

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

VESNA M. SPASOVSKI

MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE
MIJELOPROLIFERATIVNIH NEOPLAZIJA:
POREMEĆAJ EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH
U PROLIFERACIJU I APOPTOZU

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

VESNA M. SPASOVSKI

MOLECULAR MECHANISMS OF
PATHOGENESIS OF MYELOPROLIFERATIVE
NEOPLASMS: DEREGLATION OF GENES
INVOLVED IN CELL PROLIFERATION AND
APOPTOSIS

DOCTORAL DISSERTATION

BELGRADE 2012

MENTORI

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

1. dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. dr Gordana Nikčević, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ovaj rad je posvećen mom tati

ZAHVALNICA

Kada vreme bude prošlo prestaće da bude važno koje godine, koga dana i kada se sve ovo desilo. Ali meni neće prestati da bude važno da smo stigli do zadatog cilja, i neće prestati da mi bude važno kako smo do njega došli. Sonjina velikodušnost mi je uvek bila najveća inspiracija, a njena podrška i razumevanje bili su mi važni da ne posustanem u teškim trenucima. Duškovo bezuslovno poverenje pružilo mi je sigurnost kada sam ostajala bez nje. Majina stručna i ljudska podrška bili su mi vodilja na raskrscima na koje sam nailazila. Njima se zahvaljujem beskrajno, jer bez njih ovaj rad ne bi bio urađen, niti bih ja bez njih imala snagu koja mi je bila potrebna.

Miloš je uvek nezamenljiv deo mog života, moj vodič, drug i brat. Njemu se zahvaljujem što u mene veruje i što misli da zaslužujem sve ono lepo što mi se dešava.

Zahvaljujem se mojim kolegama, od kojih su mi neki poslali svoju pomoć na svoj poseban način i utkali sebe u ovaj rad i u moj život.

Molekularni mehanizmi patogeneze mijeloproliferativnih neoplazija: poremećaj ekspresije gena uključenih u proliferaciju i apoptozu

REZIME

Uvod Mijeloproliferativne neoplazije (MPN) su hronični hematološki maligniteti koji se odlikuju autonomnom proliferacijom opredeljenih progenitora hematopoeze i aberantnom aktivacijom tirozin kinaznih signalnih puteva u kombinaciji sa snažnim odgovorom na citokine i faktore rasta. Tri bolesti predstavljaju MPN u užem smislu: policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET) i mijelofibroza (MF). Jedna od komplikacija ovih oboljenja je njihova kasna evolucija u akutnu mijeloidnu leukemiju (AML).

Važno obeležje ovih bolesti je prisustvo „missense“ *JAK2-V617F* mutacije u sve tri bolesti, a procenat zastupljenosti mutacije po bolestima je različit. Takođe pokazano je da kod ovih pacijenata postoji tzv. efekat “doze gena”, odnosno da različit nivo *V617F* alela utiče kliničku sliku bolesti.

JAK2-V617F mutacija događa se u 80% slučajeva na specifičnom haplotipu koji je nazvan 46/1 haplotip. Na koji način ovaj niz SNP-ova, koji se nalaze u *JAK2* genu, predisponira nastajanje mutacije kao i njen uticaj na fenotip MPN, još nije utvrđeno. Jedan od mogućih mehanizama je uticaj ovog haplotipa na transkripciju. Posebnu pažnju u okviru 46/1 haplotipa je privukao SNP rs12343867, koji u potpunosti asocira sa MPN.

Proces apoptoze je deregulisan u hematološkim malignitetima, što dovodi do rezistencije malignih ćelija na signale smrti i obezbeđuje im duži život u odnosu na normalne ćelije. Proces apoptoze nije detaljno izučen kod MPN, mada se zna da je direktno pogođen *JAK2-V617F* mutacijom. Naime, glavni signalni put preko *STAT5* (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) proteina direktno aktivira anti- apoptotski *BCL2-xL* protein, čime se smanjuje apoptoza. Deregulacija ostalih apoptotskih puteva u MPN nije u potpunosti rasvetljena.

Ciljevi istraživanja i metode Cilj našeg istraživanja je bio ispitivanje markera koji učestvuju u procesima proliferacije i apoptoze kod pacijenata sa MPN. Stoga je istraživanje obuhvatilo proučavanje mutacija *JAK2-V617F* i *FLT3-ITD*, molekularnih markera uključenih u proces proliferacije. Ove mutacije detektovane su metodama baziranim na PCR. Metodom qPCR određen

je udeo zastupljenosti mutiranog V617F alela. Metodom sekvenciranja je analiziran DNK region u intronu 14 *JAK2* gena u kome se nalazi SNP rs12343867. Okarakterisana je njegova funkcija *in vitro* i *in vivo* i analiziran njegov uticaj na transkripciju *JAK2* gena. U ovom segmentu istraživanja korišćene su metode rekombinantne DNK, tranzijentna transfekcija K562 ćelija, funkcionalni CAT esej i EMSA esej. Metodom RT-qPCR je proučavana rezistencija granulocita pacijenata sa MPN na apoptozu, praćenjem ekspresije markera unutrašnjeg (*BCL2*, *BAX* I *BCL2L12*) i spoljašnjeg (*FASR*) apoptotskog puta.

Rezultati, diskusija i zaključci Dobijeni rezultati pokazuju da je, od ukupnog broja od 199 analiziranih pacijenta sa MPN, *JAK2*-V617F mutacija detektovana kod 53% pacijenta sa ET, 78% pacijenata sa PV i 38% pacijenata sa MF. Kada je u pitanju zastupljenost V617F alela, pokazano je da je kod pacijenata sa ET prisutan nizak nivo mutiranog alela (27%), kod pacijenata sa PV prisutni su veće “doze” mutiranog alela (44%), dok je kod pacijenata sa MF mutirani V617F alel najzastupljeniji (81%). Proučavanjem prisustva *FLT3*-ITD mutacije kod pacijenata sa MPN konstatovano je da ova mutacije nije prisutna ni kod *JAK2*-V617F- negativnih (15/33), ni kod *JAK2*-V617F- pozitivnih (18/33) ispitanika. Naši rezultati pokazuju da, u početnom stadijumu MPN, *FLT3*-ITD ne predstavlja mutacioni događaj koji utiče na proliferativni kapacitet malignog klona.

Ispitivanje DNK regiona u intronu 14 *JAK2* gena koji sadrži SNP rs12343867 je pokazalo da ovaj region ima snažan represorski transkripcioni potencijal. U ovom radu je prvi put pokazano za neki intronski region u genu za *JAK2* da je transkripcioni regulatorni element. Utvrđeno je da proteinski kompleks koji interaguje sa ovim regulatornim regionom, sadrži transkripcioni faktor MEIS1/2, i to specifično vezan kada je nukleotid C prisutan u ovom regionu. Ispitivanje ekspresije *JAK2* gena pokazalo je da je ekspresija pod snažnim uticajem *JAK2*-V617F mutacije, a da haplotip nema značajnu ulogu u regulaciji proliferacije i apoptoze.

Ispitivanje apoptotskih markera kod pacijenata sa MPN je pokazalo da je izmenjena ekspresija kako gena uključenih u spoljašnji, tako i gena uključenih u unutrašnji apoptotski put. Takođe je primećeno da *JAK2*-V617F mutacija nema presudan uticaj na nivo ekspresije ovih apoptotskih markera. Ovim je pokazano da je apoptoza deregulisana kod pacijenata sa MPN i predstavlja važan mehanizam akumulacije malignog klona.

Rezultati ovog istraživanja doprineli su boljem razumevanju molekularne osnove MPN i bacili novo svetlo na transkripcionu regulaciju *JAK2* gena, koja predstavlja još jedan od mogućih načina na koji *JAK2* gen utiče na genezu ovih bolesti.

Ključne reči: Mijeloproliferativne neoplazije, *JAK2*-V617F mutacija, 46/1 haplotip, transkripciona regulacija, ekspresija *JAK2* gena, apoptoza

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: MOLEKULARNA BIOLOGIJA

UDK BROJ: 616-006.4: 576.352.5]: 577.218 (043.3)

Molecular mechanisms of pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: deregulation of genes involved in cell proliferation and apoptosis

ABSTRACT

Introduction Myeloproliferative neoplasms (MPN) are chronic hematological malignancies that are characterized by autonomous proliferation of committed hematopoietic progenitors and aberrant activation of tyrosine kinase signaling pathways, in combination with a strong response to cytokines and growth factors. Three major entities constitute MPN: polycythaemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). One of the complications of these diseases is their late evolution into acute myeloid leukemia.

Important feature of these diseases is the presence of missense mutation *JAK2-V617F* and its variable representation among MPN entities. It is also shown that there is so-called effect of "gene dosage" in these patients, meaning that a different level of *V617F* alleles influences the clinical picture of the disorders.

JAK2-V617F mutation occurs in 80% of cases on a specific haplotype, called 46/1 haplotype. Exact mechanism of action of this set of SNPs, that are located within the *JAK2* gene, has not been determined yet. One of the possible mechanisms could be that it effects transcription. Among eight SNPs, included in this haplotype, SNP rs12343867 has drawn special attention because of its strong association with the MPN.

The process of apoptosis is deregulated in hematological malignancies, leading to resistance of cancer cells to death signals, thus providing them a longer life span compared to normal cells. The process of apoptosis has not been extensively studied in MPN, although it is known that it is directly affected by the *JAK2-V617F* mutation. Specifically, the main signaling pathway through *STAT5* protein directly activates anti-apoptotic *BCL2-xL* protein, thereby reducing apoptosis. Deregulation of other apoptotic pathways in MPN is not fully understood.

Aims and methods The aim of our study was to investigate markers that participate in processes of cell proliferation and apoptosis in patients with MPN. Therefore, the research

included the study of *JAK2-V617F* and *FLT3-ITD* mutations, molecular markers involved in the process of proliferation. These mutations were detected by PCR-based methods. Using qPCR method, the proportion of V617F mutant allele was determined. The method of DNA sequencing has been used to analyze part of intron 14 of the *JAK2* gene, containing the SNP rs12343867. We further characterized its function *in vitro* and *in vivo*, and analyzed its effect on transcription of *JAK2* gene. In this segment of the study we used methods of recombinant DNA, transient transfection of K562 cells, a functional CAT assay and EMSA assay. Using RT-qPCR we studied resistance of MPN granulocytes to apoptosis, monitoring the expression of markers of both internal (*BCL2*, *BAX* and *BCL2L12*) and external (*FASR*) apoptotic pathway.

Results, discussion and conclusions Out of a total of 199 analyzed patients with MPN, *JAK2-V617F* mutation was detected in 53% of patients with ET, 78% of patients with PV and 38% of patients with MF. As to the proportion of V617F allele, we found that patients with ET have low level of mutant allele (27%), patients with PV harbor higher mutant allele proportion (44%), whereas in patients with MF V617F mutant allele is predominant (81%). Studying the presence of *FLT3-ITD* mutation, we concluded that this mutation is neither present in *JAK2-V617F* negative (15/33), nor in *JAK2-V617F* positive (18/33) subjects. Our results indicate that in the early stages of MPN, *FLT3-ITD* mutation is not an event that influences the proliferative capacity of the malignant clone.

Functional analysis of intron 14 of the *JAK2* gene, harboring SNP rs12343867, has demonstrated that this DNA region has a strong potential for transcriptional repression. For the first time it was shown that some intronic element of the *JAK2* gene is a transcriptional regulatory element. It was found that protein complex that interacts with this regulatory region contains transcription factor MEIS1/2, which is specifically bound only when nucleotide C is present within the intron sequence. We also found that *JAK2* gene expression is under the strong influence of *JAK2-V617F* mutation, and that the haplotype has no significant role in the regulation of *JAK2* gene expression.

Investigation of apoptotic markers in patients with MPN has shown altered expression of genes involved in both external and internal apoptotic pathway. It was also

noted that the *JAK2-V617F* mutation does not affect the level of expression of these apoptotic markers. This result demonstrates that apoptosis is deregulated in patients with MPN, being an important mechanism of accumulation of the malignant clone.

In summary, the results of this study contributed to better understanding of the molecular basis of MPN and shed new light on the transcriptional regulation of *JAK2* gene, providing another aspect of complex *JAK2* gene action in the etiology of these disorders.

Keywords: Myeloproliferative neoplasms, *JAK2-V617F*-mutation, 46/1 haplotype, transcriptional regulation, expression of the *JAK2* gene, apoptosis

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SCIENTIFIC DISCIPLINE: MOLECULAR BIOLOGY

UDC NUMBER: 616-006.4: 576.352.5]: 577.218 (043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZIJE – OPŠTE KARAKTERISTIKE	2
Esencijalna trombocitemija	4
Policitemija vera	4
Mijelofibroza	4
MOLEKULARNI MARKERI U MPN	5
JANUS KINAZE	6
JANUS KINAZA 2	8
Gubitak heterozigotnosti	12
Fenomen “doze gena”	13
Biološki kontinuum	15
46/1 haplotip	16
OSTALI MOLEKULARNI MARKERI MPN	18
Mutacija u egzonu 12 <i>JAK2</i> gena	18
Mutacije u genu za trombopoetin	18
Mutacije u <i>TET2</i> genu	19
Mutacije u <i>CBL</i> genu	19
MUTACIJE POVEZANE SA LEUKEMIJSKOM TRANSFORMACIJOM MPN	20
Mutacije u <i>FLT3</i> genu	21
APOPTOZA	22
UNUTRAŠNJI APOPTOTSKI PUT I BCL-2 FAMILIJA PROTEINA	25
PREDSTAVNICI BCL2 FAMILIJE PROTEINA	28
BCL2	28
BAX	28
BCL2L12	28
SPOLJAŠNJI APOPTOTSKI PUT	29
APOPTOZA U MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZIJAMA	30
CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
MATERIJAL I METODE	35
MATERIJAL	36
BILOŠKI MATERIJAL	36
Ispitanici	36
Ćelijske linije	36
Bakterijski soj	37
PLAZMIDNI VEKTORI	37
PRAJMERI	37
ANTITELA	39
METODE	40
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI	40
IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ PERIFERNE KRVI	40
IZOLACIJA GRANULOCITA IZ PERIFERNE KRVI	41
IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA, GRANULOCITA I ĆELIJA U KULTURI	41

REVERZNA TRANSKRIPCija (RT).....	42
REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR).....	42
Alel specifični PCRa za detekciju <i>JAK2-V617F</i> mutacije	43
PCR za detekciju <i>FLT3-ITD</i> mutacije	44
PCR amplifikacija dela introna 14 gena za <i>JAK2</i>	45
ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU	46
ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	46
PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA	47
SEKVENCIranJE PCR PRODUKATA / PLAZMIDNIH KONSTRUKATA	47
Sekvenciranje plazmidnih konstrukata	49
ANALIZA EKSPRESIJE GENA POMOĆU "REAL-TIME" PCR (qPCR) METODE	49
Komparativna ddCt metoda	54
Merenje ekspresije apoptotskih gena qRT-PCR metodom	54
Merenje ekspresije <i>FASR</i> gena qRT-PCR metodom	55
Određivanje zastupljenosti <i>JAK2-V617F</i> alela u ukupnoj količini alela – "allele burden"	56
METODE ZA ANALIZU POLIMORFIZMA U GENU ZA JANUS KINAZU 2 KAO REGULATORA GENSKE EKSPRESIJE	57
DIGESTIJA PLAZMIDA pBLCAT5 I PCR PRODUKATA	58
LIGACIJA	59
KULTIVISANJE BAKTERIJA	59
PRIPREMANJE <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA	60
TRANSFORMACIJA <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA	61
DETEKCIJA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA	61
Brza liza ("lysis gel electrophoresis")	62
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali ("mini prep")	63
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	64
Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali	64
ĆUVANJE TRANSFORMANATA	66
USLOVI GAJENJA ĆELIJA U KULTURI	66
Odmrzavanje ćelija	66
Zamrzavanje ćelija	67
Subkultivacija ćelija	68
Brojanje ćelija	68
TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA	69
PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA	70
β-GALAKTOZIDAZNI ESEJ	70
CAT ELIZA ESEJ	71
IZOLACIJA NUKLEARNIH PROTEINA	72
ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NUKLEARNIH PROTEINA	73
ANALIZA INTERAKCIJE DNK I NUKLEARNIH PROTEINA	73
<i>In silico</i> analiza potencijalnih intronskih regulatornih sekvenci gena za <i>JAK2</i>	73
METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI	73
Obeležavanje dvolančane probe	74
Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)	74
STATISTIĀKA OBRADA PODATAKA	75
REZULTATI	77
OSNOVNA OBELEŽJA GRUPE PACIJENATA SA MPN KORIŠĆENIH U STUDIJI	79
DETEKCIJA <i>JAK2-V617F</i> MUTACIJE I MUTACIONI STATUS PACIJENATA SA MPN	79
ISPITIVANJE ZASTUPLJENOSTI <i>JAK2-V617F</i> ALELA "(ALLELE BURDEN)"	81

DETEKCIJA <i>FLT3</i> -ITD MUTACIJE KOD PACIJENATA SA MPN.....	84
ANALIZA UTICAJA 46/1 HAPLOTIPA NA PATOGENEZU MPN.....	85
DISTRIBUCIJA <i>JAK2</i> SNP RS12343867 GENOTIPA I ALELA KOD PACIJENTA SA MPN I KONTROLA	85
ANALIZA UTICAJA HAPLOTIPA 46/1 NA EKSPRESIJU <i>JAK2</i> GENA.....	87
<i>IN SILICO</i> PREDIKCIJA.....	88
FUNKCIONALNA ANALIZA DELA INTRONA 14 <i>JAK2</i> GENA.....	88
EMSA ANALIZA.....	90
EKSPRESIJA <i>JAK2</i> GENA KOD PACIJENATA MPN: KORELACIJA SA SNP rs 12343867 U INTRONU 14	92
GENA ZA JANUS KINAZU 2	
ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH GENA KOD PACIJENATA SA	93
MPN.....	
ANALIZA EKSPRESIJE GENA UNUTRAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA.....	93
Određivanje odnosa ekspresije BCL2/BAX kod obolelih od MPN.....	94
ANALIZA EKSPRESIJE GENA UNUTRAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA KOD MPN ENTITETA I	95
KORELACIJA SA PRISUSTVOM <i>JAK2</i> -V617F MUTACIJE.....	
Esencijalna trombocitemija.....	95
Policitemija vera.....	96
Mijelofibroza.....	97
ISPITIVANJE EKSPRESIJE MARKERA SPOLJAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA KOD PACIJENATA SA	98
MPN.....	
DISKUSIJA.....	101
MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZIJE – OPŠTE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANE GRUPE	102
BOLESNIKA.....	
TRANSFORMACIJA MPN U AKUTNU MIJELOIDNU LEUKEMIJU.....	103
<i>JAK2</i> “ALLELE BURDEN”.....	105
46/1 HAPLOTIP.....	106
POLIMORFIZMI U GENU ZA JANUS KINAZU 2 KAO REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE.....	108
EKSPRESIJA <i>JAK2</i> GENA KOD PACIJENATA SA MPN.....	109
POREMEĆAJ EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH U PROCES APOPTOZE.....	110
SMANJENA EKSPRESIJA FASR KAO ZAŠTITA MALIGNE ĆELIJE OD ĆELIJSKE SMRTI.....	112
ZAKLJUČCI.....	114
DETEKCIJA <i>JAK2</i>-V617F MUTACIJE I ZASTUPLJENOST MUTIRANOG ALELA U	115
GRANULOCITIMA PACIJENATA SA MPN.....	
ANALIZA PRISUSTVA <i>FLT3</i>-ITD MUTACIJE KOD PACIJENATA SA MPN.....	115
46/1 HAPLOTIP.....	115
ISPITIVANJE REGULATORNOG ELEMENTA U INTRONU 14 GENA ZA <i>JAK2</i>.....	116
ISPITIVANJE EKSPRESIJE <i>JAK2</i> GENA KOD PACIJENATA SA MPN.....	116
EKSPRESIJA <i>JAK2</i> GENA U KORELACIJI SA 46/1 HAPLOTIPOM.....	116
ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH MARKERA KOD PACIJENATA SA MPN.....	117
ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH MARKERA KOD MPN ENTITETA I KORELACIJA SA	117
<i>JAK2</i>-V617F MUTACIJOM.....	
LITERATURA.....	119

UVOD

MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZIJE – OPŠTE KARAKTERISTIKE

Mijeloproliferativne neoplazije (MPN) predstavljaju grupu hematoloških malignih oboljenja koju karakteriše klonalna proliferacija maligno izmenjenih ćelija mijeloidne krvne loze u kostnoj srži. Mutacioni događaj dešava se na nivou hematopoetske matične ćelije [1, 2], pri čemu ćelije zadržavaju potencijal da se diferenciraju. Karakterišu se povećanom osetljivošću na faktore rasta, što rezultuje povećanjem broja terminalno diferenciranih ćelija mijeloidne krvne loze (eritrociti, trombociti, granulociti) u perifernoj krvi. Transformacija u akutnu mijeloidnu leukemiju predstavlja kasnu komplikaciju u jednom broju slučajeva. Prema kriterijumima Svetske Zdravstvene Organizacije iz 2008. godine, ovoj grupi oboljenja pripadaju policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET), primarna mijelofibroza (PMF), hronična mijeloidna leukemija BCR-ABL pozitivna, hronična neutrofilna leukemija, hronična eozinofilna leukemija, mastocitoza i neklasifikovane MPN bolesti [3].

