .....	6
3.2.1. Uloga <i>JAK2</i> u mijelopoezi.....	6
3.2.2. Biologija mutacije V617F .....	6
3.2.3. Fenotipska obilježja .....	7
3.2.4. Terapijske implikacije.....	8
3.2.5. Dijagnostička važnost mutacije.....	9
3.3. Kvantifikacija mutiranog alela .....	9
4. Hipoteza .....	10
5. Ciljevi rada .....	11
6. Ispitanici i metode .....	12
6.1. Ispitanici .....	12
6.2. Molekularne metode .....	12
6.2.1. Izolacija DNA .....	12
6.2.2. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR).....	12
6.2.3. Izračun opterećenja mutiranim alelom.....	13
7. Rezultati .....	14
8. Rasprava.....	16
9. Zaključci .....	17
10. Zahvale .....	18
11. Literatura .....	19
12. Životopis.....	25

# 1. Sažetak

## Mjerenje količine mutiranog alela V617F gena *JAK2* u tijeku liječenja kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi

Ivo Veletić

*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) klonalni su poremećaji krvotvorne matične stanice karakterizirani nereguliranom proliferacijom jedne ili više mijeloidnih loza. Klasične *BCR-ABL* negativne MPN obuhvaćaju policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET) i primarnu mijelofibrozu (PMF). Središnju ulogu u patogenezi ove skupine bolesti igra mutacija V617F gena *JAK2* (1849 G > T) koja se analizira u sklopu rutinske molekularne dijagnostike. Opterećenje alelom (AB) mjera je udijela mutiranog alela u uzorku, a povezana je s rizikom trombotičkih događaja, težinom fenotipa bolesti i preživljenjem. Kvantifikacija AB-a sve se više koristi za praćenje odgovora na terapiju, osobito novim lijekovima, te predviđanju ishoda liječenja. U ovo istraživanje bilo je uključeno 11 ispitanika koji su u razdoblju od 2006. do 2014. godine s dijagnozom MPN-a liječeni u KB Dubrava. AB je određen metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu pomoću pristupa koji je preporučen od strane European LeukemiaNet. Rezultati AB-a u vrijeme postavljanja dijagnoze iznose: 19,6% (PV), 14,4-66,0% (ET), 39,7-85,4% (PMF) i 48,4-68,0% (sekundarna mijelofibroza). Za kasnije kvantitativno praćenje bilo je dostupno 5 bolesnika, od kojih je kod jednog zamijećen trostruki pad AB-a u terapiji interferonom. Zaključno, kvantifikacija mutiranog *JAK2* alela adekvatan je pristup dijagnostici te je indicirana za praćenje tijeka liječenja bolesnika s MPN-om. Opterećenje alelom jedna je od determinanti kliničkog fenotipa.

**Ključne riječi:** mijeloproliferativna neoplazma, mutacija, *JAK2* V617F, kvantitativni PCR u realnom vremenu, opterećenje alelom

## 2. Summary

### Quantitative Measurement of Mutated V617F Allele of *JAK2* Gene in the Course of Treatment of Chronic Myeloproliferative Neoplasms

Ivo Veletić

*University of Zagreb School of Medicine*

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal disorders of the hematopoietic stem cells characterized by unregulated proliferation of one or several myeloid lineages. Classic *BCR-ABL* negative MPNs include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). A central role in pathogenesis of this group of diseases plays V617F mutation of *JAK2* gene (1849 G > T) which is analyzed as part of routine molecular diagnostics. Allele burden (AB) is a measure of proportion of mutated allele within the specimen, and has been correlated with the risk of thrombotic events, severity of the disease phenotype and survival. AB quantification is used to assess treatment response, especially following the use of new drugs, as well as to predict outcome of the treatment. Results show AB at the time of diagnosis as follows: 19,6% (PV), 14,4-66,0% (ET), 39,7-85,4% (PMF) and 48,4-68,0% (secondary myelofibrosis). Five subjects were available for later quantitative follow-up, one of which showed 3-fold decrease in AB following treatment with interferon. In conclusion, quantification of mutated *JAK2* allele is an adequate diagnostic approach indicated for monitoring the course of treatment of patients with MPN. Allele burden is a determinant of the clinical phenotype.

**Keywords:** myeloproliferative neoplasm, mutation, *JAK2* V617F, quantitative real-time PCR, allele burden

## **3. Uvod**

### **3.1. Mijeloproliferativne neoplazme**

#### **3.1.1. Definicija i klasifikacija**

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) klonalni su poremećaji krvotvorne matične stanice karakterizirani nereguliranom proliferacijom jedne ili više mijeloidnih loza (granulocitne, eritroidne, megakariocitne i mastocitne). Klasifikacija hematoloških malignosti Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u ovoj skupini razlikuje osam kliničko-patoloških podentiteta: kroničnu mijelogenu leukemiju (KML), policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET), primarnu mijelofibrozu (PMF), kroničnu neutrofilnu leukemiju, kroničnu eozinofilnu leukemiju koja nije drugačije specificirana, mastocitozu i neklasificiranu mijeloproliferativnu neoplazmu (Vardiman et al. 2008). Najčešće među njima – KML, PV, ET i PMF – u literaturi se nazivaju i “klasičnim MPN”, budući da su kao mijeloproliferativni poremećaji prepoznate još sredinom prošlog stoljeća (Tefferi 2008).

#### **3.1.2. Epidemiologija**

MPN su prvenstveno neoplazme odrasle dobi s vrhuncem pojavnosti između 40. i 80. godine života, premda su pojedinačni slučajevi KML-a i ET-a zabilježeni već u dječjoj dobi. Radi se o skupini relativno čestih hematoloških malignih bolesti s godišnjom incidencijom u Europi od 3-4 na 100.000 stanovnika i prevalencijom od približno 20 na 100.000 Europljana (Sant et al. 2010; Visser et al. 2012). Do danas identificirani čimbenici rizika povezani s razvojem neoplastične mijeloproliferacije jesu starija životna dob, muški spol i bijela rasa (Rollison et al. 2008). Dokazano prisustvo MPN-a kod srodnika u prvom koljenu povećava relativni rizik za obolijevanje za 5 do 7,5 puta (Landgren et al. 2008).