Termin “mijeloproliferativne bolesti” prvi je upotrebio William Dameshek 1951. god. da bi opisao grupu od četiri bolesti: esencijalna trombocitemija, policitemija vera, primarna mijelofibroza i hronična mijeloidna leukemija (HML) [4]. Ova oboljenja se sada nazivaju “klasične mijeloproliferativne bolesti”; kako se HML izdvojila svojim specifičnim molekularnim markerom - Bcr-Abl fuzijom („Filadelfija hromozom“), ostale tri bolesti se nazivaju Filadelfija hromozom- negativne bolesti, ili mijeloproliferativne neoplazije u užem smislu. Ova tri oboljenja, iako veoma različita, dele mnoge zajedničke karakteristike, što govori o zajedničkom molekularnom uzročniku.

Prva uočena karakteristika ovih bolesti je povećana osetljivost tumorskih ćelija na faktore rasta (eritropoetin), što dovodi do rasta eritrocita u ćelijskoj kulturi bez prisustva eritropoetina, dok normalne ćelije u ovim uslovima podležu apoptozi [5, 6]. Ovaj proces, koji se naziva endogeno eritrocitno formiranje kolonija, dugo je bio najvažniji kriterijum u dijagnostici ovih bolesti. Hipersenzitivnost nije specifična za eritropoetin, već uključuje i druge citokine: interleukin 3, SCF (*Stem Cell Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) i trombopoetin [7, 8]. U fiziološkim uslovima broj eritrocita

regulisan je eritropoetinom na sledeći način: povećanje broja eritrocita u krvi isključuje produkciju eritropoetina u bubrezima, što rezultuje smanjenom proliferacijom matične ćelije u kostnoj srži. To vodi normalizaciji broja eritrocita u cirkulaciji. Međutim, maligne ćelije ovih bolesnika mogu da proliferišu i u odsustvu eritropoetina, tako da iako je nivo eritropoetina nizak, maligni klon proliferiše i potiskuje normalnu populaciju ćelija. Ova pojava je prisutna kod svih pacijenata sa PV, gde je populacija malignih ćelija prilično homogena. Međutim, prisutna je samo kod polovine pacijenata sa ET, gde je primećeno da su tumorske ćelije heterogene i da ne postoji dominacija jednog kolna [9].

MPN se prema kriterijumima Orphanet-a [10] ubrajaju u retke bolesti sa godišnjom incidencom od 24/100 000 za ET, 30/100 000 za PV i 2.7/100 000 za MF u evropskoj populaciji. Ove bolesti su karakteristične za starije životno doba (preko 65 godina), mada se mogu javiti bilo kada tokom života. Dužina života osoba sa ET je slična kao u normalnoj populaciji, kod PV je nešto skraćena usled težih komplikacija [11], dok je prosečna dužina preživljavanja kod MF do 5 godina [12]. Ne postoji suštinska razlika po osnovi pola, mada pol ima uticaja na izvesne karakteristike bolesti. Ove bolesti dele zajedničke kliničke manifestacije kao što je rizik za razvijanje tromboza, evolucija u sekundarnu mijelofibrozu (ET i PV) i transformacija u akutnu mijeloidnu leukemiju (AML). Jedna od značajnih karakteristika ovih hematoloških maligniteta je njihova nasledljivost. Dve ishodne studije koje su se bavile familijarnim slučajevima MPN obuhvatile su 72, odnosno 20 porodica sa bar 2 obolela člana i okarakterisale su neke njihove osobine: članovi familije mogu imati različite MPN bolesti, ne nasleđuje se *JAK2-V617F* mutacija (ona je obeležje ovih bolesti i biće objašnjena kasnije) već predispozicija da se bolest dobije i eventualno stekne *JAK2-V617F* mutacija [13, 14]. Velika studija na 11039 pacijenata, 24577 njihovih srodnika i 43550 kontrola, koja je sprovedena u Švedskoj korišćenjem nacionalnih medicinskih registara [15] pokazala je da je kod MPN incidenca pojave nekog mijeloproliferativnog oboljenja kod srodnika povećana 5 do 7 puta u odnosu na normalnu populaciju, a pokazano je da je povećan rizik za nastanak i drugih vrsta kancera [16].

Esencijalna trombocitemija

Karakterise se povećanjem broja trombocita u krvi, mada se po nekad javlja i povećanje broja eritrocita i granulocita. Bolest dugo može da bude asimptomatska, dijagnostikuje se prisustvom više od $450 \times 10^9/L$ trombocita duže od 1 meseca, ako su isključeni ostali mogući uzročnici. Usled uvećanja broja trombocita u perifernoj krvi, dolazi do uvećanje slezine i jetre i komplikacija koje se odnose na stvaranje trombova u krvnim sudovima. Simptomi se najčešće povezuju sa arterijskim i ređe sa dubokim venskim trombozama. Leukemijska transformacija se javlja kod 4-8% slučajeva [17], dok se transformacija u mijelofibrozu javlja u oko 3-15 % slučajeva [18]. Lečenje zavisi od broja trombocita: ukoliko je broj trombocita do $1000 \times 10^9/L$, lečenje se vrši samo antikoagulacionim lekovima (aspirinom), a u slučaju da broj trombocita pređe ovu granicu, primenjuju se citostatici, obično hidroksiurea.

Policitemija vera

Kod PV dolazi do povećanja broja eritrocita, ali i svih ostalih krvnih ćelija mijeloidne loze, što znatno opterećuje krvne sudove i rad perifernih organa, pa se uvećavaju jetra i slezina, a česta su krvarenja usled pucanja krvnih sudova. Transformacija u mijelofibrozu se javlja u oko 6% slučajeva [19], u AML u 4-8% slučajeva [17]. Najčešće se u lečenju ove bolesti koristi terapijsko ispuštanje krvi (flebotomija). Kao dopuna se ordiniraju antikoagulacioni lekovi (aspirin, varfarin, kumarin). Kod ozbiljnih slučajeva dolazi u obzir i hemioterapijsko lečenje.

Mijelofibroza

MF predstavlja najtežu od MPN bolesti sa najkraćim vremenom preživljavanja – oko 5 godina. Ona može biti tzv. idiopatska ili primarna mijelofibroza i sekundarna, odnosno nastala transformacijom iz PV, ET ili nekih drugih bolesti. To je specifično oboljenje u kome se kostna srž zamenjuje fibroznim tkivom, tako da postaje aplastična,

to jest ne produkuje krvne ćelije. Međutim, fibroblasti nisu deo malignog procesa i fibroza predstavlja reakciju ćelija strome kostne srži na maligni proces [20]. Obzirom na progresivnu zamenu medularnog tkiva fibrozim, proces eritropoeze se izmešta ekstramedularno, odnosno odvija se u jetri i slezini. Najčešće se MF dijagnostikuje u kasnoj fazi, kada je već prisutna anemija i smanjenje broja krvnih ćelija. Krvarenja povezana sa smanjenim brojem trombocita su često prisutna. Uzroci smrti najčešće su infekcije, leukemijska transformacija, krvarenje, srčane komplikacije i komplikacije vezane za jetru. Presađivanje koštane srži je jedini postupak koji dovodi do izlječenja. Od 2010. god u upotrebi je prvi molekularni terapeutik primenjen u lečenju MPN bolesti – ruxolitinib, koji je inhibitor JAK1 i JAK2 proteina (Jakafi, Novartis). Ovaj lek uspešno produžava život ovim pacijentima, iako ne deluje direktno na matičnu ćeliju u kojoj se nalazi uzrok bolesti [21].

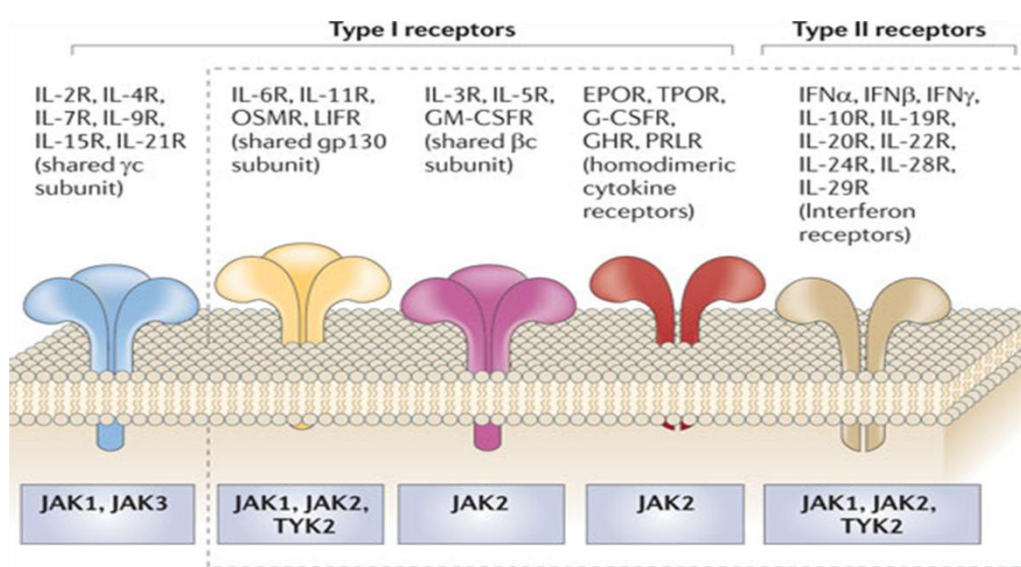
MOLEKULARNI MARKERI U MPN

MPN pripadaju široj grupi tzv. klasičnih MPN zajedno sa hroničnom mijeloidnom leukemijom (HML). HML je prvo maligno oboljenje kome je određen molekularni marker, odnosno Bcr-Abl fuzija, koji se citogenetski vidi kao Filadelfija hromozom, a zapravo nastaje kao posledica recipročne translokacije dela dužeg kraka hromozoma 9 na ostatak dužeg kraka hromozoma 22, tj. t(9;22)(q34;q11). Gen Abelson (Abl) je membranska tirozin kinaza i kada se translocira u blizinu Bcr gena nastaje himerni proteinski produkt sa konstitutivnom tirozin kinaznom aktivnošću. Fosforilacija nizvodnih proteina, koji su uljučeni u različite fundamentalne ćelijske procese, dovodi do patološkog povećanja broja mijeloidnih ćelija. Sve do najznačajnijeg otkrića u razumevanju geneze MPN - JAK2-V617F mutacije 2005. godine, ostale MPN su nazivale su se Filadelfija hromozom- negativne mijeloproliferativne bolesti.

Različite citogenetske abnormalnosti prisutne su u MPN, uključujući trizomiju 9, trizomiju 8, delecije 20q i 13q [22]. Njihov značaj u dijagnostici ovih bolesti nije veliki, ali su izuzetno značajne jer ukazuju na potencijalne markere uključene u patogenezu ovih bolesti.

JANUS KINAZE

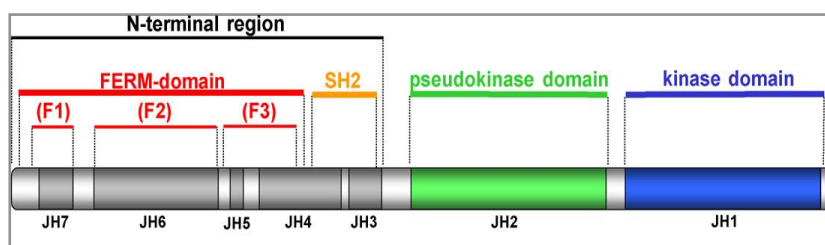
Janus kinaze (JAK) su familija membranskih tirozin kinaza koje su spregnute sa citokinim receptorima i prenose signale nizvodno od tipa I i tipa II citokinih receptora do jedra posredstvom signalnih prenosilaca i regulatora transkripcije STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) proteina [23, 24]. Glavni signalni put aktivacije receptora za faktore rasta u hematopoetskom tkivu čini transdukcijska kaskada JAK/STAT puta, na čijem vrhu se nalazi familija Janus kinaza (Slika 1).



Slika 1. JAK/STAT signalni put. Proliferacija, preživljavanje i diferencijacija različitih hematopoetskih linija su procesi fino regulisani lučenjem citokina. Citokini vrše svoje biološke efekte vezivanjem za receptore na površini ćelije. Tip I i tip II citokini receptori nemaju sopstvenu tirozin-kinaznu aktivnost, već se oslanjaju na receptor- vezane Janus kinaze da bi preneli svoje signale u citoplazmu. Preuzeto iz Quintás-Cardama *et al.*; Nature Reviews Drug Discovery (2011) [25].

Identifikovana su četiri člana JAK familije (JAK1, JAK2, JAK3 i Tirozin kinaza 2-TYK2). Svi članovi JAK familije poseduju sedam JH (JAK homology) domena organizovana u četiri regiona: JH1, koji je katalitički (kinazni) domen; JH2 - katalitički-neaktivan (pseudo-kinazni) domen; domeni JH3 i JH4, koji dele homologiju sa SH2 domenom (Src-homology-2) i JH4-JH7, koji čine FERM domen (4.1 protein, ezrin, radixin, moesin) (Slika 2). FERM domen je odgovoran za vezivanje JAK proteina za citosolne domene citokinih receptora. Pseudokinazni domen JH2 je strukturno sličan

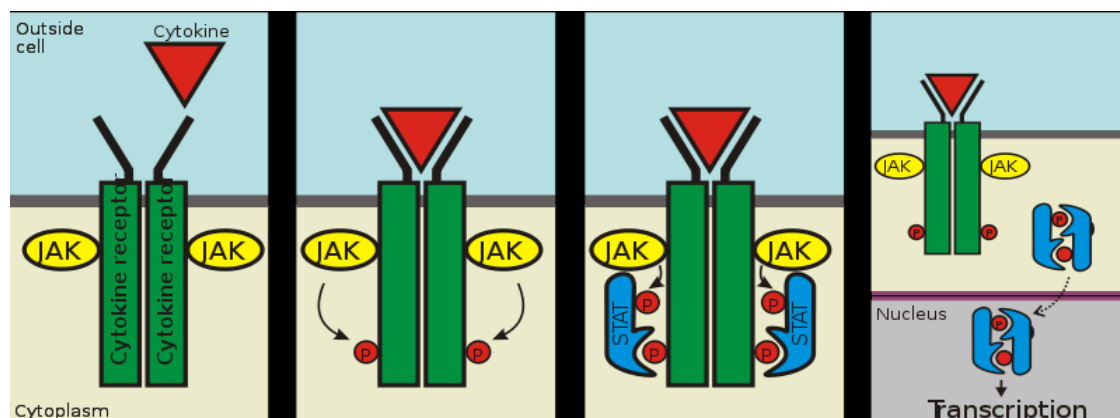
tirozin- kinaznom domenu, uključujući tirozinske rezidue u aktivacionoj petlji i esencijalan je za normalnu kinaznu aktivnost, iako je sam ne poseduje [26]. On zapravo ima autoinhibitornu ulogu koja u normalnim uslovima negativno reguliše kinaznu funkciju JAK2 proteina [27].



Slika 2. Opšta struktura Janus kinaza. JH: JAK Homology Region, SH2: Src Homology 2 Domain, FERM domen, odgovoran za interakciju sa citokinim receptorima. Preuzeto iz Haan, C *et al.* Biochemical Pharmacology (2006) [28].

Članovi familije JAK proteina komuniciraju sa različitim citokinima. JAK1 posreduje signale sa IFN-alfa, beta, gama i IL-2 i IL-6 receptora. JAK2 prenosi signale sa IL-3, GM-CSF i eritropoetina. JAK3 asocira sa gama lancem IL-2 receptora, dok se TYK2 vezuje za proteine IFN-1, IL-6, IL-10, IL-12 i IL-23.

JAK proteini se aktiviraju preko inter- i intra- molekularnih fosforilacija kada se za citokini receptor veže njegov odgovarajući ligand. Nakon vezivanja liganda dolazi do autofosforilacije JAK proteina i dimerizacije receptora. Fosforilisani JAK protein uspostavlja kontakt sa citoplazmatičnim domenom receptora što regrutuje STAT proteine, koji se takođe fosforilišu posredstvom JAK proteina, dimerizuju i translociraju se u jedro, gde dovode do aktivacije ekspresije različitih gena koji su uključeni u brojne ćelijske procese kao što su proliferacija, diferencijacija i apoptoza [23, 24] (Slika 3).



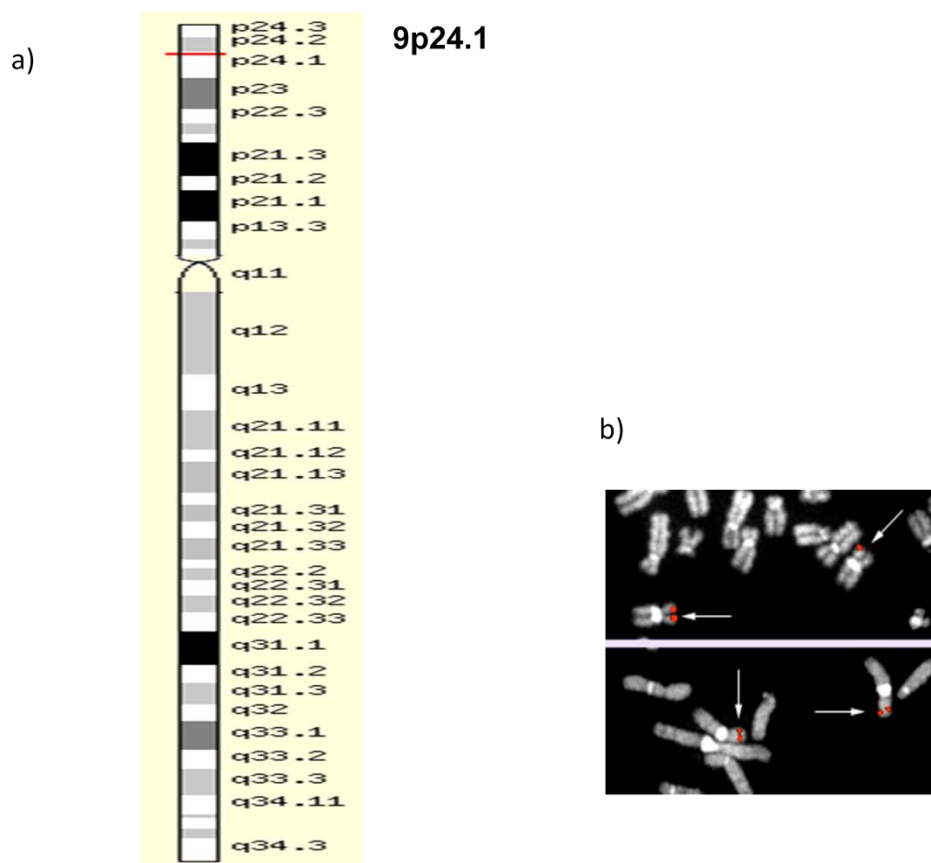
Slika 3. Šematski prikaz mehanizma aktivacije signalnih puteva posredstvom Janus kinaza. Preuzeto iz answers.com [29].

JANUS KINAZA 2

Gen za Janus kinaza 2 (*JAK2*) nalazi se na kraćem kraku hromozoma 9 u regionu 9p24.1; ima 25 egzona i prostire se na oko 140 kb genomske DNK; kodira protein koji ima 1132 amino kiseline i oko 130,7 kDa. Nalazi se uz ćelijsku membranu sa citosolne strane i spregnut je sa receptorima za citokine. *JAK2* se vezuje za nekoliko citokinih receptora uključujući sve receptore koji deluju kao homodimeri (eritropoetin, receptor za trombopoetin, hormone rasta), neke heterodimerne receptore (IL-3, GM-CSF, IL5-R I Gp130 familiju receptora) i interferon γ R2 [30]. *JAK2* deficijenti miševi umiru u E12.5 od anemije, imaju u potpunosti defektnu eritropoezu i poremećaje vezane za faktore rasta i prolaktin-posredovanu aktivaciju STAT5 u ćelijama mezodermalnog i ektodermalnog porekla [31].

Da je glavna meta za identifikovanje molekularnih promena koje leže u osnovi MPN-a upravo *JAK2* tirozin kinaza, dokazano je 2005. godine, kada su četiri grupe naučnika nezavisno otkrile aktivirajuću somatsku mutaciju u autoinhibitornom regionu *JAK2* gena – *JAK2*-V617F mutaciju. Primenili su različitih pristupe: James i sar. su pokazali da je korišćenjem *JAK2* kinaznih inhibitora i inaktivacijom ekspresije pomoću siRNK tehnologije, moguće sprečiti formiranje eritropoetin-nezavisnih eritroidnih kolonija kod policitemije vere [32]. Ovo je vodilo ka sekvenciranju i otkriću mutacije u JH2 pseudokinaznom domenu *JAK2* gena. Kralovics i sar. su identifikovali gubitak heterozigotnosti regiona na kratkom kraku hromozoma 9 (9p24.1) kod pacijenata sa PV i na njemu našli region od 6.2 Mb koji je od gena za tirozin kinaze, za kojima su autori

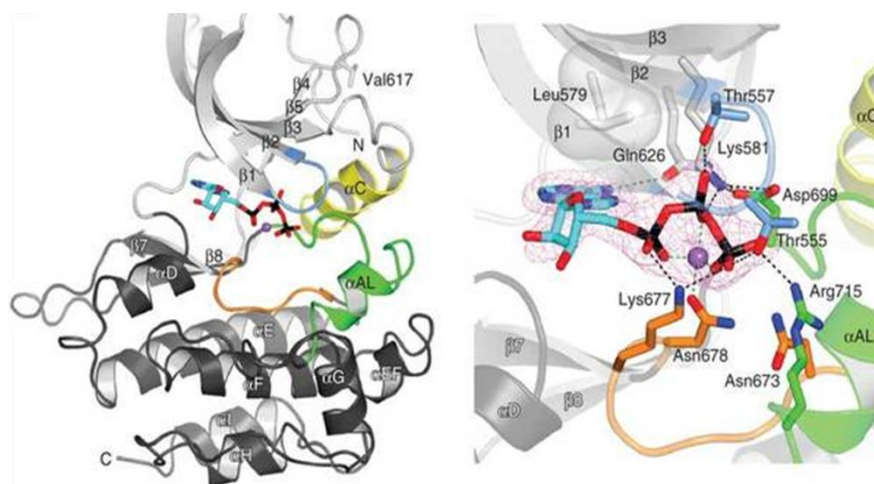
ciljano tragali, sadržavao jedino *JAK2* gen (Slika 4) [33]. Korišćenjem metode sekvenciranja kompletnog *JAK2* gena [34] i sekvenciranjem autoinhibitornih domena i aktivacionih petlji još 85 kinaza, i ostale grupe su došle do istog otkrića [35].



Slika 4. Genomska lokacija *JAK2* gena. a) Hromozom 9p24.1. Crvena linija predstavlja lokalizaciju *JAK2* gena; b) FISH na metafaznim hromozomima sa probom za *JAK2* gen. Preuzeto iz <http://atlasgeneticsoncology.org> [36].

JAK2-V617F mutacija je stečena aktivirajuća somatska mutacija koju karakteriše transverzija nukleotida G u nukleotid T na poziciji 1849 (c.1849G>T) u egzonu 14 *JAK2* gena. Na proteinskom nivou ova transverzija dovodi do zamene aminokiseline valin u fenilalanin na poziciji 617 (p.Val617Phe). Zamenom aminokiseline valin dosta većim fenilalaninom, destabilizuje se konformacija JH2

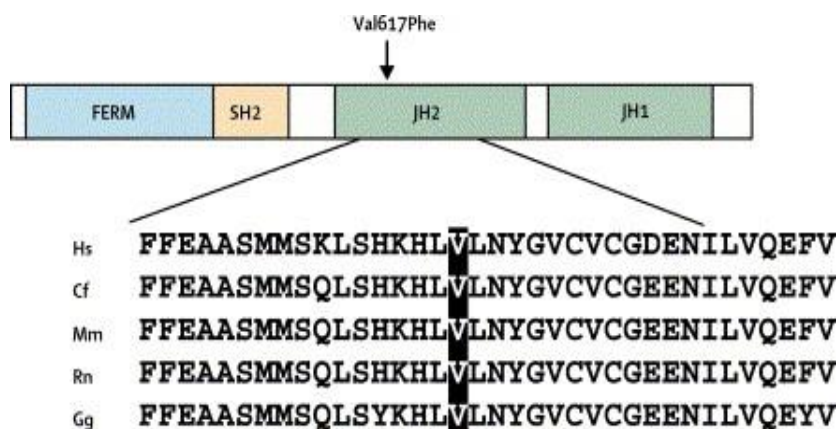
domena koji gubi svoju autoinhibitornu ulogu i postaje konstitutivno aktivan. Ovom „missense“ mutacijom se obezbeđuje konstantna aktivnost proteina, što dovodi do povećane osetljivosti ćelija na dolazeće stimulse, kao što su faktori rasta. Prisustvo mutacije donosi proliferativnu prednost ćelijama koje je poseduju, izazivajući klonalnu ekspanziju hematopoetskih progenitora. Najnovija studija iz jula 2012. godine otkriva nove osobine autoinhibitornog JH2 domena na osnovu analize kristalne strukture JAK2 proteina [37]. Studija pokazuje da JH2 domen zauzima prototipsku protein kinaznu strukturu. Kao i druge kinaze, Mg-ATP vezivno mesto nalazi se u rascepu između N- i C-terminalnog lobusa. Autori, međutim, pokazuju nekanonski model vezivanja Mg-ATPa, kojim se objašnjava niža stopa bazalne aktivnosti u poređenju sa katalitičkim JH1 domenom. Od velikog je interesa otkriti efekat V617F mutacije na strukturu JH2 domena. Val617 se nalazi u petlji N lobusa. Dok V617F mutacija ne utiče na vezivanje nukleotida, ona utiče na rigidnost α C heliksa N lobusa, koji olakšava aktivaciju JH1 domena (Slika 5).



Slika 5. Prikaz kristalne strukture JH2 domena JAK2 gena. N lobus JH2 je prikazan svetlo sivo izuzev nukleotid-vezujuće petlje (plavo) i α C (žuto). C lobus je prikazan tamno sivo izuzev katalitičke petlje (narandžasto) i aktivacione petlje (zeleno). Preuzeto iz Bandaranayake, *et al.* Nature Structural & Molecular Biology (2012) [37].

O važnosti ovog regiona govori podatak da je valin na poziciji 617 konzerviran i kod JAK1 i TYK2 proteina. Homologi mutanti JAK1 V658F and TYK2 V678F su takođe aktivni u proliferaciji i pronađeni su u humanim kancerima i autoimunim oboljenjima [38]. Ovaj region evolutivno je očuvan među kičmenjacima, kao i

aminokiselina valin na poziciji 617 (Slika 6).



Slika 6. Dijagramski prikaz JAK2 FERM, SH2, JH2 i JH1 domena, zajedno sa upoređenjem dela JH2 domena. Hs=*Homo sapiens*. Cf=*Canis familiaris*. Mm=*Mus musculus*. Rn=*Rattus norvegicus*. Gg=*Gallus gallus*. Preuzeto iz Baxter *et al.* Lancet (2005) [34].

Otkriće *JAK2-V617F* mutacije predstavljalo je pravi proboj u razumevanju patogeneze MPN i bacilo sasvim novo svetlo na sličnosti i razlike tri oboljenja objedinjena ovim imenom. Preko 100 studija koje su analizirale kliničke i druge efekte ove mutacije pojavilo se u kratkom vremenskom periodu. One su pokazale da je ova mutacija prisutna kod 75-98% pacijenata sa policitemijom verom i kod 39-75% pacijenata sa esencijalnom trombocitemijom i mijelofibrozo [32-35, 39, 40]. Pronađena je u manjem procentu i kod drugih oboljenja (hronična mijelomonocitna leukemija, mijelodisplastični sindrom, Bcr-Abl negativna CML, megakariocitna leukemija [41], vrlo retko u akutnoj mijeloidnoj leukemiji [42], ali nikad kod zdravih ljudi [40]. Prisutna je u ćelijama mijeloidne loze, a nije detektovana u B i T limfocitima [43]. Pokazano je da je *JAK2-V617F* mutacija odgovorna za biološke karakteristike MPN, kao što su endogeno eritroidno formiranje kolonija, povećana ekspresija gena za *PRV1* (*Polycithaemia Rubra Vera*) i deregulaciju apoptoze preko anti-apoptotskog *BCL-xL* gena [44, 45]. Pokazano je da prisustvo mutacije dovodi do povećanog nivoa hemoglobina, povećane eritropoeze i granulopoeze, sa vrlo malim uticajem na megakariopoezu [46-48]. Takođe, prisutan je smanjen nivo serumskog eritropoetina, i što je najvažnije, povoljniji je odgovor na terapiju citostaticima [49].

Ova prva istraživanja su bila veoma obećavajuća i očekivalo se da je ova

mutacija jednoznačni marker proliferacije mijeloidnih ćelija u MPN analogno Bcr-Abl tirozin kinazi kod CML. Molekularni terapeutici napravljeni da suprimiraju JAK2 tirozin kinaznu aktivnost već su ušli u kliničku primenu [21]. Međutim, već sa prvim otkrićima došlo se i do nalaza koji su pokazali velike specifičnosti ove mutacije i ukazali na mnogo heterogeniju situaciju nego što je slučaj u CML. Činjenica da je ista mutacija pronađena u nekoliko različitih oboljenja, da je prisutna samo kod 50% ET i MF pacijenata, dovela je do pitanja da li je ova mutacija onkogeni događaj koji uzrokuje MPN ili je samo biomarker ovih bolesti. Međutim, nekoliko dokaza ukazalo je da je JAK2-V617F mutacija onkogeni događaj, bar u slučaju za PV:

- JAK2-V617F mutacija izaziva preosetljivost na citokine na mišijim ćelijskim linijama i primarnim humanim ćelijskim linijama, što je glavno MPN obeležje [32]
- JAK2-V617F pogađa hematopoetsku stem ćeliju [1, 2]
- Over- ekspresija JAK2-V617F izaziva povećanje ekspresije nekih PV biomarkera, kao što gen za *PRVI* [44]

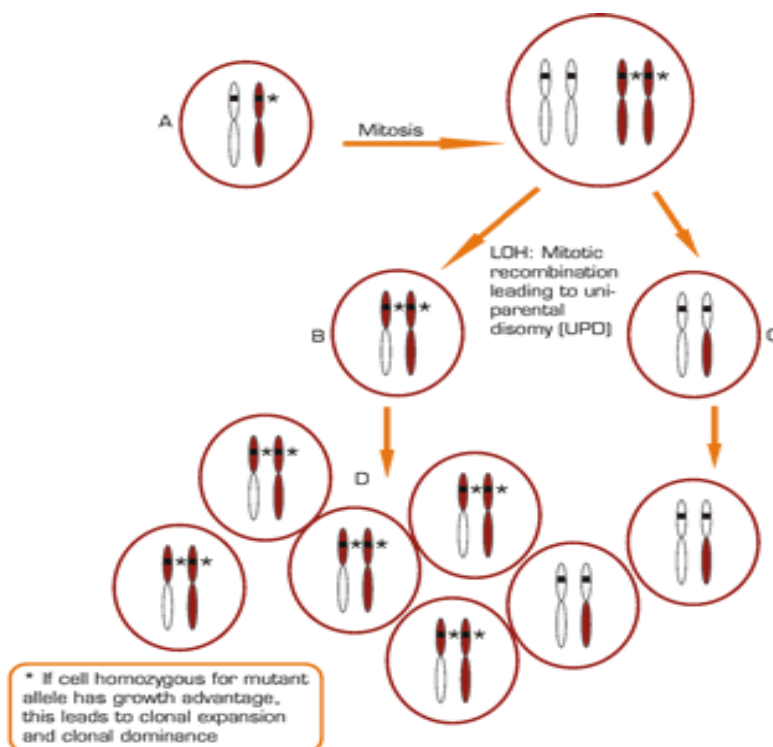
U prilog ovome došao je rezultat iz studije retroviralnog modela u kome su JAK2-V617F matične ćelije transdukovane u ozračenog miša . Domaćini su pri visokim dozama JAK2-V617F gena razvili značajnu eritrocitozu sa odlikama PV, uz umerenu ili značajnu leukocitozu, ali nisu imale efekat na povećanje trombocita [46-48]. Ovim nalazom bi se molekularna osnova PV u potpunosti mogla objasniti V617F mutacijom. Osobine druga dva oboljenja su značajno komplikovanije.

Gubitak heterozigotnosti

Kao i u drugim kancerima [50, 51], gubitak heterozigotnosti (*loss of heterozygosity* - LOH) je primećen kod MPN pacijenata, a povezan je sa regionom 9p24.1 [52]. Gubitak heterozigotnosti nastaje kao rezultat mitotičke rekombinacije; tokom mitoze dolazi do sparivanja ne- sestrinskih hromatida i razmene genetskog materijala (Slika 7). U slučaju da je jedan JAK2 alel mutiran, ćerka ćelija postaje homozigotni nosilac mutacije. Što je posebno značajno, među mutiranim ćelijama neke

nose jednu, a neke dve kopije mutiranog alela. Ovakve ćelije imaju veliki proliferativni kapacitet, tako da potiskuju *wt* klon, te se stoga kod nekih PV bolesnika detektuje samo mutirani alel [32-35, 52]. Ovi pacijenti su nazvani "homozigoti" za *JAK2-V617F* mutaciju.

Za razliku od pacijenata sa PV, kod ET se mitotička rekombinacija vrlo retko dešava [53].

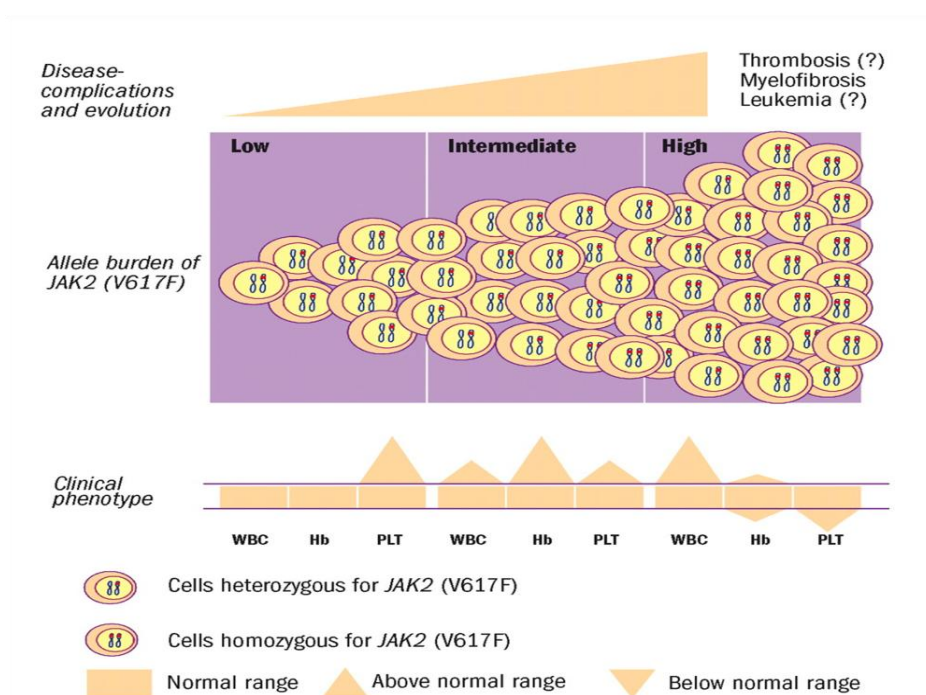


Slika 7. Mehanizam 9pLOH. Gubitak heterozigotnosti putem mitotičke rekombinacije rezultuje uniparentalnom dizomijom (UPD). Tokom mitoze u ćeliji (A) koja je heterozigot za mutirani alel (obeleženo zvezdicom) mitotička rekombinacija između ne-sestrinskih hromatida rezultuje UPD; nastaju ćelije homozigoti za mutirani alel (B) ili homozigoti za *wt* alel (C). Preuzeto iz Mariluz *et al.* (2007) <http://www.hematology.org> [54].

Fenomen "doze gena"

JAK2-V617F mutacija je somatska, te je broj ćelija heterozigotnih nosilaca varijabilan. Ovo je osnova za teoriju "doze gena", koja pretpostavlja korelaciju između fenotipa bolesti i proporcije mutiranog alela. Zato je uveden koncept "allele burden"

koji predstavlja odnos između mutiranog V617F i *wt* alela u hematopoetskim ćelijama. Ovaj koncept je podržan eksperimentima na transgenim miševima gde se eksprimiranjem male doze mutiranog *Jak2* gena (oko jedne petine u odnosu na *wt* alel) razvija klinička slika esencijalne trombocitemije, dok se eksprimiranjem velike doze mutiranog gena dobija fenotip policitemije vere [55]. Studije na pacijentima su pokazale da procenat mutiranog alela ima uticaja na kliničku sliku bolesti i da predstavlja važan faktor u razgraničavanju ova tri oboljenja [56-58]. Kod pacijenata je pokazano da nizak nivo mutiranog alela dovodi do proliferacije megakariocitne loze kao kod ET, dok visok nivo mutiranog alela dovodi do veće proliferacije eritrocita, kao kod PV, kao i da linarno koreliše sa brojem leukocita [56, 59-61]. Tako izgleda da je doza V617F alela kritična za ravnotežu između povećane eritropoeze i povećana trombopoeze, čime se razgraničavaju PV i ET fenotip (Slika 8).



Slika 8. Šematski prikaz "doze gena" ("allele burden") (srednji panel) i povezanost sa kliničkim fenotipom (donji panel), i komplikacijama bolesti (gornji panel). Na niskim nivoima mutantnog alela dominira trombocitoza, na srednjim eritrocitoza, a na visokim leukocitoza. Među komplikacijama, nalazi pokazuju vezu između količine alela i evolucije u mijelofibrozu. Preuzeto iz Passamonti *et al.* Haematologica (2009) [60].

Mehanizam kojim doza V617F alela može delovati predominantno na jednu lozu je nerazjašnjen. Sugerisano je da bi *JAK2-V617F* mutacija mogla da indukuje multipotentni progenitor u pravcu eritroidne loze preko fosforilacije GATA1 transkripcionog faktora na poziciji serin 310 [62]. Alternativno, suštinske biološke razlike MPL i EPO receptora ili veći nivo MPL na površini ćelije može objasniti da je MPL aktivacija osetljivija na niskim nivoima *JAK2-V617F* nego EPO- aktivacija.

Kada se odredi procenat mutiranog alela u granulocitima pacijenata sa MPN primećuje se da pacijenti sa ET imaju najniži procenat mutiranog alela, koji retko prelazi 50%, kod PV se kreće oko 60%, dok se post- PV mijelofibroza karakteriše najvećom zastupljenošću mutiranog alela (preko 80%). Ova pojava objašnjava se činjenicom da je kod pacijenata sa PV prisutan fenomen LOH, tako da se mutacija dovodi u homozigotno stanje. Proliferativni kapacitet ovakvog klona mnogostruko nadmašuje proliferaciju *wt* klona, te se kod ovih pacijenata detektuje mutirani alel u visokom procentu. Pojava mitotičke rekombinacije je još više prisutna kod post- PV mijelofibroze, a vrlo je retka kod ET. Stoga se očekuje da procenat zastupljenosti mutiranog alela značajno varira kod MPN pacijenata, od malih vrednosti (1% ili manje, zavisno od osetljivosti metode) pa do 100%, ukoliko je homozigotni maligni klon u potpunosti potisnuo *wt* klon.

Biološki kontinuum

Kada se posmatra esencijalna trombocitemija, uočava se da je polovina pacijenata pozitivna, a druga polovina negativna za V617F mutaciju. Na osnovu kliničke slike teško je razlikovati ova dva oboljenja, ali kada se pogleda mutacioni status, jasno se uočava da pacijenti sa mutacijom imaju veće sličnosti sa PV fenotipom nego sa ET fenotipom (niži serumski eritropoetin, aktivnija eritropoeza i granulopoeza, niži nivo trombocita) [49]. Zato se pretpostavlja da V617F pozitivna ET i V617F pozitivna PV predstavljaju biološki kontinuum. Dodatno je uočeno i da pacijenti sa ET sa mutacijom mogu da progrediraju u *JAK2-V617F* pozitivnu PV [49]. Pretpostavljeno je i da V617F negativna ET predstavlja ‘pre-*JAK2*’ stanje, i da pacijenti tokom progresije bolesti mogu da steknu *JAK2* mutaciju. Ipak, ovo nije naišlo na potvrdu, jer

su istraživanja pokazala da V617F negativni pacijenti ostaju negativni tokom dužeg perioda praćenja [22]. Ovi podaci ukazuju da V617F negativna i V617F pozitivna ET predstavljaju odvojene bolesti, pre nego dve faze iste bolesti [22].