#### **3.1.3. Etiologija i patogeneza**

U podlozi većine kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi, s iznimkom rijetkih oblika kao što su atipična KML i obiteljska policitemija, nalazi se lezija jednog ili više gena koji kodiraju citoplazmatske ili receptorske protein tirozin kinaze (PTK). Riječ je o brojnoj porodici proteina koji su odgovorni za unutarstanični prijenos signala, a aktiviraju ih receptori hematopoetskih faktora i citokina (Verma et al. 2003). Do danas opisane lezije gena za PTK uključuju balansirane translokacije, delecije i točkaste mutacije koje uzrokuju konstitutivnu aktivaciju određene PTK (De Keersmaecker & Cools 2006). Mutirana kinaza imitira signalni put



normalne hematopoeze, što rezultira nereguliranom proliferacijom klon. U slučaju KML-a takva specifična genska lezija, *BCR-ABL1* fuzijski gen, udružena je s karakterističnom kliničkom, laboratorijskom i morfološkom slikom, zbog čega je važan dijagnostički kriterij. U slučaju ostalih, tzv. *BCR-ABL1* negativnih MPN-ova, genske lezije su potvrda neoplastične prirode mijeloidne proliferacije (Tefferi & Vardiman 2008). Do danas poznate lezije uključuju gene: *JAK2* (ekson 14 i ekson 12), *MPL* (ekson 10), *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *IKZF1*, *LNK* i *EZH2* (Tefferi 2010).

#### **3.1.4. Klinička slika**

Zajedničko obilježje svih podentiteta MPN-a je hipercelularnost koštane srži (KS) uz zadržano efektivno hematopoetsko sazrijevanje i povećan broj eritrocita, granulocita i/ili trombocita u perifernoj krvi (PK). Splenomegalija i hepatomegalija često se nalaze kod ovih se bolesnika kao posljedica sekvestracije krvnih stanica ili proliferacije abnormalnih stanica hematopoeze.

Za razliku od PV-a, čija je posebnost nalaz eritrocitoze, ET i PMF ne pokazuju nijednu jedinstvenu biološku niti kliničku karakteristiku. Trombocitoza, koja je glavno obilježje ET-a, nerijetko je prisutna i u sklopu PV-a i PMF-a. Splenomegaliju, koja je razmjerno čest fizikalni znak u sklopu PMF-a, nalazimo i u trećine bolesnika s PV-om i ET-om. Biopsija KS-a može razlučiti između pojedinih oblika MPN-a, no zbog osjetljivosti metode i subjektivne procjene, reproducibilnost takve analize nije apsolutna. Nalaz 10-19% blasta u KS označava ubranu fazu bolesti, dok je nalaz 20% i više blasta dovoljan za postavljanje dijagnoze blastične faze. Progresiju bolesti može nagovijestiti molekularna dijagnostika, klinički nalaz organomegalije, promjena hematograma, mijelofibroza i početak mijelodisplazije.

Među klasičnim MPN-ovima, PV i ET se odlikuju relativno indolentnim tijekom koji rijetko dovodi do značajnijeg skraćenja životnog vijeka – median preživljenja ovih bolesnika redovito iznosi više od 20 godina. Međutim, većina bolesnika s vremenom razvije neku od ozbiljnijih i potencijalno životno ugrožavajućih komplikacija među kojima najznačajnije mjesto zauzimaju tromboze i krvarenja. PMF, s druge strane, pokazuje teži klinički tijek i trajanje životnog vijeka tih bolesnika je znatno umanjeno. Svaka MPN ima potencijal da postupno progredira do zatajenja koštane srži koje nastaje kao posljedica mijelofibroze, mijelodisplazije ili prelaska u akutnu blastnu fazu (Campbell & Green 2006). Takva transformacija mijeloproliferativne neoplazme najčešće se javlja spontano kao dugoročna sekvela kronične faze bolesti, ali može nastati i i jatrogeno uslijed primjene nekih lijekova poput radioaktivnog fosfora ili alkilirajućih agensa (Bjorkholm et al. 2011). Relativno 5-godišnje preživljenje od

mijeloproliferativnih neoplazmi u Europi iznosi 62% (Visser et al. 2012). Uniformni dijagnostički kriteriji SZO-a za *BCR-ABL* negativne klasične MPN prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Dijagnostički kriteriji za *BCR-ABL* negativne klasične mijeloproliferativne neoplazme (MPN) (Tefferi & Vardiman 2008)

MPN	Kriteriji
Policitemija vera (PV)	<i>Potrebno ispuniti oba velika i 1 mali ili prvi veliki i 2 mala kriterija</i>
Veliki kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hemoglobin &gt; 18,5 g/dL (muškarci) ili 16,5 g/dL (žene), ili drugi dokaz povećanog volumena eritrocita</li> <li>2. Nalaz <i>JAK2</i> V617F ili druge funkcionalno slične mutacije</li> </ol>
Mali kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hipercelularnost KS uz panmijelozu i značajnu eritrocitnu, granulocitnu i megakariocitnu proliferaciju</li> <li>2. Serumski eritropoetin snižen ispod referentne vrijednosti</li> <li>3. <i>In vitro</i> rast endogene eritroidne kolonije</li> </ol>
Esencijalna trombocitemija (ET)	<i>Potrebno ispuniti sva 4 kriterija</i>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Broj trombocita <math>\geq 450 \times 10^9/L</math></li> <li>2. Proliferacija morfološki velikih i zrelih megakariocita u KS, bez značajnije granulocitne i eritrocitne proliferacije</li> <li>3. Neispunjeni kriteriji za PV, KML, MDS i dr. mijeloidne neoplazme</li> <li>4. Dokaz <i>JAK2</i> V617F ili drugog klonalnog biljega, ili u nedostatku isključenje reaktivne trombocitoze</li> </ol>
Primarna mijelofibroza (PMF)	<i>Potrebno ispuniti sva 3 velika i 2 mala kriterija</i>
Veliki kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proliferacija i atipija megakariocita u KS uz retikulinsku ili kolagenu fibrozu, ili nalaz prefibrozne celularne faze bolesti</li> <li>2. Neispunjeni kriteriji za PV, KML, MDS i dr. mijeloidne neoplazme</li> <li>3. Dokaz <i>JAK2</i> V617F ili drugog klonalnog biljega, ili u nedostatku isključenje sekundarne mijelofibroze</li> </ol>
Mali kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Leukoeritroblastozu</li> <li>2. Povišen serumski LDH</li> <li>3. Anemija</li> <li>4. Palpabilna splenomegalija</li> </ol>