U ovom kontekstu MF se može shvatiti kao agresivna forma ET i PV, u kojoj u slučaju PV dolazi do ekspanzije homozigotnog *JAK2-V617F* klona. Neki mišiji modeli pokazuju da PV transformiše u MF sa starenjem [46-48]. Ipak, nije isključeno da još uvek nepoznati genetički ili epigenetički defekt dovodi do progresije ovih bolesti u MF.

46/1 haplotip

Nekoliko važnih osobina MPN ukazale su da postoji nasledljivi faktor koji na neki način utiče da dođe do bolesti. Somatske mutacije su objasnile fenotipske karakteristike ovih bolesti, ali su još nalazi na mišijim modelima pokazali da od genetičkog “background”-a zavisi kako će se mutacija ispoljiti. Naime, kada je korišćen soj C57Bl/6 miševa, ekspresija *Jak2-V617F* mutacije dovela je do pojave eritrocitose sa niskom leukocitozom. Kada su korišćeni Balb/c miševi, uz eritrocitozu javila se dramatično povećana leukocitoza i fibroza. Uticaj naslednog faktora na predispoziciju da bolest nastane kod određene individue posebno su istakle studije u kojima se opisuju familije sa nekoliko obolelih članova [13, 14], a naročito velika populaciona studija u kojoj je pokazano da prvi srodnici imaju 5-8% veću šansu da obole od MPN ukoliko su u porodici već imali neku od ovih bolesti [15]. U ovim studijama je postalo jasno da *JAK2-V617F* mutacija nije nasledna, već određena genetička predispozicija uzrokuje da se bolest dogodi i eventualno stekne onkogeno mutacija. Klinička slika bolesti u familijarnim slučajevima ista je kao i sporadičnim, i što je najvažnije i što pokazuje da su ova heterogena oboljenja ipak slična u svojoj genetičkoj osnovi, u familijama se ne nasleđuje obavezno isto MPN oboljenje, već kroz porodično stablo može da se pojavi bilo koja od tri MPN bolesti [14].

Najvažniji događaj u rasvetljavanju patogeneze MPN bolesti nakon pronalaska *JAK2-V617F* mutacije desio se 2009. godine, kada su tri grupe naučnika otkrile haplotip koji predstavlja predisponirajući faktor za sticanje *JAK2-V617F* mutacije [63-65]. Ovaj haplotip obuhvata nekoliko SNP-ova koji se nalaze u *JAK2* genu, a po vrsti nukleotida

na određenim pozicijama nazvan je GGCC ili 46/1 haplotip (Slika 9). Pokazano je da je *JAK2*-V617F mutacija prisutna u 80% slučajeva kada je na određenom mestu u haplotipu prisutan specifični alel koji čini ovaj haplotip. Dalja istraživanja preduzeta su da bi se videlo da li haplotip ima uticaj da se steknu i druge somatske mutacije tipične za MNP, konkretno mutacije u genu za trombopoetin. Rezultati su bili oprečni, jer je prva studija pokazala da ovaj haplotip predstavlja predispoziciju za sticanje MPL mutacije [66], dok su rezultati studije drugih autora pokazali suprotno [67]. Uprkos očekivanjima, pokazano je da kod familijarnih MPN ovaj haplotip nije nasledan [16].

	rs691857	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G
	rs17803986	G	G	G	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	G	A
	rs3780367	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T
	rs10974944	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	C
	rs12343867	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
	rs1159782	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
	rs10758677	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	A
	rs7848509	C	T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	T	T	C	T	C

Slika 9. Ispitanici sa 9pUPD imaju haplotip na kome se stiće *JAK2*-V617F. Svaki ispitanik (kolona) je genotipiziran na osam SNP-ova (redovi). Najčešći haplotip (GGCC) koji predisponira nastanak onkogene *JAK2*-V617F mutacije je označen žutom bojom. Strelica pokazuje položaj *JAK2*-V617F mutacije u odnosu na analizirane SNP. Preuzeto iz Olcaydu *et al.* Nature Genetics (2009) [63].

O mehanizmu delovanja 46/1 haplotipa postoje dve hipoteze. Prva hipoteza nazvana “teorija hipermutabilnosti” pretpostavlja da haplotip destabilizuje lokus u kome se nalazi *JAK2* gen i na tom hipermutabilnom terenu se dešava ova onkogeno mutacija. Druga hipoteza “plodnog tla” objašnjava da se *JAK2* mutacija dešava sa istom verovatnoćom na različitim haplotipovima, ali kada se desi na 46/1 haplotipu, to dovodi ćelije u proliferativnu prednost. U prilog prvoj hipotezi idu otkrića da se *JAK2*-V617F mutacija dešava više puta kod istog pacijenta, jer su pronađeni pacijenti koji u svojim klonovima nose mutaciju na različitim alelima [63]. U prilog druge tvrdnje stoji najnovije otkriće da se u promotoru *JAK2* gena nalazi SNP koji je asociran sa MPN, za koji je pokazano dejstvo na transkripciju u *in vitro* uslovima, a autori smatraju da on dovodi do povećane ekspresije *JAK2* gena kod MPN pacijenata [68]. Na ovaj način bi

haplotip dvojako doprinosio potencijalu maligne ćelije: s jedne strane podizanjem nivoa ekspresije *JAK2* gena, a sa druge doprinosom da se stekne *JAK2-V617F* mutacija. *JAK/STAT* put bi time bio dvojako stimulisan, što bi doprinosilo proliferativnoj prednosti ovim ćelijama.

OSTALI MOLEKULARNI MARKERI MPN

JAK2-V617F mutacija prisutna je kod većine pacijenata sa PV i smatra se da je kod njih ova mutacija uzrok fenotipskih karakteristika ove bolesti. Uzrok bolesti kod ostalih 3% pacijenata sa PV, kao i kod 50% ET i MF pacijenata kod kojih nije detektovana *JAK2-V617F* mutacija postao je predmet istraživanja. Pokazano je da kod MPN pacijenata postoje i mutacije u drugim genima koje mogu da koegzistiraju sa *JAK2-V617F* mutacijom, ali mogu i samostalno da utiču na patogenezu MPN bolesti. Ove mutacije pronađene su u signalnim putevima koji interaguju sa *JAK/STAT* putem, ali ima i onih koje su deo drugih signalnih puteva.

Mutacija u egzonu 12 *JAK2* gena

Mutacije u egzonu 12 *JAK2* gena tipično se nalaze kod PV *JAK2-V617F* negativnih pacijenata [69]. *JAK2* egzon 12 mutacije uključuju in-frame delecije, tačkaste mutacije i duplikacije, najčešće pogađajući konzervisani region od sedam aminokiselina (F537–E543). Delovanje na ćelijskom nivou kao i klinički efekti veoma su slični efektima *JAK2-V617F* mutacije u 14 egzonu [69].

Mutacije u genu za trombopoetin

Supstitucija guanina timidinom na poziciji 1544 u genu za trombopoetin (MPL-*Myeloproliferative Leukemia Virus*) rezultuje u zameni aminokiseline triptofan leucinom u kodonu 515 na proteinskom nivou (MPLW515L) [70]. Ova transverzija u egzonu 10 prisutna je kod 5 do 10% *JAK2-V617F* negativnih pacijenata koji boluju od ET i MF, dok nikada nije detektovana kod pacijenata sa PV [70, 71]. To je somatska

mutacija prisutna najverovatnije u megakariocitnim prekursorima ovih pacijenata i odgovorna je za trombopoetin- nezavistan rast *MPL-W515L* pozitivnih kolonija u ćelijskoj kulturi. Western blot analiza pokazala je konstitutivnu fosforilaciju JAK/STAT signalnih proteina, uključujući JAK2, STAT3 i STAT5. Nizvodni ciljni protein ovog puta su takođe aktivirani (RAS/MAPK and PI3K/AKT put), čime se u potpunosti potvrđuje uticaj ove mutacije na nastanak bolesti kod *MPL-W515L* pozitivnih pacijenata. Mišiji model je takođe potvrdio da ekspimiranje *Mpl-W515L* alela, ali ne i *Mpl wt* alela, dovodi do fenotipske manifestacije bolesti koja pokazuje povećanje trombocita i leukocita, ali ne i eritrocita, što podseća na kliničku sliku ET. Pojava fibroze u kostnoj srži podražava kliničku sliku mijelofibroze, čime se pokazuje da ova mutacija ima efekat na sudbinu ćelija megakariocitne loze, dok *JAK2-V617F* mutacija očigledno ima efekat na sudbinu eritrocita. U egzonu 10 *MPL* gena su prisutne i druge mutacije sa sličnim efektima [71].

Mutacije u *TET2* genu

TET2 (*Ten-Eleven Translocation-2*) gen pripada familiji od tri gena sa nepoznatom funkcijom koji se nalazi na dužem kraku hromozoma 4 u regionu u kome je primećen fenomen gubitka heterozigotnosti kod jednog broja MPN pacijenata [72]. Sekvenciranje ovog gena dovelo je do otkrića mutacija različitog tipa (missense, nonsense, frameshift, delecije) kod oko 14 do 17% MPN pacijenata koji nisu imali *JAK2-V617F* mutaciju i kod oko 7% pacijenata sa mutacijom [72, 73]. Analza limfocitne DNK pokazala je da su *TET2* defekti stečeni. Kod većine MPN pacijenata bile su oštećene obe kopije gena, što ukazuje da se *TET2* ponaša kao tumor supresor gen. Dodatne analize su pokazale da mutacije u *TET2* genu prethode *JAK2* mutaciji [73].

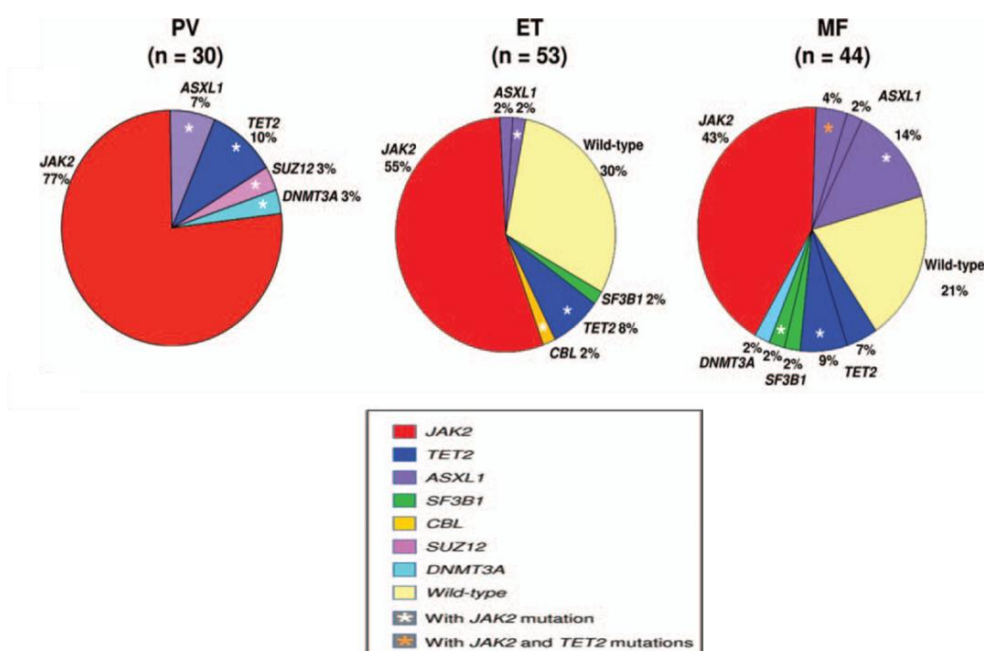
Mutacije u *CBL* genu

Gen *CBL* (*Casitas B-lineage lymphoma protooncogene*) nalazi se na hromozomu 11 (11q23.3) i ima dvojaku funkciju: negativno reguliše kinazne signalne puteve preko E3 ubikvitin ligazne aktivnosti i obavlja funkciju adaptornog proteina sa

pozitivnim efektom na te signalne puteve. Mutacije pogađaju egzone 8 i 9 i različitog su tipa. Mutirani CBL protein indukuje onkogeni fenotip kada se ekspirira u ćelijskim linijama i ćelije pokazuju rast nezavistan od faktora rasta [74]. Mutacije u *CBL* genu su stečene i retko se sreću u konjunkciji sa ostalim tipičnim MPN mutacijama [75]. Pronađene su kod 6% MF pacijenata, a vrlo su retke kod ET i PV bolesnika [76, 77].

MUTACIJE POVEZANE SA LEUKEMIJSKOM TRANSFORMACIJOM MPN

Mutacije u nekoliko gena povezane su sa leukemijskom transformacijom MPN. (*ASXL1*) Additional Sex Combs-Like 1 gen, geni *IDH 1* i *2* (Isocitrate dehydrogenase) i (*IKZF1*) *IKAROS* family zinc finger 1 retko se nalaze u hroničnoj fazi MPN, ali su pronađeni u ćelijama pacijenata koji imaju tzv. sekundarni AML, odnosno leukemiju kojoj je prethodila neka druga bolest. Kod ovakvih MPN pacijenata frekvencija nalaženja mutiranih gore navedenih gena je oko 5-20% [76] (Slika 10).



Slika10. Genske mutacije u “klasičnim” mijeloproliferativnim neoplazijama. Učestalost *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *JAK2*, *SF3B1*, *SUZ12* i *TET2* mutacija u PV, ET, i MF. ET: esencijalna trombocitemija, PV: policitemija vera MF: mijelofibroza., Preuzeto iz Brecqueville *et al.* Genes, Chromosomes and Cancer (2012) [77].

Mutacije u *FLT3* genu

Rast i diferencijacija hematopoetskih ćelija odvija se pod uticajem različitih faktora rasta i njihovih receptora. Jedan od ovih receptora je i tirozin kinaza FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), koji je član grupe tirozin kinaznih receptora tipa III [78]. Ovaj protein se uglavnom eksprimira na hematopoetskim matičnim ćelijama i učestvuje u kontroli njihove diferencijacije i proliferacije [79]. Opisane su dve klase aktivirajućih mutacija u genu za *FLT3* receptor: u prvu klasu ubrajaju se unutrašnje tandemske duplikacije (ITD) u egzonima 14 i 15, koje na proteinskom nivou dovode do insercije određenog broja aminokiselina [80]. U drugu klasu mutacija ubrajaju se supstitucije, male delecije i insercije. Najčešća mutacija iz druge grupe je tačkasta mutacija D835 [81]. Sve ove mutacije su aktivirajuće i uzrokuju ligand-nezavisnu aktivaciju FLT3 receptora [82]. Mutacije u genu za *FLT3* su najčešće genetičke aberacije u akutnoj mijeloidnoj leukemiji, i detektovane su kod oko 25% adultnih pacijenata [82]. Pokazano je da normalan FLT3 protein ne koristi STAT5 put signalne transdukcije, dok mutirani FLT3-ITD aberantno aktivira ovaj put, i to potpuno nezavisno od JAK2 proteina [83]. Kaskada koja uključuje STAT5 protein menja apoptotski odgovor, samoobnavljanje i proliferativni kapacitet mijeloidnih ćelija i u potpunosti objašnjava mijeloidnu proliferaciju kod *FLT3*-ITD pozitivnih AML pacijenata.

Eksperimentalne studije su pokazale da postoji veza između *FLT3*-ITD mutacije i mijeloproliferativnih bolesti, jer je kod mišijeg modela pokazano da *FLT3*-ITD mutacija izaziva promene koje daju sliku esencijalne trombocitemije [84].

Kasna komplikacija MPN jeste transformacija u akutnu mijeloidnu leukemiju. Dešava se kod 5-10% MPN pacijenata, pri čemu je najčešća kod mijelofibroze, gde se leukemijska transformacija javlja kod oko 8-23% bolesnika [22, 85]. Pokazano je da se pri ovoj transformaciji pojavljuje novi klon koji je V617F negativan čak i kod onih pacijenata koji imaju V617F mutaciju u svom primarnom klonu. Obzirom na isti signalni put koji koriste mutirani JAK2 i FLT3 protein, logično pitanje je da li se kod MPN pacijenata nalazi mutirani *FLT3* gen. Studija na pacijentima obolelim od esencijalne trombocitemije koji su bili negativni za *JAK2*-V617F mutaciju pokazala je da kod ovih pacijenata nije prisutan *FLT3*-ITD gen [86]. Naša studija je obuhvatila kako *JAK2*-V617F pozitivne, tako i *JAK2*-V617F negativne PV i pacijente sa ET, i takođe pokazala odsustvo *FLT3*-ITD gena kod ovih pacijenata [87]. Dugoročno praćenje ovih bolesnika

na markere koji dovode do leukemogeneze, među kojima *FLT3-ITD* može da ima značaj, mogli bi da rasvetle patogenezu ovih oboljenja i njihovu evoluciju u AML.

APOPTOZA

Broj ćelija u organizmu je striktno regulisan i precizno kontrolisan da bi se održala normalna homeostaza tkiva. Različiti mehanizmi se koriste u kontroli dužine života svake pojedinačne ćelije. Jedan od ključnih mehanizama je apoptoza, proces kontrolisane ćelijske smrti koji se koristi u različitim tkivima, naročito onima koje se brzo obnavljaju, kao što je hematopoetsko tkivo [88]. Proces apoptoze ima važnu ulogu tokom embriogeneze [89, 90] i remodelovanja tkiva [91], i igra centralnu ulogu u imunom odgovoru [92, 93]. Redukovana apoptoza ima ulogu u patogenezi kancera [94-96], dugotrajnim viralnim infekcijama i autoimunim bolestima [93]. Sa druge strane, intenzivna apoptoza rezultuje gubljenjem ćelija i stvaranju neurodegenerativnih bolesti, kao što su Alchajmerova, Hangtintonova i Parkinsonova bolest [97].

Apoptoza je oblik programirane ćelijske smrti okarakterisan nizom morfoloških i biohemijskih specifičnosti. Morfološki apoptozu karakteriše serija strukturnih promena umiruće ćelije: bubrenje plazma membrane, kondenzacija cito- i nukleo- plazme, fragmentacija ćelije u membranom okružena apoptotska tela [98]. Biohemijski, karakteriše je degradacija hromatina na fragmente dužine 50-300bp, povišen nivo stvaranja klastera proteina, aktivacija transglutaminaza II koje povezuju proteinske klastera sa omotačem apoptotskih tela [99, 100]. U apoptozu se minimizira curenje ćelijskog sadržaja u vanćelijsku sredinu i štetni efekti proteolitičkih enzima. Time se u potpunosti izbegava process inflamacije koji bi u suprotnosti nastao.

Ključni enzimi u procesu apoptoze su klasa proteolitičkih enzima nazvanih kaspaze. Familiju kaspaza čine cistein- zavisne aspartat- specifične proteaze i do sada je otkriveno 14 članova, premda nisu svi uključeni u apoptozu. Kaspaze se u ćeliji nalaze u zimogenoj formi i neophodna je njihova aktivacija da bi stekle katalitičku aktivnost. Razlikuju se dve grupe kaspaza: inicijatorske (kaspaze 8, 9, 10), koje se autoproteolitički aktiviraju (homoaktivacija), i efektorske (kaspaze 3, 6, 7), koje se aktiviraju dejstvom inicijatorskih kaspaza (heteroaktivacija). Proteaze sa specifičnošću

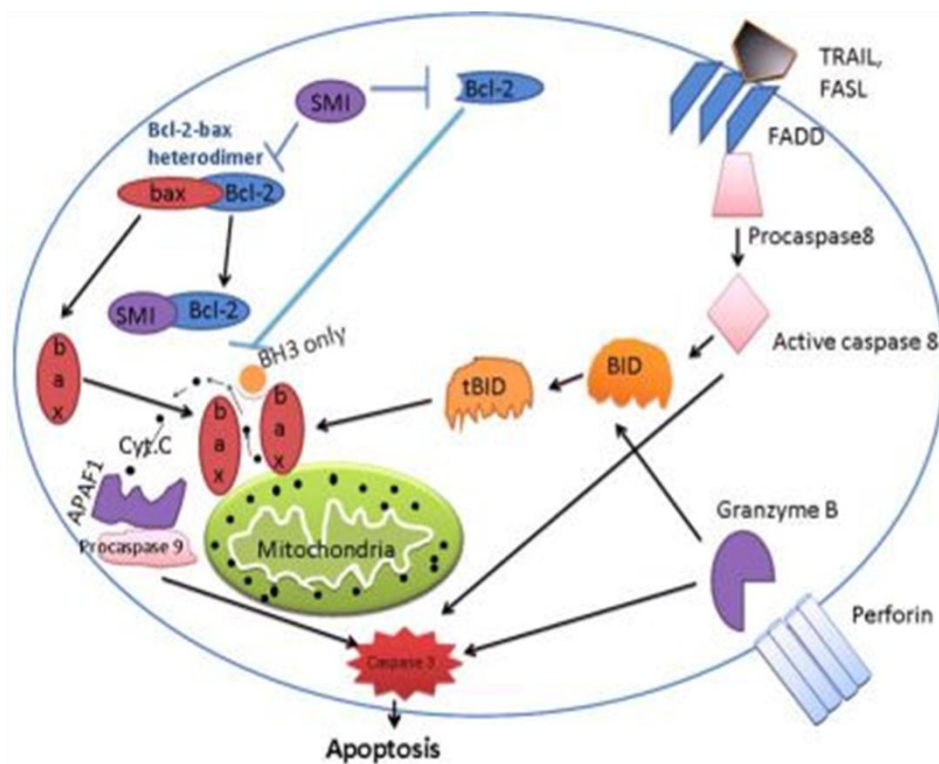
za aspartat su vrlo retke, što kaspazama omogućava veliku selektivnost i preciznost prilikom proteolize u apoptotičnim ćelijama.

Apoptoza obuhvata kaskadu molekulskih procesa koja se može podeliti na fazu inicijacije i izvršnu fazu. Zavisno od prirode apoptotskog stimulusa, apoptoza može biti inicirana različitim signalnim putevima. Izvršna faza je uvek ista, i ne zavisi od načina aktivacije inicijalne faze. Danas su poznata tri različita puta inicijacije apoptoze:

Spoljašnji put započinje interakcijom receptora smrti (TNFR, FASR, DR1-5, itd.) sa odgovarajućim ligandima (TNF- α , FASL, APO2, itd.). Receptori smrti pripadaju TNF (*Tumor Necrosis Factor*) genskoj superfamiliji receptora čija je odlika citoplazmatični domen od oko 80 aminokiselinskih ostataka, koji se naziva “domen smrti” (skraćeno DD- od eng. *Death Domain*). Ovaj domen je ključan za transdukciju signala smrti sa površine ćelije do unutarćelijskih signalnih puteva. Nakon vezivanja liganda, receptor regrutuje adapterske proteine iz citoplazme, koji takođe poseduju domen smrti (TRADD, FADD), i prevodi ih u aktivnu konformaciju. FADD se zatim vezuje za prokaspazu 8, čime je formiran DISC (*Death Inducing Signaling Complex*), i dolazi do autokatalitičke aktivacije prokaspaze 8. Aktivacija kaspaze 8 je okidač za izvršnu fazu apoptoze.

Unutrašnji put (mitohondrijalni) može biti iniciran različitim stimulusima, kao što su radijacija, toksini, hipoksija, hipotermija, virusna infekcija, slobodni radikali kao i odsustvo određenih faktora rasta, hormona i citokina, koji inače suprimiraju programe smrti. Svi ovi stimulusi izazivaju promene na unutrašnjoj membrani mitohondrija, što rezultira otvaranjem MPT (*Mitochondrial Permeability Transition*) pora na mitohondrijama. To rezultuje gubitkom mitohondrijskog transmembranskog potencijala i oslobađanjem dve glavne grupe pro- apoptotskih proteina, inače zarobljenih u međumembranskom prostoru, u citosol. Prvu grupu čine specifične endonukleaze, koje su odgovorne za karakterističnu fragmentaciju DNK u apoptozi, a drugu grupu čine citohrom c i inhibitori aktivnosti IAPa (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*). Citohrom c vezuje i aktivira Apaf-1 i prokaspazu 9, formirajući “apoptozom”.

Spoljašnji i unutrašnji apoptotski put su povezani preko BID proteina (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz spoljašnjeg i unutrašnjeg apoptotskog puta. Preuzeto iz Massod *et al.* Cancer (2011) [101].

Perforin/granzimski put je primećen samo kod T-ćeljski posredovane citotoksičnosti. U dodiru sa ciljnom ćelijom, citotoksični T limfociti (CTL) luče perforin koji formira transmembranske pore, kroz koje CTL oslobađaju citotoksične granule u ciljnu ćeliju. Glavni sastojak ovih granula su serin-proteaze granzim A i granzim B. Granzim B aktivira prokaspazu 10, a pored toga može i da koristi mitohondrijalni put za amplifikaciju signala smrti, i/ili da direktno aktivira kaspazu 3, jednu od efektorskih kaspaza. Granzim A indukuje apoptozu aktivacijom kaspaza nezavisnih puteva, koji na kraju rezultiraju fragmentacijom DNK [102].

Unutrašnji i spoljašnji put inicijacije apoptoze konvergiraju ka izvršnoj fazi apoptoze, koja počinje aktiviranjem efektorskih kaspaza, čime proces ćeljske smrti postaje ireverzibilan. Efektorske kaspaze zatim aktiviraju citoplazmatičnu endonukleazu, koja degradira genomsku DNK, a različite proteaze koje razlažu jedarne i proteine citoskeleta, što na kraju dovodi do morfoloških i biohemijskih promena zapaženih kod apoptoze [102].

Regulacija apoptoze se odvija isključivo u inicijalnoj fazi, najčešće

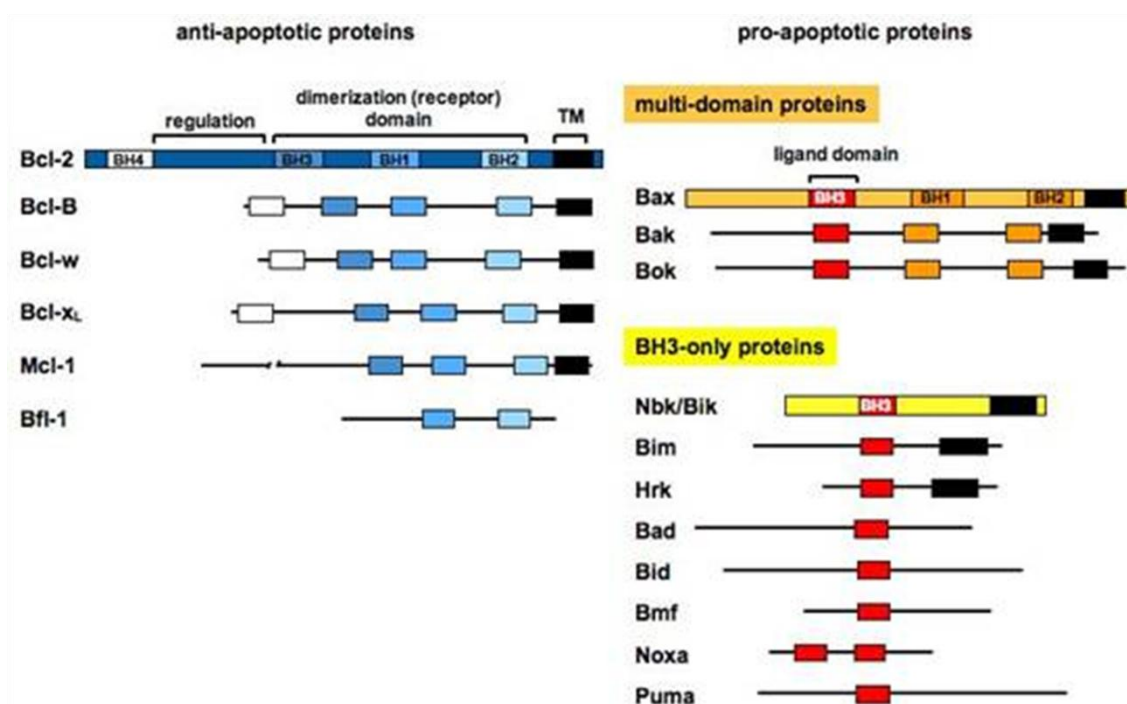
komunikacijom različitih puteva ili dejstvom anti- i pro-apoptotskih proteina. U oba regulatorna mehanizma ključnu ulogu imaju članovi BCL-2 familije proteina, koja se ostvaruje njihovom međusobnom interakcijom ili njihovom modifikacijom od strane drugih proteina uključenih u proces apoptoze [102].

UNUTRAŠNJI APOPTOTSKI PUT I BCL-2 FAMILIJA PROTEINA

Proteini BCL-2 familije su glavni regulatori apoptoze, i kontrolišu događaje koji prethode aktivaciji efektorskih kaspaza, pre svega propustljivost membrane mitohondrija i oslobađanje citohroma c. Zajednička karakteristika svih članova BCL-2 familije proteina je da poseduju jedan do četiri α -helikalna domena, nazvana BH domen (*BCL-2 Homology Domain*) (BH1-BH4). BH3 domen imaju svi članovi ove familije, od kojih neki imaju samo njega ("BH3-only"). BH domeni odgovorni su za protein-protein interakcije, a po najnovijim saznanjima ovaj domen možda igra ulogu "receptora smrti" [103]. Pored BH domena, veliki broj proteina BCL-2 familije na svom C-terminusu ima hidrofobni transmembranski domen, koji im omogućava ukotvljavanje u membrani [104].

Članovi BCL-2 familije proteina se razvrstavju u dve glavne grupe: anti-apoptotske i pro-apoptotske proteine (Slika 10). Anti-apoptotski članovi (BCL2, BCL-XL, BCL2L1, BCL2L2, MCL1, BCL2L10, itd.) odlikuju se visokom strukturnom i funkcionalnom homologijom sa BCL-2 proteinom, i najčešće poseduju tri ili četiri BH domena. Svi su integralni membranski proteini spoljašnje membrane mitohondrija, jedra ili endoplazmatičnog retikuluma [104].

Za razliku od anti-apoptotskih, pro-apoptotski članovi su manje evolutivno konzervisani, i u zdravoj ćeliji nalaze se u citosolu ili asocirani sa citoskeletom. Većini nedostaje BH4 domen (BAX, BAK1, BOK), a ostali su BH3-only proteini (BAD, BID, HRK, BCL2L11, BIM, BIK, i dr.) (Slika 12).



Slika 12. Šematski prikaz građe proteina BCL2 familije gena. Članovi BCL-2 familije poseduju najmanje jedan od četiri BH (Bcl-2 homology) domena i grupisani su po sposobnosti da inhibiraju ili aktiviraju ćelijsku smrt. Preuzeto iz Forro, G. (2009) [105].

Postojanje neaktivnih konformacija ovih proteina, koje se aktiviraju signalima smrti, ukazuje da proteini BCL-2 familije imaju ulogu senzora apoptotskih signala unutar ćelije. Predstavnici ove familije su strateški raspoređeni uz vitalne ćelijske kompartmente, gde mogu odmah da detektuju specifična oštećenja koja, preko ovih proteina, vode ka aktiviranju procesa apoptoze [106]. Od vitalnog značaja za ćeliju je fina regulacija funkcije ovih gena i njihovih proteina, koja se odvija na nekoliko načina.

Različite kombinacije ovih mehanizama regulacije sreću se kod gotovo svih proteina iz BCL-2 familije.

Dimerizacija

Dimerizacija omogućava članovima BCL-2 familije da deluju nezavisno, kao homodimeri, ili da modifikuju aktivnost drugih članova formirajući heterodimere. Na primer, protein BAX deluje kao pro-apoptotski faktor kada je u formi homodimera, dok se heterodimerizacijom sa BCL-2 neutrališe njegova pro-apoptotska funkcija.

Detektovane su i druge interakcije između članova BCL2 familije.

Ekspresija familije BCL2 gena

Regulacija na nivou transkripcije je pokazana za mnoge gene koji kodiraju proteine unutrašnjeg apoptotskog puta [106-109].

Fosforilacija

Fosforilacija igra važnu ulogu u kontroli kako aktivnosti, tako i ćelijske lokalizacije apoptotskih proteina. Konformacione promene, koje su u direktnoj vezi sa njihovom aktivnošću, kao i protein-protein interakcije zavise od fosforilacije ovih proteina, a ona se menja pod uticajem stimulisa koji dolaze do ćelije. Dostupnost BH3 domena i sledstveno sposobnost dimerizacije nekih članova BCL-2 familije takođe je kontrolisana fosforilacijom, kao i podložnost ubikvitin- zavisnoj degradaciji [106].

Proteolitičko sečenje

Ukljanjanje autoinhibitornih domena na N- terminusu proteina BID i BAX omogućava ovim pro- apoptotski molekulima da se translociraju u spoljašnju membranu mitohondrija, čime započinje njihovo pro-apoptotsko dejstvo [110]. Još dramatičniji proteolitički efekat pokazan je na anti- apoptotskim molekulima BCL2 i BCL-XL, kojima proteolitičko uklanjanje N- terminalnog dela menja funkciju i oni postaju pro-apoptotski [111].

Translokacija

Promena subćelijske lokalizacije u odgovoru na apoptotski signal, najčešće podrazumeva prethodnu promenu konformacije proteina. Uglavnom se javlja kod pro-apoptotskih članova koji su inače citosolni proteini ili vezani za elemente citoskeleta, i omogućava inserciju ili vezivanje za membranu mitohondrija, što je neophodan korak za ispoljavanje njihovog dejstva. Model ovakve kontrole je pro-apoptotski molekul BIM, koji je u citosolu vezan za mikrotubule preko dineinskog motornog kompleksa. Nakon delovanja signala za apoptozu, BIM se translocira u mitohondrije i ostvaruje svoje dejstvo [110].

PREDSTAVNICI BCL2 FAMILIJE PROTEINA

BCL2

BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) je tipičan anti-apoptotski član BCL2 familije. Ekspirira se u mnogim tipovima ćelija, uključujući ćelije mijeloidne loze [107]. *BCL2* je kodiran genom koji je lociran na hromozomu 18q21.3 i sastoji se od 3 egzona; alternativnim splajsingom nastaju dva transkripta, *BCL2a* i *BCL2b*. *BCL2a* transkript kodira izoformu od 239 aminokiselina koja sadrži C-terminalni hidrofobni domen neophodan za lokalizaciju proteina u membrani mitohondrija i njegovu anti-apoptotsku funkciju. *BCL2b* transkript kodira izoformu od 205 aminokiselina kojoj nedostaje transmembranski domen i lokalizovana je u citosolu; pro- ili anti-apoptotska funkcija ove izoforme nije dokazana. Obe izoforme sadrže funkcionalne BH1-4 domene.

.

BAX

BAX (*BCL2-associated X protein*) je tipičan pro-apoptotski član BCL2 familije. Ekspirira se u mnogim tipovima ćelija, uključujući hematopoetske stem ćelije. *BAX* je kodiran genom koji je lociran na hromozomu 19q13.3-q13.4 i sastoji se od 6 egzona; alternativnim splajsingom nastaje 5 transkripata (α , β , γ , δ , σ), koji su diferencijalno ekspimirani u različitim tkivima. *BAX- α* (*BAX*) je glavni proteinski produkt *BAX* gena. Ova izoforma se sastoji od 192 amino-kiseline i sadrži BH1-3 domene, neophodne za homo- i hetero-dimerizaciju, kao i C-terminalni hidrofobni domen neophodan za inserciju u membranu mitohondrija [103].

BCL2L12

BCL2L12 (*BCL2-Like 12*) je nedavno identifikovan novi član BCL-2 familije proteina, lociran na hromozomu 19q13.3-13.4. *BCL2L12* se sastoji od 7 kodirajućih egzona i 6 introna. Ukupni kodirajući region gena je dug 1005 bp i kodira polipeptid od 334 aminokiselinska ostatka, pretpostavljene molekulske mase 38.6 kDa [112]. *In silico* analize pokazuju da *BCL2L12* sadrži BH2 domen, ali ostali BH domeni (BH1, 3 i 4),

kao i transmembranski domen, odsustvuju [112]. Iako je BH3 domen prisutan kod većine sisarskih članova BCL-2 familije, BCL2L12 nema BH3 domen. Poznat je još samo jedan, anti-apoptotski predstavnik (BOO/DIVA) koji takođe nema BH3 domen i deluje posredstvom mehanizma nezavisnog od dimerizacije [112].

BCL2L12 nalazi se u neposrednoj blizini nekoliko drugih gena, čiji su proizvodi povezani sa karcinogenezom (*RRAS*, *IRF3*), a sa kojima deli neke strukturne karakteristike [112]. Postoje i indicije da između *IRF3* i *BCL2L12* dolazi do međusobno regulisane naizmenične ekspresije, s obzirom da 1183bp *BCL2L12* predstavlja antisense-DNK splajsovanog gena *IRF3*. Filogenetske analize pokazuju da se *BCL2L12* ne nalazi u neposrednoj blizini, tj. ne formira klastere sa drugim poznatim genima iz *BCL-2* familije koji sadrže BH2 domen.

Protein BCL2L12 sadrži sekvencu od 16 aminokiselina, nađenu u okviru BH2 domena članova BCL-2 familije (BCL-2, BAX, BCL-XL), kao i više prolinom bogatih oligopeptida [112]. Prolinom bogati motivi su ciljna mesta za prepoznavanje i vezivanje SH3 domena karakterističnih za tirozin-kinaze, u koje spadaju i različiti protoonkogeni [104]. BCL2L12 je prvi identifikovani protein- kodirajući gen koji sadrži i BH2 domen i prolinom bogati domen. Prisustvo oba domena, pod pretpostavkom da su funkcionalni, predstavlja prelazni oblik, odnosno sponu, između proteina uključenih u regulaciju apoptoze i onkoproteina sa SH3 domenom [104, 112].

Primenom RT-PCR i RQ-PCR metoda pokazana je pojačana ekspresija *BCL2L12* u ranim stadijumima raka kolona [113], dojke [114] i želuca [115] u odnosu na okolno normalno tkivo. Utvrđeno je da pacijenti kod kojih postoji povišena ekspresija ovog gena preživljavaju u većem procentu i imaju duže periode bez ponovne pojave bolesti, tako da je ekspresija *BCL2L12* predložena kao povoljan prognostički faktor za kancer dojke, kolona i želuca.

SPOLJAŠNJI APOPTOTSKI PUT

FAS receptor - FAS ligand put (FASR/FASL) je otkriven i najbolje proučen kod imunog sistema. On ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze limfocita, u regulaciji njihove maturacije, kao i selekciji receptora na B i T limfocitima [116]. Smanjenje FAS

dirigovane apoptoze može prouzrokovati razviće limfoproliferativnih oboljenja i izazvati autoimune bolesti, dok prevelika aktivacija FASR/FASL može dovesti do patološke destrukcije tkiva [117]. Studije na miševima sa spontanim mutacijama u Fas genu (Lpr mutanti) ili FasL genu (Gld mutanti) su pokazale da u ovim slučajevima dolazi do abnormalne akumulacije limfocita kod ovih miševa, povećane produkcije imunoglobulina uključujući autoantitela i razvoja autoimunih bolesti [118, 119]. Iako je najbolje proučen u imunom sistemu, on nije karakterističan samo za imune ćelije. Poremećena funkcija FAS receptora i FAS liganda primećena kod različitih tipova maligniteta: u slučajevima kancera kolona [120], melanoma [121], raka jednjaka [122], raka dojke [123], hepatosarkoma [124], karcinom pluća [125] i raka jajnika [94]. Pokazano je *in vivo* kod nekoliko tipova kancera, da konstitutivno eksprimiran FASL omogućava zaštitu malignim ćelijama od imunog sistema tako što indukuje apoptozu anti-tumor efektorskih limfocita, pre svega NK ćelija [126].

APOPTOZA U MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZIJAMA

Apoptoza kao proces nije dovoljno istražena u MPN, ali su u ekspanziji istraživanja vezana za apoptozu vezanu za efekat molekularnih terapeutika zasnovanih na inhibiciji JAK2 tirozin kinaze. Prve studije o apoptozi u MPN su ukazale na efekat deregulacije proteina unutrašnjeg puta, pokazujući da u eritroidni progenitori pacijenata sa PV zaštićeni od apoptoze povećanjem nivoa anti-apoptotskih BCL2 i BCL-xL proteina [107]. Kada je ustanovljeno da je STAT put ključni signalni put u genezi MPN, pokazano je da je Bcl-xL gen upravo regulisan STAT5 proteinom, te da se JAK2-V617F mutacija direktno umeće u ovaj put regulacije ekspresija BCL-xL gena [108]. Studija koja se bavila ekspresijom ovog gena kod ET pokazala je da je ekspresija BCL-xL gena u megakariocitnim ćelijama u porastu tokom njihovog sazrevanja, međutim u diferenciranim ćelijama je skoro potpuno utišana [127].

Apoptoza preko spoljašnjeg apoptotskog puta odvija se u eritrocitima. Pokazano je da se ekspresija FASR i FASL menja tokom maturacije eritrocita i da je zavisna od koncentracije eritropoetina [128]. FAS receptor je eksprimiran u nezrelim eritrocitima, dok se u potpuno diferenciranim eritrocitima njegova ekspresija smanjuje [128]. FASL

pokazuje suprotnu tendenciju, i što je zanimljivo, FASL eksprimiran na membrani odraslog eritrocita sposoban je izazove FAS-zavisnu citotoksičnost eritroblasta [128]. Ovaj proces je zavistan od eritropoetina, a odvija se preko transkripcionog faktora GATA1 koji je specifičan za eritrocite. GATA1 podložan je degradaciji pod uticajem kaspaza, što se dešava pri visokim koncentracijama eritropoetina [129].