### 3.1.5. Vaskularne komplikacije

Najznačanije komplikacije mijeloproliferativnih neoplazmi, ali i jedini neovisan čimbenik rizika za letalni ishod od ove skupine bolesti, predstavljaju splahnjičke venske tromboze (SVT) (Sekhar et al. 2013). SVT po definiciji uključuju parcijalnu ili kompletnu trombotičku opstrukciju jedne ili nekoliko glavnih vena splahnjičkog sliva: *v. portae* (TVP), *v. mesentericae* (TVM), *v. lienalis* (TVL) i hepatičke vene (Budd-Chiariev sindrom, BCS). Njihova prevalencija u općoj populaciji iznosi 1-2%, što se najvećim dijelom odnosi na TVP (Ageno et al. 2012). Isključe li se lokalni uzroci (ciroza i karcinom jetre), i do 40% svih SVT-a nastaje kao posljedica mijeloproliferacije (Smalberg et al. 2012). Glavni čimbenici rizika za razvoj tromboze kod ovih bolesnika jesu starija životna dob, trombotički incidenti u osobnoj anamnezi i povećani broj krvnih stanica (Carobbio et al. 2011), ali čini se da značajnu ulogu igraju i kardiovaskularni čimbenici rizika, uključujući hipertenziju, hiperlipidemiju, šećernu bolest i pušenje (Barbui et al. 2012).

### 3.1.6. Liječenje

Prije početka liječenja MPN-a važno je kritički odrediti rizik i očekivani ishod liječenja. Prema smjernicama European LeukemiaNet (ELN) (Barbui et al. 2011), ciljevi terapije bolesnika s PV-om i ET-om trebaju biti prevencija i kupiranje komplikacija bolesti, minimizacija rizika za razvoj akutne leukemije i sekundarne mijelofibroze te kontrola rizičnih stanja poput trudnoće i kirurških zahvata. Ciljevi liječenja PMF-a trebaju biti produljenje života, dok je izlječenje moguće postići alogenom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica. Ako takav ishod nije izgledan, cilj liječenja treba biti adekvatna palijativna njega orijentirana na simptome i očuvanje kvalitete života.

Temelj prevencije komplikacija mijeloproliferacije u prvom redu predstavlja prepoznavanje i liječenje kardiovaskularnih čimbenika rizika i promocija zdravog stila života. Važno mjesto u prevenciji trombotičkih incidenata ima aspirin u niskim dozama koji je indiciran kod svih bolesnika s PV-om, kao i kod bolesnika s ET-om koji su razvili mikrovaskularne poremećaje. Venepunkcija je metoda izbora u bolesnika s niskorizičnim PV-om uz ciljne vrijednosti hematokrita od ispod 45% (Marchioli et al. 2013). U visokorizičnih bolesnika s PV-om i ET-om (dob veća od 60 godina ili pozitivna anamneza tromboze) indicirana je citoreduktivna terapija. Citostatik prve linije je hidroksiurea (HU), dok su interferon (IFN)  $\alpha$  i anagrelid alternativni agensi rezervirani za pacijente kod kojih se razvila netolerancija ili rezistencija na HU. Pipobroman, busulfan i fosfor-32 primjenjuju se samo kod bolesnika s kratkim očekivanim životnim vijekom.

Rizik u PMF-u određuje se prema Međunarodnom sustavu prognostičkog bodovanja (IPSS, prema engl. *International Prognostic Scoring System*). Za liječenje anemije izazvane mijelofibrozom indicirana je primjena kortikosteroida, androgena, stimulatora eritropoeze i imunomodulatora, dok je HU lijek izbora za terapiju splenomegalije. Invazivne metode poput splenektomije ili alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica rezervirane su za bolesnike kod kojih farmakološki pristup nije polučio rezultate, za bolesnike s uznapredovalom bolešću (simptomi portalne hipertenzije, bolna splenomegalija, učestala potreba za transfuzijama) te za bolesnike kod kojih je median preživljenja niži od 5 godina.

Terapijske opcije kod SVT-a uključuju antikoagulaciju, trombolizu, perkutanu transluminalnu angioplastiku (PTA), transjugularni intrahepatički portosistemijski spoj (TIPS) i ortotopnu transplantaciju jetre (DeLeve et al. 2009). Trenutačne preporuke ELN-a za liječenje splahnhičkih tromboza koje se javljaju u sklopu MPN-a na prvo mjesto stavljaju primjenu niskomolekularnog heparina uz promptnu korekciju podležećih mijeloproliferacijom uzrokovanih poremećaja, na koje se nadovezuje doživotna primjena peroralnih antikoagulansa (Barbui et al. 2011).