Uloga FASR/FASL sistema u patogenezi mijeloproliferativnih neoplazija pokazana je u studiji naše grupe [130], gde je pokazano da je ekspresija *FASR* u limfocitima MPN pacijenata povišena u odnosu na zdrave kontrole, dok ekspresija *FASL* nije promenjena. Ovi rezultati dobili su potvrdu u radu druge grupe naučnika [131], koji su pokazali da su *FASR*, ali i drugi receptori smrti (Faim, c-Flip) overekspimirani kod MPN pacijenata, što govori o tome da poremećena apoptoza regulisana spoljašnjim apoptotskim putem predstavlja važan faktor uključen u patogenezu ovih bolesti.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Mijeloproliferativne neoplazije (MPN) su heterogena grupa hematoloških maligniteta, a čine je tri entiteta: esencijalna trombocitemija, policitemija vera i mijelofibroza. Molekularna osnova MPN se intenzivno ispituje. Okarakterisana onkogenom *JAK2-V617F* mutacija prisutna je kod svih MPN entiteta, ali je njena zastupljenost kod ove tri bolesti različita. Takođe, prisustvo ove mutacije objašnjava samo deo fenotipskih karakteristika ovih pacijenata. Jedna od zajedničkih karakteristika ove tri bolesti je njihova kasna transformacija u akutnu mijeloidnu leukemiju. Izučavanje ove pojave predstavlja važan aspekt u razumevanju patogeneze ovih oboljenja, ali i procesa leukemogeneze uopšte.

Prisustvo 46/1 haplotipa kod ovih pacijenata stvara predispoziciju da se stekne *JAK2-V617F* mutacija, ali se mehanizam njegovog dejstva ne zna. Uticaj haplotipa 46/1 na transkripciju *JAK2* gena je potencijalni mehanizam kojim bi se mogla objasniti proliferativna prednost malignog klona.

Proces apoptoze je kod ovih pacijenata direktno pogođen prisustvom *JAK2-V617F* mutacije, jer ona preko aktivacije *STAT5* puta direktno aktivira anti- apoptotski *BCL2-xL* gen. Akumulacija malignog klona putem poremećaja apoptotskih signalnih puteva predstavlja jedan od fundamentalnih mehanizama koji koriste maligne ćelije u raznim vrstama tumora.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitivanje markera koji učestvuju u procesima proliferacije i apoptoze kod pacijenata sa MPN. Stoga je istraživanje obuhvatilo sledeće aspekte:

1. Proučavanje markera proliferacije

- utvrđivanje učestalosti onkogene *JAK2-V617F* mutacije kod pacijenata sa MPN i procenta zastupljenosti mutiranog alela u različitim MPN entitetima
- utvrđivanje prisustva drugih molekularnih markera kod pacijenata sa MPN. U tom smislu proučavano je prisustvo aktivirajuće somatske mutacije *FLT3-ITD* kod pacijenata sa MPN

2. Uticaj 46/1 haplotipa na transkripciju *JAK2* gena
 - karakterizacija intronskih regulatornih elemenata četrnaestog introna gena za Janus kinazu 2
 - praćenje ekspresije *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN u korelaciji sa 46/1 haplotipom u funkciji utvrđivanja njegove uloge u transkripciju *JAK2* gena

3. Proučavanje rezistencije granulocita pacijenata sa MPN na apoptozu
 - analiza ekspresije gena *BCL2* familije i gena za *FASR*, kao osnovnih regulatora unutrašnjeg i spoljašnjeg puta aktivacije apoptoze
 - analiza asocijacije genske ekspresije apoptotskih markera sa procentom zastupljenosti *JAK2-V617F* mutacije

Sagledavanje međusobnih interakcija koje ove genetičke promene ostvaruju treba da dovede do novih saznanja o njihovom sinergističkom delovanju u kompleksnom procesu patogeneze mijeloproliferativnih neoplazija i do rasvetljavanja molekularne osnove ovih oboljenja.

MATERIJAL I METODE

MATERIJAL

BIOLOŠKI MATERIJAL

Ispitanici

U ovu studiju je uključeno 199 pacijenata obolelih od mijeloproliferativnih neoplazija (MPN), dijagnostikovanih u više zdravstvenih centara u Srbiji. Dijagnoza je postavljena na osnovu standardnih kliničkih parametara u skladu sa najnovijim preporukama Svetske zdravstvene organizacije iz 2008. god. Kontrolnu grupu sačinjavale su 22 zdrave individue. Studija je odobrena odlukom Etičkog odbora Kliničkog Centra Srbije.

Od kliničkih i hematoloških parametara evidentiranih u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i tokom praćenja bolesti, u ovom radu su korišćeni: pol, starost pacijenata pri postavljanju dijagnoze, nivo hemoglobina i hematokrit.

Sveži uzorci periferne krvi su uzeti na 3.8% Na-citratu kao antikoagulansu u odnosu 9:1, i transportovani do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, gde je vršena izolacija DNK i RNK.

Ćelijske linije

U eksperimentima tranzijentne transfekcije, za izolaciju DNK korišćenu u eksperimentima apsolutne kvantifikacije pri određivanju procenta *JAK2-V617F* alela, kao i za dobijanje ekstrakata nuklearnih proteina za EMSA eksperimente, korišćena je humana K562 ćelijska linija. To je eritroleukemijska ćelijska linija poreklom od pacijenta obolelog od hronične mijeloidne leukemije [132] i ima *wt JAK2* gen. Gajena je u Eagle MEM medijumu sa dodatkom 10% FCS (*Fetal Calf Serum*).

Za izolaciju DNK korišćenu u eksperimentima apsolutne kvantifikacije pri određivanju procenta zastupljenosti *JAK2-V617F* alela, kao i za dobijanje ekstrakata nuklearnih proteina za EMSA eksperimente, korišćena je humana HEL ćelijska linija. To je eritroleukemijska ćelijska linija koja spontano diferencira u eritroblaste [133] i poseduje *JAK2-V617F* mutaciju u homozigotnom stanju. Gajena je u RPMI medijumu sa dodatkom 10% FCS.

U qRT-PCR eksperimentima je kao kalibrator korišćena humana HL-60 ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije [134]. Gajena je u RPMI medijumu sa dodatkom 10% FCS.

Sve ćelijske linije gajene su na 37°C i 5% CO₂.

Bakterijski soj

U eksperimentima kloniranja je korišćen bakterijski soj *DH5α Escherichia coli* [135].

PLAZMIDNI VEKTORI

U studiji funkcionalne karakterizacije intronskog regiona gena za *JAK2* korišćen je pBLCAT5. Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech) koji eksprimira β-gal [136].

PRAJMERI

Nazivi i sekvence prajmera i korišćenih u PCR i Real time PCR (RQ PCR) reakcijama i reakcijama sekvenciranja navedeni su u tabelama 1-5. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA eseju navedeni su u Tabeli 6 (F = "nizvodni" prajmer; R = "uzvodni" prajmer).

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za reakciju alel- specifičnog PCRa u detekciji *JAK2*-V617F mutacije

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
F kontrolni (Fcont)	5'- ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG - 3'
F specifični (Fspec)	5'- AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT - 3'
Reverzni (Rev)	5'- CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA - 3'

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćenih za detekciju *FLT3*-ITD mutacije

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
14F	5'GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC3'
15R	5'CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC3'

Tabela 3. Prajmeri i proba korišćeni u qRT-PCR eksperimentima merenja ekspresije apoptotskih gena (SYBR green tehnika)

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
BCL2-F	5' - TCG CCC TGT GGA TGA CTG A - 3'
BCL2-R	5' - CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC - 3'
BAX-F	5' - TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC - 3'
BAX-R	5' - TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT - 3'
BCL2L12-F	5' - CCC TCG GCC TTG CTC TCT - 3'
BCL2L12-R	5' - GGG CCA CCA AAG CAT AGA AG - 3'
ABL-F	5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'
ABL-R	5' - GAC GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'
ABL – P	5' - (FAM) – CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT – (TAMRA) - 3'
FASR	Gene expression assay (Hs00163653_m1) (TaqMan tehnika)

Tabela 4. Prajmeri i probe korišćeni u PCR reakciji za genotipizaciju SNP rs12343867 T>C. Isti prajmeri korišćeni su za sekvenciranje dobijenog PCR produkta

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
JAK2 Hap F HindIII	5' – <u>CAAGCTT</u> GGCAGGTTCAACATAACATTGGA - 3'
JAK2 Hap R XbaI	5'- <u>GCTCTAGAG</u> CCTTTGGGACACCCCAGAATAA - 3'

Primedba: podvučeni region je mesto sečenja *HindIII*, odnosno *XbaI* restrikcionog enzima. Prajmeri su dizajnirani na osnovu sekvence objavljene na NCBI (GenBank Accession No. NG_009904.1 +93825 to +94295)

Tabela 5. Prajmeri i proba korišćeni za određivanje procenta zastupljenosti mutiranog alela- “*allele burden*” (TaqMan tehnika)

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
JAK2- <i>wt</i> F	5' – GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTG - 3'
JAK2-V617F F	5' – GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTT - 3'
R primer	5' – GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC - 3'
6-FAMprobe DNA	5' – TGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCT - 3'

Tabela 6. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA eseju

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Hap oligo t F	5'- TGACAGAAATGATTAT <u>G</u> TTGATATGATACT - 3'
Hap oligo c F	5'-TGACAGAAATGATTAC <u>G</u> TTGATATGATACT- 3'

Napomena: Prajmeri su dizajnirani na osnovu sekvence objavljene na NCBI (GeneBank Accession No. NG_009904.1 +93929 to +93959)

Za merenje ekspresije *JAK2* gena korišćen je TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA, Hs00234567_m1)

Svi eksperimenti Real time urađeni su na Applied Biosystems 7500 platformi.

ANTITELA

Tabela 7. Antitela korišćena u “super-shift” eksperimentima

Naziv antitela	Proizvođač	Kat. broj	Poreklo
MEIS1/2	Santa Cruz Biotechnology	sc-25412	zec, poliklonsko IgG
TGIF	Santa Cruz Biotechnology	sc-9084	zec, poliklonsko IgG

METODE

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI

Za izolaciju DNK iz krvi korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Protokol:

Na dno tube sipati 20 µl Qiagen proteaze, dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem. Inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C kako bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem. Ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća). Odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW1 i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća). Odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW2 i centrifugirati na 20000 g (14000 rpm)/3 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća). Na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 6000 g (8000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvorena DNK. Koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ PERIFERNE KRVI

Protokol:

Uzorak krvi razblažiti fiziološkim rastvorom u odnosu 1:1. Na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). 4 ml razblaženog uzorka pažljivo naneti na površinu Ficoll-Paque PLUS, pazeći da se slojevi ne pomešaju. Centrifugirati na 1500 rpm/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja. Nakon centrifugiranja, u novu sterilnu epruvetu pipetom prebaciti interfazu ("buffy coat") koja sadrži mononuklearne ćelije. Isprati dva puta 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄); nakon svakog ispiranja centrifugirati na 1500 rpm/15 min. Talog mononuklearnih ćelija resuspendovati u TRI reagent-u (Sigma-Aldrich).

IZOLACIJA GRANULOCITA IZ PERIFERNE KRVI

Protokol:

Za izolaciju granulocita periferne krvi korišćena je metoda razdvajanja na dvostrukom gradijentu Ficoll-a (Ficoll-Histopaque 1119, flotacione gustine 1.119g/ml i Ficoll-Histopaque 1077, flotacione gustine 1.077g/ml, Sigma, Aldrich). U tubu za centrifugiranje nasloženo je po 3ml Ficoll-a 1119 i Ficoll-a 1077. Uzorak periferne krvi razblažen je dodavanjem fiziološkog rastvora u odnosu 1:1 (5ml uzorka + 5ml fiziološkog rastvora) i naslojen na fikol. Centrifugiranje je vršeno na sobnoj temperaturi na 700g rcf u trajanju od 30 minuta u kliničkoj centrifugi (Hereus). Nakon toga su u novu tubu prebaciti granulocite, koji se nalaze između dva sloja Ficoll-a. Na samom dnu ostaje talog eritrocita. U tube sa granulocitima je dodat 1x PBS do 10ml i centrifugirano je na sobnoj temperaturi na 2000g rcf u kliničkoj centrifugi u trajanju od 10 minuta. Dobijeni ćelijski talozi su čuvani u PBS-u.

IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA, GRANULOCITA I ĆELIJA U KULTURI

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija i ćelija u kulturi je korišćen TRI reagent (Sigma-Aldrich). TRI reagent predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski *et al.*[137].

Protokol:

U 1 ml TRI reagent-a resuspendovati maksimalno 1×10^7 ćelija i lizirati provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm. Liziran uzorak ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min. Dodati 200 μ l hloroforma, snažno promućkati, a zatim uzorak ostaviti da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 12000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini. Vodenu fazu prebaciti u novu tubu i dodati 0.5 ml izopropanola; promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi

(precipitacija RNK). Centrifugirati na 12000 rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola. Centrifugirati na 12000 rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi. Talog RNK rastvoriti u "RNase-free" vodi. Koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem na spektrofotometru

REVERZNA TRANSKRIPCija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

Na ledu pripremiti smešu finalnog volumena 12.5 µl koja sadrži 2 µg RNK i 1 µl 20X "random-hexamer" prajmera inkubirati 5 min/70°C, a zatim ohladiti na ledu. U drugoj tubi pripremiti smešu finalnog volumena 7.5µl koja sadrži 4µl 5XRT pufera (Fermentas), 0.5µl (20U) "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas), 2µl dNTP (10mM) i 1µl (40U) M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas). Pomešati i inkubirati 10 min/25°C, a zatim 1h/42°C. Reakciju zaustaviti inkubacijom 10 min/70°C

REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR)

PCR ("*polymerase chain reaction*") je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani ("forward"-nizvodni i "reverse"-uzvodni prajmer) i dugački najčešće 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR

reakciona smeša mora da sadrži komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matricu (DNK koja se kopira), prajmere (oligonukleotide komplementarne krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivne elemente DNK), *Taq* polimerazu (termostabilnu DNK polimerazu koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze). RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) je varijanta PCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK.

Allel specifični PCRa za detekciju *JAK2-V617F* mutacije

Metoda je preuzeta iz rada Baxter *et al.* [34]. Uvedena je modifikacija koja se odnosi na izvođenje reakcije u dva ciklusa:

Reakciona smeša za prvu rundu PCRa finalnog volumena 25µl je sadržala sledeće komponente:

1. 1 x PCR reakcioni pufer (QIAGEN)
2. 1x Q rastvor (QIAGEN)
3. 1.5 mM MgCl₂
4. dNTP (Fermentas) 200µM svaki
5. 0,4µM prajmeri (Fcont i Rev, Tabela 1)
6. 1U HotStart Taq DNA polimeraza (QIAGEN)
7. 80ng DNK uzorka

Temperaturni profil prvog ciklusa umnožavanja:

Aktivacija polimeraze	95 ⁰ C/ 15 min	
Denaturacija	94 ⁰ C/ 30 s	35 ciklusa
Aniling	58 ⁰ C/ 30 s	
Elongacija	72 ⁰ C/ 45 s	
Finalna elongacija	72 ⁰ C/ 10 min	

Reakciona smeša za drugu rundu PCRa finalne zapremine 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

1. 1 x PCR reakcioni pufer (QIAGEN)
2. 1x Q rastvor (QIAGEN)
3. 1.5 mM MgCl₂
4. dNTP (Fermentas) 200 μ M svaki
5. 0,4 μ M prajmeri (Fspec i Rev, Tabela 1)
6. 1U HotStart Taq DNA polimeraza (QIAGEN)
7. 1 μ l PCR produkta iz prve runde

Temperaturni profil drugog ciklusa umnožavanja:

Aktivacija polimeraze 95⁰C/ 15 min

Denaturacija	94 ⁰ C/ 30 s	
Aniling	62 ⁰ C/ 30 s	35 ciklusa
Elongacija	72 ⁰ C/ 30 s	

Finalna elongacija 72⁰C/ 10 min

Svaka PCR reakcija sadržala je kontrolu PCR reakcije (reakcija bez DNK), negativnu kontrolu (reakcija sa DNK pacijenta bez mutacije) i pozitivnu kontrolu (reakcija sa DNK pacijenta sa mutacijom). PCR produkti su analizirani na 2% TAE agaroznim gelovima. Očekivana dužina kontrolnog PCR produkta je 364 bp, dok se za mutirani alel očekuje dužina trake od 203bp.

PCR za detekciju *FLT3-ITD* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 μ l, sastojala se od sledećih elemenata:

1. 1 x PCR reakcioni pufer (QIAGEN)
2. 1x Q rastvor (QIAGEN)
3. 2,75 mM MgCl₂

4. dNTP (Fermentas) 200 μ M svaki
5. 350 mM prajmeri (Tabela 2)
6. 2U HotStart Taq DNA polimeraza (QIAGEN)
7. 100 – 300 ng DNK

Temperaturni profil PCR reakcije:

Aktivacija polimeraze 95⁰C/ 15 min

Denaturacija	1 min/95 ⁰ C	
Aniling	1 min/60 ⁰ C s	35 ciklusa
Elongacija	2 min/72 ⁰ C	

Finalna elongacija 72⁰C/ 10 min

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Očekivana dužina *wt* PCR produkta za *wt* je 325 bp.

PCR amplifikacija dela introna 14 gena za *JAK2*

U cilju kloniranja i funkcionalne analize enhenserskih potencijala dela introna 14 gena za *JAK2* koji sadrži SNP rs12343867 T>C, isti je prethodno umnožen PCR metodom.

Kao matrica za PCR amplifikaciju služila je DNK (100 ng) izolovana iz krvi zdrave kontrole. Isti prajmeri korišćeni su i u analizi SNP rs12343867 T>C genotipa grupe od 51 pacijenata i 12 zdravih kontrola. Reakciona smeša finalnog volumena 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

1. 1 x reakcioni pufer A (Kapa Biosystems)
2. dNTP finalne koncentracije 200 μ M
3. 0,4 μ M prajmeri (Tabela 4)
4. 1U KapaTaq polimeraze (Kapa Biosystems)
5. 100 ng DNK

Temperaturni profil reakcije:

Aktivacija polimeraze 95⁰C/ 15 min

Denaturacija	94 ⁰ C/ 30 s	
Aniling	60 ⁰ C/ 30 s	35 ciklusa
Elongacija	72 ⁰ C/ 45 s	
Finalna elongacija	72 ⁰ C/ 10 min	

Očekivana dužina *wt* PCR produkta je 470bp. Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 1% TAE agaroznom gelu.

ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu [138] odgovarajuće koncentracije (1 – 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova korišćen je 1 x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH=8). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom.

Elektroforeza je tekla u 1 x TAE puferu, pri naponu od 5 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom, a trajni zapis rezultata je dobijen fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike (BioDocAnalyze System). Veličina fragmenata DNK je određena pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

Za potrebe ratdvajanja DNK-proteinskih kompleksa u eksperimentima EMSA korišćeni su nedenaturišući 4% poliakrilamidnom gelovi sledećeg sastava: akrilamid : 4% N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED. Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1 x TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8).

PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA

Za prečišćavanje produkata dobijenih PCR reakcijama korišćen je QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

Protokol:

Pomešati PCR reakcionu smešu i pufer PB u odnosu 1:5. Dodati 10 µl 3M Na-acetata pH=5. Naneti uzorak na QIAquick kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (adsorpcija DNK). Odbaciti filtrat, naneti 750 µl pufera PE na kolonicu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (ispiranje DNK od nečistoća). Odbaciti filtrat i ponoviti centrifugiranje na 17900 g (13000 rpm)/1 min. Prebaciti kolonicu u novu tubu, naneti 30 µl pufera EB i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 17900 g (13000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvoren prečišćeni PCR produkt. Koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA / PLAZMIDNIH KONSTRUKATA

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminator v 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se, pored deoksinukleotida, koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi [139]. DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su svi dideoksinukleotidi obeleženi istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se

sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj, umesto u četiri odvojene PCR reakcije.

Prvo je PCR reakcijom umnožen region DNK koji treba da se sekvencira. Nakon provere PCR produkta elektroforezom, vršeno je njegovo prečišćavanje na koloni. Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR produkata merena je na spektrofotometru.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 5 μ l je sadržala sledeće komponente:

1. 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp) / 150-300 ng plazmidnog konstrukta
2. 2 pmol prajmera
3. 1x Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)
4. 1 x Sequencing Buffer

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1 min/96⁰C

10 sek/96⁰C

5 sek/50⁰C 25x

4 min/60⁰C

4⁰C/ ∞

Produkti PCR reakcije za sekvenciranje su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom.