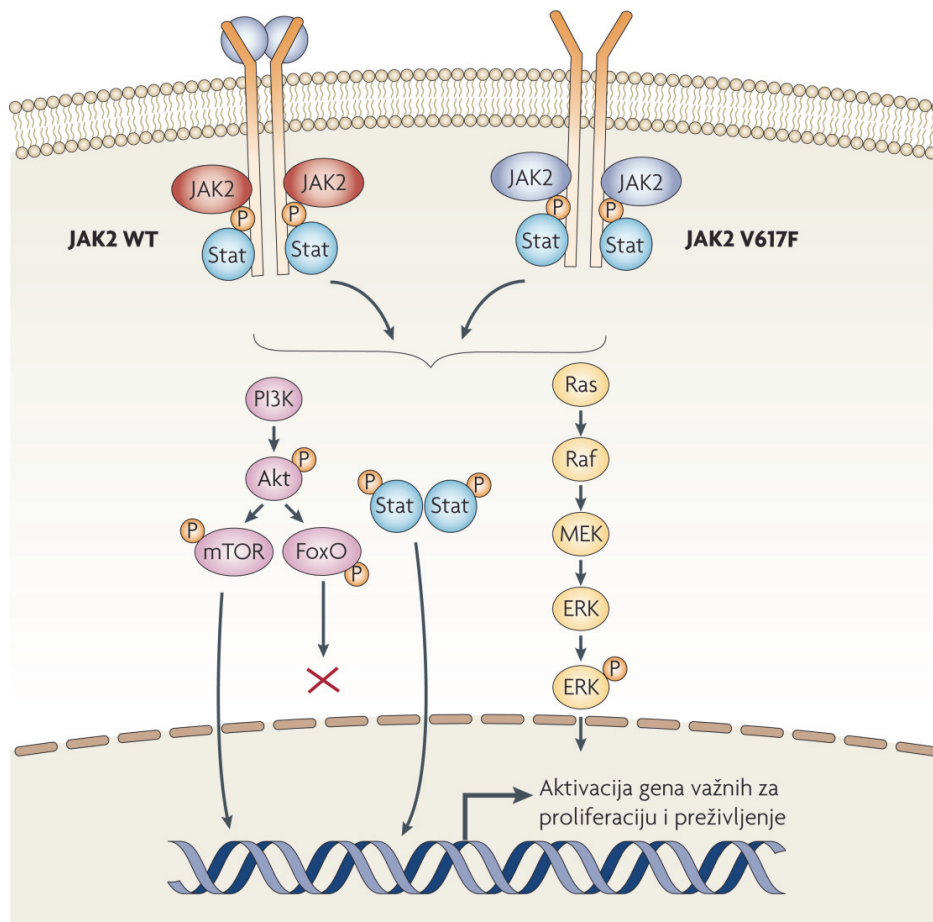
## 3.2. Mutacija V617F gena JAK2

### 3.2.1. Uloga JAK2 u mijelopoezi

Središnje mjesto u patogenezi *BCR-ABL1* negativnih MPN-a imaju stečene somatske mutacije gena *Janus kinaza 2 (JAK2)*, smještenog na kratkom kraju 9. kromosoma (9p24) (Oh & Gotlib 2010). Njegov proteinski produkt sastavljen od 1132 aminokiseline član je iste porodice citoplazmatskih PTK-a kojima pripadaju JAK1, JAK3 i tirozin kinaza 2 (TYK2). Janus kinaze naziv su dobile po rimskom bogu s dva lica koja označavaju početak i svršetak, što je u skladu s dvije simetrične kinazne domene koje sadrže: JAK-homologna domena 1 (JH1), koja pokazuje tirozin kinaznu aktivnost, i domena JH2 koja je enzimski inertna (pseudokinaza), ali negativno regulira aktivnost prve domene. U normalnim uvjetima JAK2 je nekovalentno vezan za membranski receptor i zauzima inaktivnu konformaciju. Vezanjem liganda za receptor protein se strukturno mijenja, što negativno utječe na domenu JH2, rezultirajući slabljenjem regulacije i aktivacijom kinazne aktivnosti. *In vitro* istraživanja su pokazala da aktivirani JAK2 sukcesivno fosforilira tirozinske ostatke na vlastitoj molekuli i drugim proteinima, pokrećući tako specifičnu signalnu kaskadu koja uključuje prijenosnik signala i aktivator transkripcije (STAT, prema engl. *signal transducer and activator of transcription*), mitogenom aktiviranu protein kinazu (MAPK) i fosfoinozimid 3-kinazu (PI3K, prema engl. *phosphoinositide 3-kinase*) (Levine et al. 2007).

### 3.2.2. Biologija mutacije V617F

Najznačajnija mutacija gena *JAK2* u mijeloproliferativnim neoplazmama transverzija je gvanina u timin (G > T) na 1849. poziciji u eksonu 14 koja dovodi do zamjene valina fenilalaninom (V > T) u 617. kodonu (Baxter et al. 2005; James et al. 2005; Kralovics et al. 2005; Levine et al. 2005b). Budući da se zamijenjena aminokiselina nalazi na mjestu najvjerojatnijeg kontakta između katalitičke i pseudokinazne domene, smatra se da zbog mutacije V617F dolazi do popuštanja autoregulacije proteina JAK2 i njegove konstitutivne aktivacije (Ungureanu et al. 2011; Bandaranayake et al. 2012). Mutirani protein ima sklonost hiperfosforiliranju i stabilizaciji drugih proteina uključenih u signalne putove, što produljuje trajanje signala. Osim toga mutacija uzrokuje gensku nestabilnost, utječe na ekspresiju gena modificirajući strukturu kromatina i smanjuje apoptotični odziv na oštećenje DNA. Svi ti mehanizmi povećavaju rizik akumulacije genskih lezija koje vode u akutnu transformaciju.



**Slika 1.** Prikaz mehanizma aktivacije JAK2 kinazne aktivnosti mutacijom V617F. Prema: Levine et al. 2007, str. 677, uz dopuštenje Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer.

### 3.2.3. Fenotipska obilježja

Mutacija JAK2 V617F prisutna je u oko 95% bolesnika s PV-om i u 50-60% bolesnika s ET-om i PMF-om (Cross 2011). Prevalencija mutiranog alela u SVT-u znatno varira (7-59%) među pojedinim studijama, no većina autora izvještava o vrijednostima između 20% i 40% (Sekhar et al. 2013). Mutacija je s nižom učestalošću (8%) opisana i u bolesnika s kroničnom mijelomonocitnom leukemijom (Levine et al. 2005a), a povremeno se nalazi i u mijelodisplastičnom sindromu, kroničnoj mijeloidnoj leukemiji i primarnoj akutnoj mijeloidnoj leukemiji. Neke su studije nisku razinu mutacije detektirale i u općoj populaciji, no značenje takvog nalaza još nije razjašnjeno.

Na transgeničnom životinjskom modelu je dokazano da razina ekspresije *JAK2* V617F određuje fenotip MPN-a: od bolesti nalik na ET pri niskoj razini ekspresije, preko bolesti nalik na PV, do bolesti nalik na PMF pri visokoj razini ekspresije mutiranog alela (Tiedt et al. 2008). Homozigotnost na mutirani alel se javlja s jednakom učestalošću i u PV-u i ET-u, no širenje dominantnog klona pronađeno je samo u PV-u.

Prisutnost mutacije u bolesnika s ET-om i PMF-om povezana je sa starijom dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze, višim vrijednostima hemoglobina i većim brojem leukocita, dok je u bolesnika s ET-om povezana i s nižim brojem trombocita (Vannucchi et al. 2008). V617F-pozitivni bolesnici sa SVT-om također pokazuju više razine hemoglobina i leukocita, ali je u ovoj skupini zapažen i statistički značajan porast hematokrita i broja trombocita (Kiladjian et al. 2008). V617F-pozitivni bolesnici s BCS-om imaju lošiji Child-Pugh prognostički skor u trenutku postavljanja dijagnoze, no čini se kako *JAK2* status nema utjecaja na preživljenje u TVP-u.

#### **3.2.4. Terapijske implikacije**

*JAK2* kao kinaza nužna za proliferaciju i diferencijaciju eritroidnih stanica i megakariocita relevantna je terapijska meta u liječenju MPN-a. Do danas je više inhibitora *JAK2* razvijeno do razine kliničkih ispitivanja. Preliminarni rezultati pokazuju kako poboljšavaju kliničku sliku bolesti reducirajući splenomegaliju, konstitutivne simptome poput noćnog znojenja, umora i pruritusa. Ipak, pluripotentne krvotvorne matične stanice nisu ovisne o *JAK2*, a mutacija nije inicijalni molekularni događaj. Prema rezultatima PT-1 studije koja se bavila ispitivanjem osjetljivosti ET-a na konvencionalne citoreduktivne lijekove, V617F-pozitivni bolesnici pokazuju bolji terapijski odgovor na hidroksiureju u odnosu na anagrelid. Razlika u odnosu na status bez mutacije pripisuje se smanjenoj incidenciji arterijske tromboze u ovih bolesnika (Campbell et al. 2005). Nalaz mutiranog alela povezuje se s povećanim rizikom za fibroznu transformaciju bolesti. Isto tako, do danas nije pronađena povezanost između mutacije gena *JAK2* i prognostičkog skora ili preživljenja bolesnika s MPN-om (Vannucchi et al. 2013).

### 3.2.5. Dijagnostička važnost mutacije

Testiranje na mutaciju *JAK2* V617 pomoću alel-specifične lančane reakcije polimerazom (PCR) danas se uvriježilo kao dio rutinske dijagnostike MPN-a koja se provodi u ranoj fazi obrade suspektanog bolesnika. Selektivni izražaj mutiranog alela dijagnostički je vrlo značajan jer s 99%-tnom sigurnošću upućuje na prisutnost maligne klonalne hematopoeze. Međutim, negativan nalaz ne isključuje prisutnost bolesti, a da bi se mogao identificirati pojedini podentitet unutar spektra MPN-a, detekcija mutacije treba biti dopunjena drugim kliničkim, histološkim i laboratorijskim nalazima (Nielsen et al. 2013). Budući da razina ekspresije mutiranog gena među pacijentima znatno varira, nerijetko iznoseći svega 1-3% što je na granici detekcije klasičnog PCR-a, ali i sekvenciranja po Sangeru i pirosekvenciranja, nedavno se otvorilo i pitanje adekvatnosti korištenja ove metode za određivanje prisustva mutacije (Mason et al. 2011).

### 3.3. Kvantifikacija mutiranog alela

Kvantifikacija mutacije *JAK2* V617F novi je pristup kliničkom praćenju bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazmama u kojem središnje mjesto zauzima koncept opterećenja alelom (AB). AB je kontinuirana mjera udjela mutiranog alela V617F u nehomogenom uzorku stanica. omogućava razlikovanje bioloških podentiteta bolesti. Više razine AB-a povezuju se s povišenim rizikom trombotičkih incidenata u ET-u, težim kliničkim fenotipom u PV-u (pruritus, splenomegalija, leukocitoza) i preživljenjem u PMF-u (Tefferi et al. 2008; De Stefano et al. 2009; Passamonti et al. 2010). Bolesnici s višim rizikom za razvoj SVT-a imaju niže opterećenje mutacijom. Opterećenje alelom korišteno je i za praćenje odgovora na terapiju, osobito novim lijekovima kao što je interferon  $\alpha$  (Kiladjian et al. 2011), te predviđanju ishoda u transplantiranih bolesnika s PMF-om. Sniženje opterećenja alelom prometnulo se u konačan cilj brojnih istraživanja novih agensa, uključujući JAK inhibitore. No izuzev inhibitora telomeraze imetelstata, JAK inhibitori su do danas pokazali tek skroman učinak na smanjenje AB-a.

Metoda kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (qPCR) pokazuje i do 10 puta veću osjetljivost u odnosu na konvencionalne metode (Bench et al. 2013). Iako se od otkrića *JAK2* mutacije isprofiliralo više načina primjene ove metode, dugo nije postojao konsenzus koji od njih u praksi daje optimalne rezultate. U nedavno provedenoj europskoj multicentričnoj studiji, između 9 ispitanih pristupa, onaj danskih autora ocijenjen je kao visoko pouzdan i preporuča se njegova primjena u kliničkim uvjetima (Jovanovic et al. 2013).



## 4. Hipoteza

U ovom radu polazimo od pretpostavke da je metoda kvantifikacije opterećenja mutiranim alelom V617F gena *JAK2* adekvatna za korištenje u dijagnostici i praćenju bolesti iz spektra kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi. Također pretpostavljamo da se na temelju tih vrijednosti mogu uočiti određene razlike u fenotipskoj manifestaciji ovih hematoloških malignosti, kao i u njihovom odgovoru na terapiju.

## 5. Ciljevi rada

Opći cilj ovoga rada bio je ispitati opterećenje mutiranim alelom *JAK2 V617F* kod bolesnika s dijagnozom *BCR-ABL* negativnih klasičnih mijeloproliferativnih neoplazmi.

Specifični ciljevi bili su:

1. Uspostaviti metodu relativne kvantifikacije mutiranog alela iz uzorka krvnih stanica.
2. Odrediti opterećenje alelom kod bolesnika uzimajući u obzir osnovne epidemiološke i kliničke parametre.
3. Ustanoviti postoji li razlika u ekspresiji mutacije između različitih podentiteta MPN-a.
4. Pratiti promjenu opterećenja mutiranim alelom kod bolesnika na terapiji.

## 6. Ispitanici i metode

### 6.1. Ispitanici

U ovo istraživanje bilo je uključeno 11 ispitanika kojima je u razdoblju od 2006. do 2014. godine dijagnosticirana bolest iz spektra kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi. Dijagnoza odgovarajućeg podentiteta postavljena je u skladu s revidiranim kriterijima SZO-a iz 2008. godine (Tablica 1). Dijagnostička obrada uključivala je kompletnu krvnu sliku periferne krvi uz analizu morfoloških i molekularno-citogenetskih karakteristika koštane srži prije početka liječenja. Dijelu bolesnika koji su kao komplikaciju razvili trombozu, dijagnoza SVT-a postavljena je na temelju nalaza odgovarajuće radiološke slikovne metode (duplex ultrazvuk ili kompjutorizirana tomografija). Svi bolesnici liječeni su na Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

### 6.2. Molekularne metode

#### 6.2.1. Izolacija DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka periferne krvi ispitanika korištenjem otopine reagensa QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema protokolu koji navodi proizvođač. Do analize su uzorci DNA bili pohranjeni na -20°C.