Protokol:

Posle završene reakcije sekvenciranja u uzorke se doda 40 μ l Na-acetata, promućka se i centrifugira 20min na 13000 rpm posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 μ l 70% etanola i centrifugira 10min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja dva puta. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 μ l HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

Dobijeni rezultati su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 (<http://www.applied biosystems.com>)

Sekvenciranje plazmidnih konstrukata

Plazmidni CAT-konstrukti su sekvencirani pomoću prajmera koji su korišćeni prilikom kloniranja DNK inserta u pBLCAT5 reporterski vektor. Radi provere tačnosti rezultata, sekvencirana su oba lanca plazmidne DNK.

ANALIZA EKSPRESIJE GENA POMOĆU "REAL-TIME" PCR (qPCR) METODE

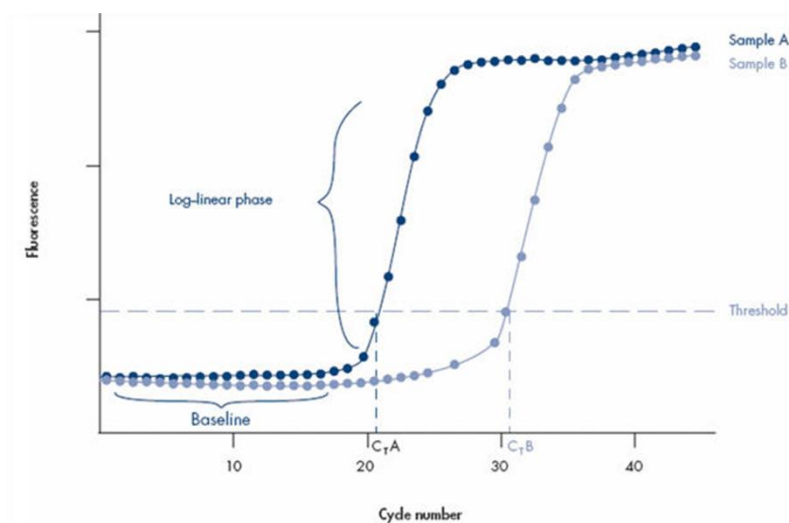
"Real-time" PCR ili kvantitativni PCR (qPCR) je metoda koja omogućava kvantifikaciju PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu ("real-time"). qRT-PCR ("quantitative RT-PCR") je varijanta qPCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK.

U qPCR se meri fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije i čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. Za razliku od "klasičnog" PCR, gde se količina produkta može meriti samo na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog ciklusa (Slika 13).

Nekoliko termina značajni su u predstavljanju real time rezultata:

- "baseline"- nivo fluorescencije u početnim ciklusima (obično 3-15) kada još nema signala usled stvaranja PCR produkta
- "threshold" – prag koji se podešava da bude u okviru log-linearnog regiona amplifikacione krive
- Ct - "threshold cycle" tj. ciklus u kome fluorescentni signal poreklom od uzorka pređe "threshold". Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, Ct je niži i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence.
- Rn – fluorescencija reporterske boje podeljena fluorescencijom pasivne referentne boje (Rox)

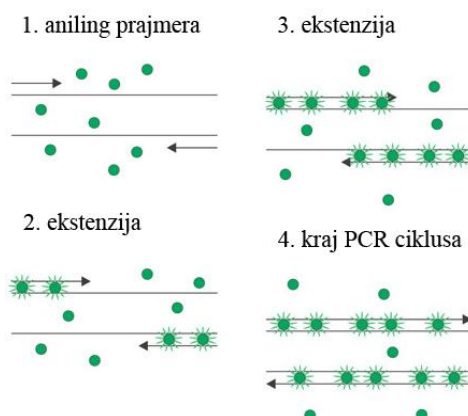
- $\Delta R_n - R_n$ minus “baseline”



Slika 13. Tipična kriva amplifikacije koja pokazuje amplifikaciju dva uzorka (A i B). Uzorak A ima veću količinu polazne matrice od uzorka B. Preuzeto iz (<http://www.qiagen.com>) [140].

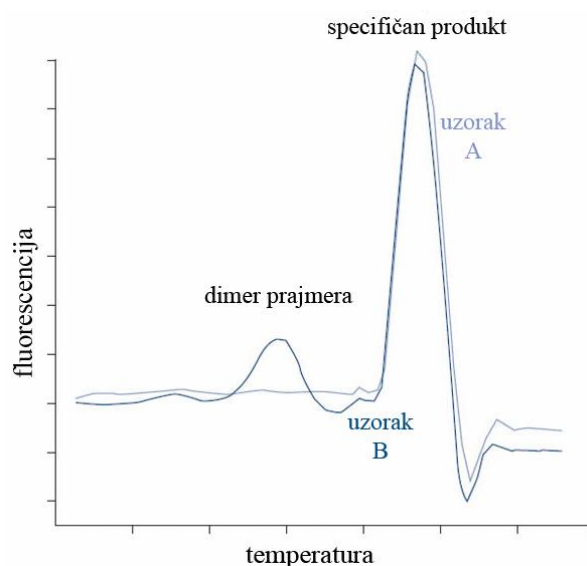
Trenutno se koriste 2 osnovne qPCR tehnike: SYBR Green i TaqMan.

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni interkalirajuće SYBR Green I boje koja se vezuje za manji žljeb dvolančane DNK. Sa povećanjem broja ciklusa PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim i do povećanja intenziteta fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (Slika 14).



Slika 14. Princip rada SYBR Green I tehnike. Preuzeto iz (<http://www.appliedbiosystems.com>) [141].

SYBR Green tehnika za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Zbog toga se za procenu specifičnosti reakcije primenjuje analiza krive topljenja ("melting curve analysis"). U ovoj analizi, tokom qPCR reakcije temperatura postepeno raste od 65°C do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. U prisustvu dvolančane DNK, intenzitet fluorescentnog signala će biti visok pri niskim temperaturama, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja, pa će davati različite pik-ove fluorescencije. U prisustvu samo jednog, specifičnog PCR produkta detektovaće se samo jedan pik (Slika 15).

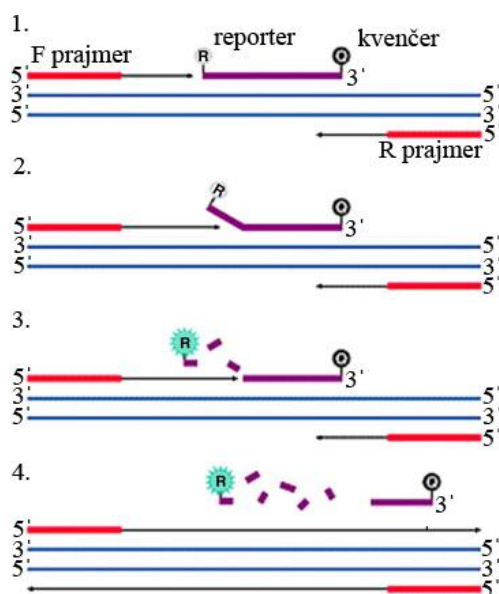


Slika 15. Analiza krive topljenja. Preuzeto is (<http://www.appliedbiosystems.com>) [142].

TaqMan tehnika koristi 5'→3' egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za detekciju PCR produkta. Za razliku od SYBR Green tehnike, u TaqMan tehnici se, pored specifičnih prajmera, koristi i TaqMan proba. TaqMan proba je oligo-nukleotidna proba komplementarna sekvenci u okviru target sekvence; na 5' kraju je obeležena fluorescentnom, reporterskom bojom (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3' kraju "kvenčerom" (najčešće TAMRA). Sve dok se reporter i kvenčer nalaze blizu jedan drugom, tj. dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije jer fluorescencija koju emituje reporter biva apsorbovana od strane kvenčera. Međutim, u

toku PCR amplifikacije 5'→3' egzozonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira emitovanjem detektabilne fluorescencije od strane reporterske boje (Slika 16).

U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije slobodnih reportera.



Slika 16. Princip rada TaqMan tehnike. 1) TaqMan proba i prajmeri se vezuju za target sekvencu i započinja ekstenzija; 2) kada Taq polimeraza stigne do probe, njena 5'→3' egzozonukleazna aktivnost uklanja probu; 3) započinje "seckanje" probe i emitovanje fluorescencije; 4) završetak polimerizacije. Preuzeto iz Wang *et al.* Bioinformatics. 2010 [143].

U toku eksponencijalne faze PCR reakcije, kvantitativni odnos između početne količine target sekvence i količine PCR produkta u bilo kom ciklusu je:

$$X_n = X_0 (1+E)^n$$

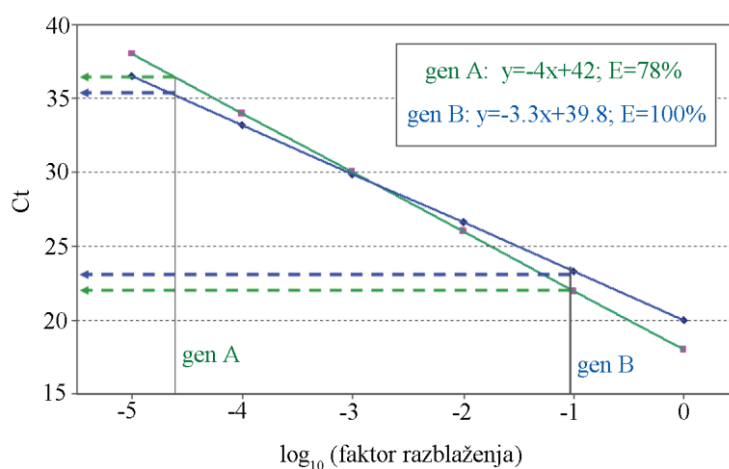
gde je X_n količina target sekvence u ciklusu n , X_0 početna količina sekvence, dok je E efikasnost amplifikacije i može imati vrednosti od 0 (nema amplifikacije) do 1 (u svakom ciklusu dolazi do dupliranja količine target sekvence).

Efikasnost reakcije je veoma važna za odabir metode kvantifikacije qPCR podataka i ona se izračunava iz nagiba (S) standardne krive:

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

Standardna kriva se pravi analiziranjem amplifikacije desetstrukih razblaženja početne

količine DNK ili cDNK (Slika 17).



Slika 17. Određivanje efikasnosti qPCR reakcije metodom standardne krive (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Kvantifikacija qPCR produkata može biti:

- 1) apsolutna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence; kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije
- 2) relativna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao relativni odnos količine referentnog uzorka (kalibrator) i merenog uzorka; u ovom radu kvantifikacija ekspresije gena od interesa vršena je metodom relativne kvantifikacije.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice, da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje tzv. endogene kontrole. Endogena kontrola je obično "housekeeping" gen čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom eksperimentalnih tretmana.

U slučaju relativne kvantifikacije, kvantifikacija ekspresije target gena može se izvršiti metodom relativne standardne krive ili komparativnom ddCt metodom, koja je korišćena u ovom radu.

Komparativna ddCt metoda

Komparativna ddCt metoda je najčešće korišćena metoda kvantifikacije ekspresije target gena primenom qRT-PCR tehnologije [144].

Količina target gena, normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je:

$Q = 2^{-ddCt}$, gde je

$$ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} =$$

$$(Ct_{target} - Ct_{endogena kont.}) - (Ct_{target, KALIBRATOR} - Ct_{endogena kont., KALIBRATOR})$$

Da bi kalkulacija primenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno jednaka i > 96%.

Merenje ekspresije apoptotskih gena qRT-PCR metodom

Ekspresija apoptotskih gena *BCL2*, *BAX* i *BCL2L12* je praćena qRT-PCR metodom na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green tehnike. Kao endogena kontrola je korišćen *ABL* gen. Nazivi i sekvence prajmera navedeni su u Tabeli 5.

Reakciona smeša finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente:

1. 20 ng cDNK
2. 1 x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
3. 1 x *Rox Low*
4. 2 pmol (*ABL*) / 0.5 pmol (*BCL2*, *BAX*, *BCL2L12*) "forward" prajmera
5. 2 pmol (*ABL*) / 0.5 pmol (*BCL2*, *BAX*, *BCL2L12*) "reverse" prajmera

Temperaturni profil reakcije:

1. 2 min/50°C
2. 3 min/95°C

15 sek/95°C	40 ciklusa
1 min/60°C	

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

Merenje ekspresije *FASR* gena qRT-PCR metodom

Ekspresija *FASR* je praćena qRT-PCR metodom na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan tehnike. Korišćen je Gene expression assay (Hs00163653_m1) (Tabela 3). Kao endogena kontrola je korišćen *ABL* gen.

Reakciona smeša finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente:

1. 20 ng cDNK
2. 1 x KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)
3. 1 x Rox Low
4. 1 x Gene Gene expression assay (Hs00163653_m1)

Temperaturni profil reakcije:

- 2 min/50°C
- 10 min/95°C

15 sek/95°C	40 ciklusa
1 min/60°C	

Uporedo je praćena ekspresija *ABL* gena korišćenjem prajmera i probe prikazanih u Tabeli 3.

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

Određivanje zastupljenosti *JAK2-V617F* alela u ukupnoj količini alela – “allele budren”

Za određivanje procenta zastupljenosti *JAK2-V617F* alela u ukupnoj količini *JAK2* alela korišćena je metoda apsolutne kvantifikacije. Reakcija je izvođena u dve tube, od kojih se u jednoj amplifikovao *wt*, a u drugoj mutirani alel (prajmeri dati u Tabeli 5).

Reakciona smeša finalnog volumena 10 μ l je sadržala sledeće komponente

1. 50 ng DNK
2. 1 x KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)
3. 1 x Rox Low
4. 1 x Gene Expression Assay Hs00234567_m1

Temperaturni profil reakcije:

2 min/50°C

10 min/95°C

15 sek/95°C

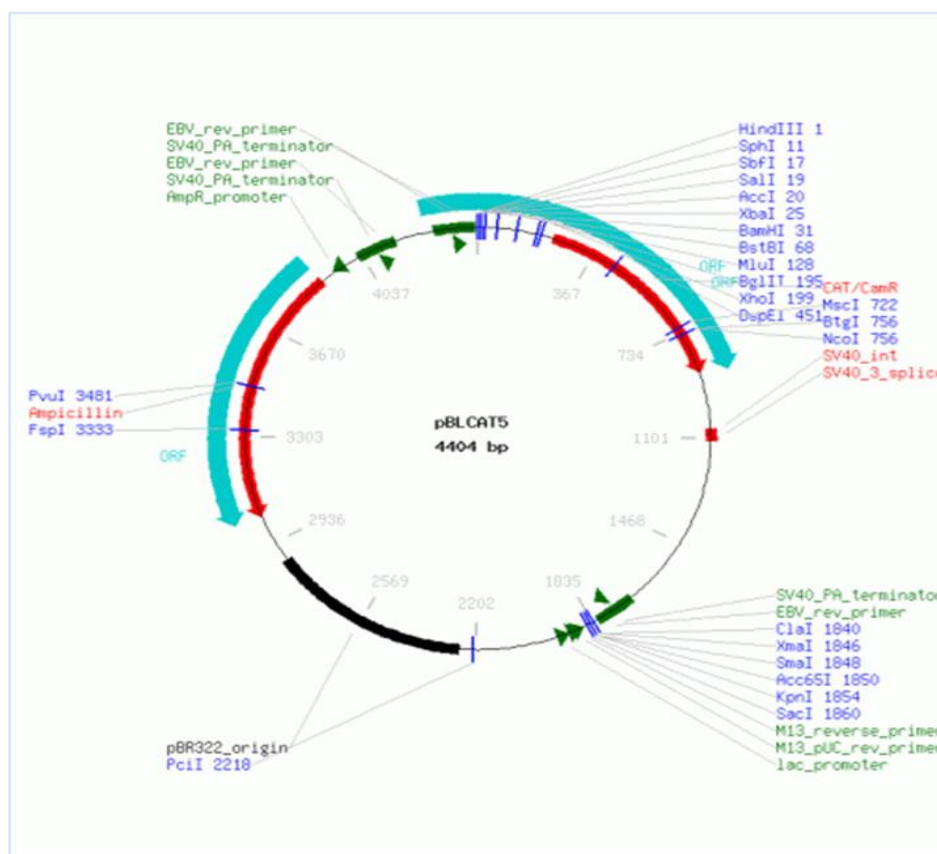
40 ciklusa

1 min/60°C

Standardna kriva konstruisana je pravljenjem serije razblaženja DNK iz HEL ćelijske linije, koja je homozigot za *JAK2-V617F* mutaciju u DNK iz K562 ćelija, koje su homozigot za *wt* alel. Ukupna količina DNK bila je 50 ng u svim reakcijama, a razblaženja su pravljenja praćenjem procenta mutiranog alela (100%, 10%, 1%, 0.1% i 0.01%). Konstruisane su standardne krive za *wt* i mutirani alel i sa njih očitane vrednosti za uzorke.

METODE ZA ANALIZU POLIMORFIZMA U GENU ZA JANUS KINAZU 2 KAO REGULATORA GENSKJE EKSPRESIJE

U cilju funkcionalne analize potencijalnih enhenserskih elemenata introna 14 *JAK2* gena, odabrani region je metodama rekombinantne DNK (digestija restrikcionim enzimima i ligacija) uklonirani u pBLCAT5 reporterski vektor (Slika 18).



Slika 18. Mapa pBLCAT5 reporterskog vektora.

Vektor pBLCAT5 je plazmidni vektor koji kao reporterski gen sadrži bakterijski gen za enzim hloramfenikol acetiltransferazu (CAT). CAT gen je pod kontrolom timidin kinaznog promotora Herpes Simplex virusa, koji obezbeđuje njegovu bazalnu aktivnost. Uzvodno od *CAT* gena se nalazi polilinkerski region u koji se uklonira željeni fragment; posle tranzijentne transfekcije u odabranu sisarsku ćelijsku liniju, CAT ELIZA esejom se meri aktivnost CAT enzima. Obzirom da je ispitivana sekvenca uklonirana ispred promotora koji kontroliše ekspresiju reporterskog CAT gena, ovaj plazmidni vektor se koristi za ispitivanje enhenserskih regulatornih elemenata. CAT

protein nije endogeno eksprimiran u sisarskim ćelijama, te je izmerena CAT aktivnost direktno proporcionalna aktivnosti ukloniranog regiona.

U prvom koraku, željeni DNK region se umnožava u PCR po protokolu datom u poglavlju "PCR amplifikacija dela introna 14 gena za *JAK2*". PCR produkt se proverava elektroforezom na 1% agaroznom gelu i prečišćava na kolonici za prečišćavanje PCR produkta (Qiagen).

Nakon toga metodom digestije odabranim restrikcionim enzimima formiraju se lepljivi krajevi na plazmidu i PCR produktu. Plazmid pBLCAT5 sadrži polilinker sa mestima sečenja za veliki broj restrikcionih enzima, između ostalih *HindIII* i *XbaI*. U slučaju PCR fragmenta, restrikciona mesta su kreirana pomoću prajmera u PCR reakciji. Time je omogućena insercija željenog fragmenta u polilinkerski region vektora u odgovarajućoj orijentaciji.

DIGESTIJA PLAZMIDA pBLCAT5 I PCR PRODUKATA

Smeša za digestiju finalne zapremine 30 μ l sadrži sledeće komponente:

- 400ng pBLCAT5 plazmida ili 300-800ng prečišćene PCR smeše
- 10xM pufer (finalno 1x)
- 0.1%BSA (finalno 0.01%)
- *HindIII*, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)
- *XbaI*, Pharmacia 15U/ μ l (finalno 3U)

Smeše za digestiju inkubirane su 16h na 37°C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta.

Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid sečen samo sa jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Nakon digestije plazmid i PCR produkti prečišćeni su na kolonici za prečišćavanje PCR produkta (Qiagen).

LIGACIJA

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim "lepljivim krajevima" vrši se u ligacionoj reakciji.

Ukupna količina DNK u ligacionoj smeši ne bi trebalo da pređe 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Ligaciona smeša finalne zapremine 10 - 20 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 100 ng digeriranog pBLCAT5 vektora
- odgovarajuću količinu (ng) digeriranog PCR fragmenta tako da molarni odnos plazmida i fragmenta bude 1:5
- 1 x reakcioni pufer
- 1.5 U T4 DNK Ligaze (Fermentas)

Ligaciona smeša je inkubirana preko noći na 16⁰C.

Napravljeni plazmidni konstrukti nazvani su prema insertu koji sadrže (npr. pBLCAT5_T i pBLCAT5_C).

KULTIVISANJE BAKTERIJA

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve manipulacije odvijaju se u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure, itd.) i alatke (eza, nastavak, čačkalica, itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja *DH5 α* kultivisane su u tečnom, LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj, LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca, 1.5% bakto-agar) [138]. Svi medijumi za kultivisanje se sterilišu autoklaviranjem.