#### 6.2.2. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)

Relativna kvantifikacija mutiranog alela *JAK2* V617F u uzorku izolirane DNA izvršena je pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (qPCR) korištenjem alel-specifičnog seta početnica i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe prema Larsenu i sur. (Larsen et al. 2007). Set početnica i proba sastojao se od: zajedničke uzvodne početnice (engl. *common forward primer*) duljine 24 pb, dvije nizvodne početnice (engl. *reverse primer*) duljine 30 pb specifične za mutirani (V617F) i divlji tip alela (WT), te probe obilježene 6-karboksifluoresceinom (6-FAM) i tetrametilrodaminom (TAMRA) duljine 30 pb (Tablica 2).

**Tablica 2.** Početnice i fluorescentno obilježena proba za umnožavanje ciljanih alela

Početnica / proba	Nukleotidni slijed
Zajednička uzvodna početnica:	5'-CTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGA-3'
Nizvodna početnica <i>JAK2</i> V617F:	5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACA <sup>t</sup> AA-3'
Nizvodna početnica <i>JAK2</i> WT:	5'-GTAGTTTTACTTACTCTCGTCTCCACA <sup>t</sup> AC-3'
Fluorescentno obilježena proba:	6-FAM-TGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTGTTTT-TAMRA

Koncentracije početnica iznosile su 300 nmol/L, dok je koncentracija probe iznosila 200 nmol/L. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 25  $\mu$ L u sastavu: 10  $\mu$ L izolirane DNA, 12,5  $\mu$ L MasterMix-a i 2,5  $\mu$ L PrimerProbeMix-a. Za odvijanje reakcije i mjerenje fluorescence korišten je 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Program umnažanja sastojao se od inicijalnih 10 minuta na 95°C (aktivacija) te 50 ciklusa po 15 sekundi na 95°C (denaturacija) i 60 sekundi na 60°C (ekstenzija).

### 6.2.3. Izračun opterećenja mutiranim alelom

Za analizu podataka i izračun vrijednosti praga broja ciklusa ( $C_t$ , prema engl. *cycle threshold*) korišten je računalni program 7300 System SDS Software. Kako bi se verificirala osjetljivost početnica prije kvantifikacije, na temelju serije peterostrukih razrjeđenja izrađene su standardne krivulje specifične za mutirani i divlji tip alela. Iz logaritma odgovarajuće standardne krivulje za svaki tip alela izračunat je nagib pravca (engl. *slope*,  $m$ ) i odrezak na osi y (engl. *Y-intercept*,  $b$ ) koji odgovara vrijednosti  $C_t$  kada je u uzorku prisutna jedna kopija alela. Na temelju vrijednosti standardne krivulje,  $C_t$  vrijednosti dobivene kvantifikacijom svakog uzorka prevedene su u broj kopija mutiranog i divljeg tipa alela u uzorku korištenjem formule:  $10^{\frac{b - C_t}{m}}$ . Naposljetku, opterećenje alelom (AB, prema engl. *allele burden*) izračunato je prema formuli:  $\frac{JAK2V617F}{JAK2WT + JAK2V617F} \times 100$  i izraženo je u postotku.

## 7. Rezultati

Rezultati kvantifikacije mutiranog alela V617F gena *JAK2* u bolesnika s dijagnosticiranim MPN-om prikazani su u tablici 3. Uz opterećenje mutiranim alelom (AB) u trenutku postavljanja dijagnoze (uzorak 1) i nakon započetog liječenja (uzorak 2) navedena su i osnovna obilježja ispitanika, relevantni klinički parametri, kao i primijenjena citoreduktivna terapija.

**Tablica 3.** Opterećenje mutiranim alelom V617F gena *JAK2* u bolesnika s MPN-om

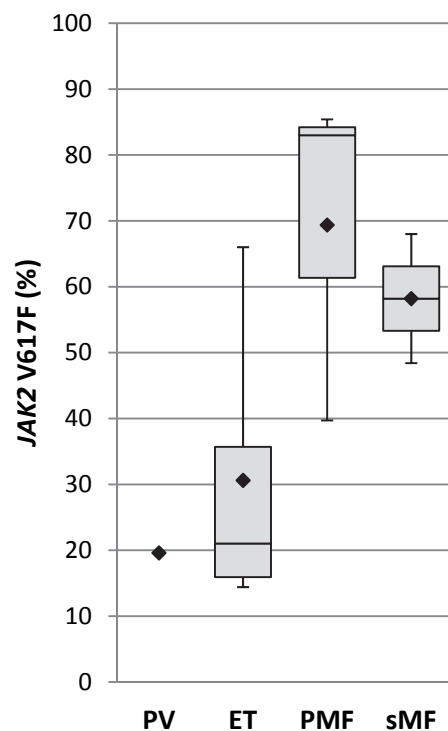
Ispitanik br.	Dob (god)	Spol	MPN	SVT	Trajanje bolesti (god)	Citoredukt. terapija	AB <i>JAK2</i> V617F (%)	
							Uzorak 1	Uzorak 2
1	53	ž	PV	da	8	HU	19,6	Ø
2	46	m	ET	ne	7	IFN- $\alpha$	14,4	4,2
3	53	ž	ET	da	6	HU	16,4	Ø
4	57	m	ET	ne	2	nema	66,0	66,9
5	56	m	ET > KML	ne	14	HU	25,6	Ø
6	58	m	PMF	ne	<1	HU	85,4	87,4
7	75	ž	PMF	ne	<1	HU	83,0	77,6
8	67	m	PMF	ne	1	nema	39,7	Ø
9	45	ž	PV > sMF	ne	12	HU, IFN- $\alpha$	Ø	59,9
10	72	m	ET > sMF	ne	<1	RX	68,0	65,7
11	60	ž	ET > sMF	ne	6	HU	48,4	74,9

Ø - nije rađeno / nepoznat rezultat

Od 11 ispitanika 6 su bili muškog spola s medianom dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze od 58 godina i medianom trajanja bolesti od 1 godine, u odnosu na ispitanice kod kojih je median dobi iznosio 53 godine, a median trajanja bolesti 6 godina. Opterećenje mutiranim alelom u vrijeme dijagnoze kod jedine ispitanice s PV-om iznosilo je 19,6% i ona je bila podvrgnuta terapiji hidroksiurejom (HU). Kod 3 ispitanika s ET-om opterećenje je poprimilo vrijednosti od 14,4% do 66,0%, dok je usporedbom uzoraka ispitanika br. 2 zabilježen trostruki pad AB-a nakon započete terapije interferonom  $\alpha$ . Od 3 ispitanika s dijagnozom

PMF-a dvoje je pokazalo visoke vrijednosti AB-a u vrijeme dijagnoze (85,4% i 83%), dok je kod jednog bolesnika izmjerena niža vrijednost (39,7%). Učinci terapije HU-om na AB kod ovih bolesnika bili su skromni (smanjenje od 5,4%, odnosno povećanje od 2,0%). Kod troje ispitanika koji su razvili reaktivnu mijelofibrozu (sMF) izmjerene su relativno više vrijednosti AB-a (48,4-68,0%). U ispitanika br. 11 zabilježena je progresija opterećenja alelom unatoč terapiji HU-om (povećanje od 26,5%), dok se nakon terapije novim inhibitorom signalnih putova (ruxsolutinib, RX) opterećenje alelom smanjilo za 2,3%.

Kvartilna stratifikacija opterećenja mutiranim alelom prema podentitetu mijeloproliferativne neoplazme prikazana je na slici 2. Na dijagramu su naznačeni median (crta unutar pravokutnika) i aritmetička sredina (romb) izmjerenih opterećenja alelom za svaki tip MPN-a.



**Slika 2.** Grafički prikaz raspona opterećenja alelom *JAK2 V617F* među podentitetima MPN-a (PV, ET i PMF) i u sekundarnoj mijelofibrozi (sMF) u trenutku postavljanja dijagnoze (n=10)

## 8. Rasprava

Otkriće mutiranog alela V617F gena *JAK2* je 2005. godine širom otvorilo vrata jasnijem razumijevanju biologije, kliničke evolucije i terapije kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi. Iz kliničke perspektive, identifikacija ovog molekularnog biljega unaprijedila je i pojednostavnila dijagnostički pristup MPN-ovima, što je prepoznala i ekspertna skupina SZO-a uvrstivši ga među velike dijagnostičke kriterije za tu skupinu bolesti (Tablica 1). Međutim, u kojoj je mjeri *JAK2* V617F uključen u određeni fenotip i koliko je relevantan kao prognostički čimbenik još je uvijek predmet rasprava. U svjetlu brojnih novih spoznaja posljednjih godina, kvantifikacija opterećenja mutiranim alelom sve se više koristi za praćenje odgovora na terapiju, osobito novim lijekovima, te predviđanje ishoda liječenja.

Prikazani rezultati za 11 ispitanika (Tablica 3) trebali bi omogućiti bolji uvid u primjenu ove metode u realnim kliničkim uvjetima, no uljučeni broj ispitanika premali je za donošenje konačnih zaključaka baziranih na statističkoj analizi. Stratifikacija ispitanika u kvartile na temelju kvantifikacije njihovog opterećenja mutiranim alelom (Slika 2) pokazala se kao primjeren način evaluacije fenotipskih posljedica mutacije. U spektru MPN-a dobivene vrijednosti AB-a pokazuju progresiju od najnižih u PV-u i ET-u do najviših u PMF-u i sMF-u, što je u skladu s rezultatima koji su poznati iz dosada objavljenih studija (Vannucchi et al. 2008). Međutim, zbog većih preklapanja kvantifikacija mutiranog alela ne omogućava definitivnu diskriminaciju među podentitetima, na što su i ranije upozorili neki autori (Kiladjian 2012).

U ovom radu uzorci za genotipizaciju prikupljeni su u različitim vremenskim točkama u kliničkom tijeku bolesti, što je potencijalno utjecalo na vrijednosti opterećenja mutiranim alelom. Budući da 3 bolesnika nisu bila dostupna daljnjoj analizi, 2 bolesnika nisu podvrgnuta citoreduktivnoj terapiji, dok je prvi uzorak ispitanika br. 9 izgubljen u obradi, adekvatnu usporedbu opterećenja alelom u trenutku postavljanja dijagnoze i u tijeku liječenja nije bilo je moguće napraviti za sve, već za samo 5 ispitanika. Unatoč navedenim nedostacima, dobivene vrijednosti AB-a moguće je interpretirati na razini pojedinačnih slučajeva. Interferon  $\alpha$  upadljivo je jedini citoreduktivni agens koji je pokazao jasan učinak na smanjenje opterećenja alelom (više nego trostruko), što je u skladu s podacima iz literature (Kiladjian et al. 2011), dok je učinak hidroksiureje i ruksolitiniba neznan.

## 9. Zaključci

1. Kvantifikacija V617F metodom qPCR-a adekvatan je pristup u dijagnostici i praćenju kliničkog tijeka kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi.
2. Opterećenje mutiranim alelom V617F gena *JAK2* jedna je od determinanti kliničkog fenotipa MPN-a.
3. Kvantifikacija mutacije *JAK2* V617F indicirana je za praćenje dinamike MPN-a u liječenju interferonom i novim inhibitorima signalnih putova.



## 10. Zahvale

Prije svega zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Rajku Kušecu na prilici da zgrabim u nepresušno more molekularne medicine, kao i na povjerenju koje mi je pritom ukazao.

Također zahvaljujem doc. dr. sc. Maruški Marušić na savjetima i pomoći u izradi ovog rada.

Zahvaljujem i Tamari, Nevi, Dinu i Juri na prijateljstvu, hrabrenju i strpljenju.

Na poslijetku, zahvaljujem svojim roditeljima na trajnoj i neupitnoj podršci i odricanju.

## 11. Literatura

1. Ageno W, Squizzato A, Togna A, Magistrali F, Mangini M, Fugazzola C, Dentali F (2012) Incidental diagnosis of a deep vein thrombosis in consecutive patients undergoing a computed tomography scan of the abdomen: a retrospective cohort study. *J Thromb Haemost* 10:158-160.
2. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR (2012) Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* 19:754-759.
3. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Hehlmann R, Hoffman R, Kiladjian JJ, Kroger N, Mesa R, McMullin MF, Pardanani A, Passamonti F, Vannucchi AM, Reiter A, Silver RT, Verstovsek S, Tefferi A (2011) Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 29:761-770.
4. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A, Vannucchi AM, Tefferi A (2012) Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 120:5128-5133.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054-1061.
6. Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, Awan A, Carter I, Goday-Fernandez A, Langabeer SE, Clench T, Clark J, Evans PA, Grimwade D, Schuh A, McMullin MF, Green AR, Harrison CN, Cross NCP (2013) Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol* 160:25-34.

7. Bjorkholm M, Derolf AR, Hultcrantz M, Kristinsson SY, Ekstrand C, Goldin LR, Andreasson B, Birgegard G, Linder O, Malm C, Markevarn B, Nilsson L, Samuelsson J, Granath F, Landgren O (2011) Treatment-Related Risk Factors for Transformation to Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Myeloproliferative Neoplasms. *J Clin Oncol* 29:2410-2415.
8. Campbell PJ, Green AR (2006) Mechanisms of disease: The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 355:2452-2466.
9. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR, United Kingdom M (2005) Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 366:1945-1953.
10. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Vannucchi AM, Antonioli E, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Finazzi G, Gangat N, Tefferi A, Barbui T (2011) Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood* 117:5857-5859.
11. Cross NCP (2011) Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematol-Am Soc Hematol Educ Program* 208-214.
12. De Keersmaecker K, Cools J (2006) Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 20:200-205.
13. De Stefano V, Za T, Rossi E, Fiorini A, Ciminello A, Luzzi C, Chiusolo P, Sica S, Leone G (2009) Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematol-Hematol J* 94:733-737.
14. DeLeve LD, Valla DC, Garcia-Tsao G (2009) Vascular Disorders of the Liver. *Hepatology* 49:1729-1764.
15. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434:1144-1148.

16. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E, Leibundgut EO, Cassinat B, Pallisgaard N, Maroc N, Hermouet S, Nickless G, Guglielmelli P, van der Reijden BA, Jansen JH, Alpermann T, Schnittger S, Bench A, Tobal K, Wilkins B, Cuthill K, McLornan D, Yeoman K, Akiki S, Bryon J, Jeffries S, Jones A, Percy MJ, Schwemmers S, Gruender A, Kelley TW, Reading S, Pancrazzi A, McMullin MF, Pahl HL, Cross NCP, Harrison CN, Prchal JT, Chomienne C, Kiladjian JJ, Barbui T, Grimwade D (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 27:2032-2039.
17. Kiladjian JJ (2012) The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematol-Am Soc Hematol Educ Program* 561-566.
18. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, Cazals-Hatem D, Plessier A, Garcia-Pagan JC, Murad SD, Raffa S, Janssen HLA, Gardin C, Cereja S, Tonetti C, Giraudier S, Condat B, Casadevall N, Fenaux P, Valla DC (2008) The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 111:4922-4929.
19. Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R (2011) The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 117:4706-4715.
20. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779-1790.
21. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadottir EA, Samuelsson J, Bjorkholm M (2008) Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 112:2199-2204.
22. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N (2007) The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 136:745-751.

23. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJP, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MWN (2005a) The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106:3377-3379.
24. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7:673-683.
25. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska L, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005b) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387-397.
26. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, De Stefano V, Elli E, Iurlo A, Latagliata R, Lunghi F, Lunghi M, Marfisi RM, Musto P, Masciulli A, Musolino C, Cascavilla N, Quarta G, Randi ML, Rapezzi D, Ruggeri M, Rumi E, Scortechini AR, Santini S, Scarano M, Siragusa S, Spadea A, Tieghi A, Angelucci E, Visani G, Vannucchi AM, Barbui T, Grp C-PC (2013) Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 368:22-33.
27. Mason J, Akiki S, Griffiths MJ (2011) Pitfalls in molecular diagnosis in haemato-oncology. *J Clin Pathol* 64:275-278.
28. Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Bojesen SE (2013) Diagnostic value of JAK2 V617F somatic mutation for myeloproliferative cancer in 49 488 individuals from the general population. *Br J Haematol* 160:70-79.
29. Oh ST, Gotlib J (2010) JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol* 3:323-337.
30. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M (2010) A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 24:1574-1579.

31. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF (2008) Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood* 112:45-52.
32. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadie M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F, Grp HW (2010) Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 116:3724-3734.
33. Sekhar M, McVinnie K, Burroughs AK (2013) Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 162:730-747.
34. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian JJ, Janssen HLA, Leebeek FWG (2012) Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 120:4921-4928.
35. Tefferi A (2008) The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 22:3-13.
36. Tefferi A (2010) Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24:1128-1138.
37. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A (2008) Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 22:756-761.
38. Tefferi A, Vardiman JW (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22:14-22.
39. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111:3931-3940.
40. Ungureanu D, Wu JH, Pekkala T, Niranjan Y, Young C, Jensen ON, Xu CF, Neubert TA, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O (2011) The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Blood* 118:971-981.

41. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A (2008) Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 22:CP5-1307.
42. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, Ketterling RP, Rotunno G, Knudson RA, Susini MC, Laborde RR, Spolverini A, Pancrazzi A, Pieri L, Manfredini R, Tagliafico E, Zini R, Jones A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Pietra D, Rumi E, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross N, Tefferi A (2013) Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 27:1861-1869.
43. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, Bloomfield CD, Thiele J (2008) Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Ur.) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th edition. Lyon: IARC, str. 18-30.
44. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Plataniias LC (2003) Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22:423-434.
45. Visser O, Trama A, Maynadie M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, Mallone S, Tereanu C, Allemani C, Ricardi U, Schouten HC, Grp RW (2012) Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer* 48:3257-3266.

## 12. Životopis

Ivo Veletić rođen je u Splitu 1989. godine gdje završava osnovnu školu i opću gimnaziju. Godine 2007. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od 2012. godine sudjeluje u nastavi kolegija Klinička propedeutika kao demonstrator na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava. Od 2013. godine je glavni urednik časopisa "Medicinar" i studentski predstavnik u Povjerenstvu za nastavne tekstove Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Tijekom studija obavlja stručnu praksu u bolnici St. Olavs u Trondheimu, Norveška (2012.) i u bolnici Mater Dei na Malti (2013.). Dobitnik je dviju posebnih rektorovih nagrada (2010. i 2013.) i posebne dekanove nagrade za opći doprinos radu i ugledu Fakulteta (2013.). U slobodno vrijeme pjeva u pjevačkom zboru "Lege artis".