Bakterije se kultivišu na temperaturi od 37°C. Kako bi se obezbedio selektivni rast transformanata, u tečni i čvrsti medijum dodaje se odgovarajući antibiotik. S obzirom da pBLCAT5 nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u medijum u finalnoj koncentraciji 80 µg/ml.

PRIPREMANJE *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Ćelijska membrana bakterija treba da se učini propustljivijom, a da se pritom ne umanjí vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost razmnožavanja [145].

Protokol:

Sa čvrste LB podloge se pojedinačna bakterijska kolonija prenese u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika (DH5α soj nije rezistentan na antibiotike). Kultivacija se vrši preko noći, uz aeraciju i mućkanje na 37 °C. Narednog dana, u svež LB medijuma (20 ml) inokulira se 1ml prekonocne kulture. Bakterije se gaje na 37 °C do postizanja gustine od 0,3 - 0,5 OD/ml, koja se određuje merenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini od 620 nm. Bakterije iz ove kulture razblažuju se inokuliranjem (2ml) u svež tečni LB medijuma (20 ml). Rast bakterijske kulture se nastavlja na 37 °C do gustine 0,5 OD₆₂₀/ml. Na ovaj način dobijamo veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

Taloženje bakterija se vrši centrifugiranjem na 7000 rpm na +4 °C u trajanju od 10 minuta (Sorvall centrifuga, SS-34). Dobijeni talog bakterija se resuspenduje u 10 ml hladnog 0,1 M CaCl₂, inkubira na ledu 10 minuta i ponovo centrifugira pri istim uslovima. Bakterijski talog se resuspenduje u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 0,1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije čuvaju se u alikvotima od 200 µl na -80 °C.

Poželjno je izvršiti proveru vijabilnosti kompetentnih ćelija njihovim zasejavanjem na neselektivnu LA podlogu. Takođe, poželjno je isprobati kompetentnost dobijenih bakterija njihovom transformacijom plazmidom koji

nosi rezistenciju na antibiotik i zasejavanjem na odgovarajuću selektivnu podlogu.

TRANSFORMACIJA *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija plazmidom u koji je ukloniran željeni fragment DNK je ključna metoda genetičkog inženjerstva kojom se obezbeđuju velike količine plazmidne DNK potrebne za naredne eksperimente. Bakterije se u ovom postupku, zbog svoje velike reproduktivne sposobnosti, koriste kao recipijenti strane DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu [146].

Protokol:

Kompetentne ćelije (200 µl) otopiti na ledu i dodati im ligacionu smešu plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago mešanje; inkubirati 30 min na ledu. Smešu prebaciti u ugrijanu tubu i inkubirati na 42⁰C/2 min, a zatim na ledu/10 min (izlaganjem smeše temperaturnom šoku propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum, što omogućava efikasnu transformaciju). Transformisanim bakterijama dodati 800 µl tečnog, LB medijuma bez antibiotika i omogućiti im rast u aerisanim uslovima na 37⁰C/30-60 min. Oporavak nastaviti dodavanjem 1 ml svežeg LB medijuma sa antibiotikom i rastom u aerisanim uslovima na 37⁰C/1-2 sata. Alikvot bakterijske kulture (20-100 µl) razmazati po čvrstoj, LA podlozi koja sadrži antibiotik. Rast bakterija odvija se preko noći na 37⁰C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama; s obzirom na selektivnost podloge, samo transformanti (bakterije koje su primile plazmidnu DNK) mogu da izrastu.

DETEKCIJA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA

Sekvenciranje konstrukata je konačna potvrda da plazmid sadrži željeni DNK insert, kao i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. U ovom radu, sekvenciranje konstrukata je vršeno pomoću prajmera korišćenih za umnožavanje željenog fragmenta za kloniranje.

Nakon postupka transformacije bakterija ligacionom smešom plazmida i DNK fragmenta, na selektivnoj podlozi sa ampicilinom će izrasti samo kolonije transformanata, s obzirom da pBLCAT5 plazmid nosi gen za rezistenciju na ampicilin. Međutim, u ovako postavljenom eksperimentu, ne može se znati da li plazmid koji je ušao u bakterijsku ćeliju sadrži u sebi fragment koji smo želeli da uklonimo ili je "prazan". Da bi se smanjio broj transformanta koji će se proveravati digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem na prisustvo plazmida sa insertom, rađena je preliminarna analiza velikog broja transformanata metodom brze lize.

Brza liza ("lysis gel electrophoresis")

Ovom metodom se u nekoliko koraka, brzo i efikasno, može uočiti postojanje plazmidnih molekula u velikom broju bakterija koje se analiziraju [147].

Protokol:

Dobijene transformante zasaditi na nove petri šolje sa selektivnom podlogom i ostaviti ih da izrastu preko noći na 37⁰C. U epruvetu sa 25 µl 10 mM EDTA pH=8 sterilnom čačkalicom preneti bakterijsku koloniju i vorteksovati. Dodati 25 µl sveže napravljenog 2 x "cracking" pufera (0.2 M NaOH, 0.5% SDS, 0.5 M saharoza). Smešu inkubirati na 70⁰C/10 min, a zatim postepeno ohladiti na sobnoj temperaturi. Dodati 1.5 µl 4 M KCl i inkubirati 5 min na ledu. Centrifugirati na 13000 rpm/5 min/+4⁰C; u talogu ostaje hromozomska DNK, a u supernatantu plazmidna DNK koja se analizira elektroforezom na 1% agaroznom gelu

Pored transformanata koji se obrađuju ovim postupkom, potrebno je uraditi i brzu lizu kontrolne bakterijske kolonije transformisane "praznim" plazmidom. Poređenjem elektroforetske pokretljivosti plazmida izolovanih iz kontrolnih kolonija i plazmida iz ispitivanih transformanata, identifikovaće se oni koji se kreću sporije od "praznih" plazmida, što znači da sadrže fragment koji smo želeli da uklonimo. Međutim, plazmidi izolovani brzom lizom nisu dovoljno čisti da bi se digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem moglo potvrditi prisustvo inserta. Za dobijanje relativno male količine plazmida koji je dovoljno prečišćen da se na njemu mogu raditi dalje analize koristi se "mini prep" metoda.

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali ("mini prep")

Za dobijanje relativno male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, korišćena je "mini prep" metoda [148].

Protokol:

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 2 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem i suspenziji se dodaje 300 µl svežeg TENS pufera (1x TE, 0,1 N NaOH, 0.5% SDS) koji lizira bakterije. Nakon kratkog vorteksovanja dodaje se 150 µl 3M Na-acetat pH 5,2. Nakon snažnog vorteksovanja centrifugira se 2 minuta na 13000rpm (Ependorf centrifuga). Supernatant u kome se nalazi DNK prebacuje se u čistu ependorf epruvetu, dok proteini ostaju u talogu. Dodaje se 1 ml hladnog 95% etanola, promeša i centrifugira pri istim uslovima. DNK talog se ispira hladnim 70% etanolom i nakon centrifugiranja pri istim uslovima suši u vakuum centrifugi. DNK se resuspenduje u 30 µl pufera 1xTE koji sadrži RNK-aza (finalna koncentracija 10 µg/ml). Plazmidnu DNK proveriti elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ova metoda daje plazmidnu DNK koja je dovoljno čista da bi se konstrukt proverio digestijom restrikcionim enzimima pomoću kojih je PCR fragment i kloniran. Na ovaj način se insert "izbacuje" iz plazmida, što se detektuje elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ovako izolovana plazmidna DNK nije dovoljno čista da bi željeni konstrukt mogao da se proveriti i sekvenciranjem. Iz transformanata kod kojih smo digestijom restrikcionim enzimima potvrdili prisustvo plazmida sa željenim insertom, plazmidna DNK je ponovo izolovana na maloj skali pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a (Qiagen).

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspešno da se sekvencira, korišćen je QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Protokol:

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 5 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem u 250 µl pufera P1. Zatim se dodaje 250 µl pufera P2 i sadržaj se meša prevrtanjem tube 4 do 6 puta. I nakon dodavanja 350 µl pufera N3 neophodno je momentalno i temeljno promešati sadržaj na isti način. Ovi koraci omogućili su lizu bakterija. Zatim se smeša centrifugira na 13000 rpm u toku 10 min. Supernatant se direktnim presipanjem iz ependorf epruvete nanosi na QIAprep kolonu. Nakon toga se vrši centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min i eluat se odbacuje. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. To se postiže dodavanjem 0.5 ml pufera PB i centrifugiranjem u toku 1 min. Ovaj korak nije neophodan u slučaju DH5α bakterijskog soja, ali s obzirom da ne ometa izolaciju i ne smanjuje prinos reakcije ne mora se preskočiti. Dodavanje 0.75 ml pufera PE i centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min takođe oslobađa DNK od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat se odbacuje. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona se prebacuje u čistu ependorf epruvetu i ponovo centrifugira na 13000 rpm u toku 1 min. Kolona se ponovo prebacuje u čistu ependorf epruvetu i dodaje se 100 µl pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 13000 rpm u toku 1 min dobija se 95-100 µl eluata u kome je rastvorena plazmidna DNK.

Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, potrebne za eksperimente transfekcije, korišćen je EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Protokol:

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 500 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37 °C uz aeraciju. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i glicerolski stok. Glicerolski stok nije potrebno otapati, dovoljno je zagrebat sterilnim nastavkom po površini i nastavak ubaciti u tečni medijum. Prekonoćnu kulturu je potrebno podeliti na dva dela i prebaciti u sterilnu plastičnu tubu od 250 ml. Centrifugiranje se vrši na 6000rpm u toku 20 min, nakon čega se supernatant prosipa, a bakterijski talog resuspenduje u 10 ml pufera P1 da bi se obezbedila liza bakterijskih ćelija. Od ovog koraka pa nadalje, sve se radi na ledu. Nakon što je talog u potpunosti rastvoren, sadržaj se prebacuje u sterilnu plastičnu tubu od 30 ml. Zatim se dodaje 10 ml pufera P2 a sadržaj se meša prevrtanjem 4 do 6 puta. Mešanje vorteksovanjem se ne preporučuje da ne bi došlo do mešanja plazmidne i genomske DNK. Nakon toga, smeša se inkubira na sobnoj temperaturi u toku 5 min. Zatim se dodaje 10 ml pufera P3 nakon čega je potrebno momentalno i temeljno promešati smešu prevrtanjem 4 do 6 puta i ostaviti je na ledu u toku 20 min. Smeša se zatim centrifugira na 13000 rpm u toku 30 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Da ne bi došlo do taloženja, supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK je najbolje odmah prebaciti u predhodno pripremljenu Qiagen kolonu. Kolona se priprema propuštanjem 10 ml pufera QBT, koji uz pomoć sile gravitacije prolazi kroz kolonu. Na isti način i supernatant prolazi kroz kolonu. DNK koja je ostala vezana za nju ispira se od nečistoća dva puta dodavanjem 30 ml pufera QC. Svi eluati se do ovog trenutka bacaju. Pre dodavanja sledećeg pufera, potrebno je kolonu učvrstiti za sterilnu staklenu corex epruveti od 30 ml. Zatim se dodaje 15 ml pufera QF koji eluira DNK sa kolone.

DNK se taloži dodavanjem 10.5 ml izopropanola. Nakon dodavanja, smešu je potrebno promešati prevrtanjem i centrifugirati na 8000 rpm u toku 30 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Supernatant se pažljivo odliva, a DNK talog se ispira sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 8000 rpm u toku 10 min, supernatant je potrebno ukloniti do poslednje kapi, kako bi se talog što pre osušio. DNK talog se rastvara u 200 µl 1xTE. Kako bi se DNK bolje rastvorila poželjno je da se ne rastvara odmah, nego da se ostavi na +4°C u toku noći.

ČUVANJE TRANSFORMANATA

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim, selektivnim LA podlogama, ukoliko su petri šolje zatvorene parafilmom i čuvaju se na +4⁰C okrenute poklopcem na dole.

Za duže čuvanje transformanata, pripremaju se glicerolski stokovi koji sadrže 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture.

Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20⁰C i duži niz godina na -80⁰C [145].

USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI

U ovom radu korišćene su 3 permanentne humane ćelijske linije, K562, HEL i HL-60.

K562 (DSMZ br. ACC-10) je permanentna ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije. K562 ćelije su krupne, okruglog oblika i rastu u suspenziji, a po deobi ostaju zajedno formirajući "grozdove". Za gajenje ovih ćelija je korišćen Eagle MEM medijum. Jedan litar ovog medijuma je sadržao: 100 ml 10 x Eagle MEM-a (Torlak), 100 ml fetalnog telećeg seruma (PAA), 28 ml 7.5% NaHCO₃, 10 ml 1 M HEPES-a pH= 7-7.2, 10 ml 3% L-glutamina, 10 ml 100 x neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich), 10 ml antibiotika (penicilin – streptomycin; 5000 U/ml; Sigma-Aldrich).

HL-60 (DSMZ br. ACC-3) je permanentna ćelijska linija akutne mijeloidne leukemije. HL-60 ćelije su sitne, okruglog oblika i rastu pojedinačno u suspenziji. Za gajenje je korišćen RPMI 1640 medijum sa natrijum bikarbonatom i L-glutaminom (PAA), sa 10% FCS-om i 1% antibiotikom.

HEL (DSMZ br. ACC 11) je permanentna eritroleukemijska ćelijska linija. Ćelije rastu u suspenziji, krupne su, okruglog oblika, a sporadično se može prometiti poneka gigantska ćelija. Za gajenje je korišćen RPMI 1640 medijum sa natrijum bikarbonatom i L-glutaminom (PAA), sa 10% FCS-om i 1% antibiotikom.

Odmrzavanje ćelija

Ćelije treba brzo odmrznuti, prenoseći ih sa -196⁰C u topli medijum (37⁰C). Brzim otapanjem, kristalne strukture brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju

ćelijske membrane.

DMSO koji je prisutan u medijumu za zaleđivanje, može se ukloniti centrifugiranjem na 1200 obr/min, 2min. Međutim, neposredno nakon otapanje ćelije su veoma osetljive. S obzirom da je koncentracija DMSO-a veoma niska nakon dodavanja svežeg medijuma, ovaj korak je poželjno odložiti.

Ispiranje ćelija PBS-om da bi se odstranile mrtve ćelije i DMSO najbolje je vršiti nakon 24-48 h od momenta odmrzavanja .

Potrebno je da prođe izvesno vreme da bi se ćelije oporavile posle odmrzavanja i ušle u normalni tempo rasta.

Zamrzavanje ćelija

Ćelije se zamrzavaju kad su u fazi logaritamskog rasta, ni pre (*lag* faza – neposredno posle pasažiranja, dok se ćelije oporavljaju i neznatno umnožavaju), ni posle (*stacionarna* faza koja se karakteriše sve većim umiranjem ćelija zbog prevelike gustine ćelija u medijumu za rast) [149].

Protokol:

Ćelijsku suspenziju prebaciti u sterilnu epruvetu i centrifugirati na 1800 rpm/7 min u kliničkoj centrifugi. Pažljivo ukloniti medijum, a talog ćelija resuspendovati u 1 x PBS puferu pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i centrifugirati pod istim uslovima (ispiranje). Talog od 2 x 10⁶ K562, odnosno 5 x 10⁶ HEL I HL-60 ćelija resuspendovati u 0.5-1 ml medijuma za zamrzavanje i sipati u ohlađene epruvete za zamrzavanje; medijum za zamrzavanje sadrži krioprotektivni agens DMSO (dimetilsulfoksid) i odgovarajući medijum (sa 10% fetalnog telećeg seruma) u odnosu 1:9 (krioprotektivni agens vezuje vodu i tako smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda u ćelijama).

Ćelijska suspenzija se mora zamrznuti polako (temperatura treba da opada 1-3⁰C /min) jer se tada preferencijalno stvaraju ekstra-, a ne intracelularni kristali leda, pa ćelije ostaju neoštećene. To se postiže držanjem ćelija prvo na +4⁰C (1 sat), zatim na -20⁰C (1 do 16 sati) i konačno na -80⁰C (16 do 72 sata). Tek tada se ćelije smeštaju u tečni azot (-196⁰C), gde su hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji na zanemarljivom nivou, i one ostaju vijabilne godinama. Alternativno, ćelije se pre smeštanja u tečni azot mogu

smestiti u specijalne kutije direktno na -80°C . Naime, ležišta ovih kutija uronjena su u izopropil alkohol koji omogućava postepeno spuštanje temperature unutar kutije.

Subkultivacija ćelija

Pasažiranje ćelije koje rastu u suspenziji obavlja se na sledeći način:

Protokol:

Medijum sa ćelijama prebaciti u tubu od 10 ml i centrifugirati u kliničkoj centrifugi na 1800 rpm/7 min (u slučaju K562 I HEL ćelija, grozdovi nastali pri deobi ćelija su prethodno "razbijani" blagim pipetiranjem, kako bi se oslobodile pojedinačne ćelije). Ukloniti supernatant, a talog ćelija resuspendovati u 1 ml 1 x PBS pufera pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4). Izbrojati ćelije i zasejati u odgovarajućem medijumu

K562 ćelije su zasejavane u koncentraciji od 0.2×10^6 ćelija/ml i pasažirane jednom u 2 dana u odnosu 1:2 ili 1:3.

HL-60 ćelije su zasejavane u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/ml i pasažirane jednom u 2-3 dana u odnosu 1:2 ili 1:3.

HEL ćelije su zasejavane u koncentraciji $2-3 \times 10^6$ ćelija/ml i pasažirane jednom u 3-4 dana u odnosu 1:3.

Brojanje ćelija

Ćelije se broje uz pomoć mikroskopa i pločice za brojanje [150, 151]. U izradi ovog rada korišćena je Bürker-Türk-ova pločica i sledeća formula za izračunavanje broja ćelija:

$$\text{ukupan br. ćelija} = \frac{\text{br. ćelija na pločici}}{\text{br. polja u kojima su ćelije brojane}} \times 0.5 \times 10^6/\text{ml}$$

Da bi brojanje bilo verodostojno, neophodno je dobro resuspendovati ćelije. Mešanjem 100 μl ćelija iz suspenzije sa istim volumenom 0.1% tripan-plavo boje omogućava se razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom.

TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA

Tranzijentna transfekcija K562 ćelija vršena je pomoću Lipofektamina 2000 (Invitrogen).

U ovom radu, ćelije su transfekovane pBLCAT5_T i pBLCAT5_C konstruktima i kontrolnim pBLCAT5 vektorom. Aktivnost CAT enzima u ekstraktima ćelija transfekovanih pBLCAT5 plazmidom je služila za izračunavanje relativnih CAT aktivnosti u ekstraktima ćelijama transfekovanih pBLCAT5_T i pBLCAT5_C konstruktima.

U svim eksperimentima istovremeno je vršena i kotransfekcija pCH110 plazmidom, koji je služio kao kontrolni vektor za normalizaciju efikasnosti transfekcije. Protokol za transfekciju preporučen od strane proizvođača je delimično modifikovan kako bi se postigla maksimalna efikasnost transfekcije u datim eksperimentalnim uslovima.

Protokol:

K562 ćelije dan pre transfekcije zasejati u petri šolje pod normalnim uslovima u Eagle MEM medijumu sa 10% fetalnog telećeg seruma. Sutradan ćelije oprati 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i prebrojati ih. Zasejati 2 x 10⁶ ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm²) u 2 ml Eagle MEM medijuma bez antibiotika. Rastvoriti 8 µg plazmidne DNK (6 µg pCAT konstrukta, odnosno kontrolnog pBLCAT5 vektora, i 2 µg pCH110 plazmida) u 250 µl Opti-MEM (GibcoBRL) i blago promešati. 20 µl Lipofektamina 2000 (Invitrogen) rastvoriti u 250 µl Opti-MEM, blago promešati i inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi. Pomešati rastvorenu DNK sa rastvorenim Lipofektaminom. Inkubirati 20 min na sobnoj temperaturi, čime se omogućava formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK. Komplekse dodati direktno u šolju sa ćelijama i nežno promešati. Inkubirati ćelije 24 sata/37⁰ u inkubatoru pre testiranja na ekspresiju transgena.

PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA

Protokol:

24 sata nakon transfekcije ćelije dva puta isprati 1 x PBS puferom pH=7.4 od medijuma, i talog ćelija resuspendovati u 1 ml TEN pufera (40 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM EDTA pH=8, 150 mM NaCl). Centrifugirati na 13000 rpm/2 min. Ćelijski talog vorteksovanjem resuspendovati u 100 μ l 0.25 M Tris-HCl pH=8. Liziranje ćelija se postiže tokom tri ciklusa naizmeničnog stavljanja ćelija u tečni azot (-196⁰C) i vodeno kupatilo (+37⁰C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja na 13000 rpm/5 min/+4⁰C, supernatant alikvotirati u nove tube

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT esej i β -galaktozidazni esej, ili ih zalediti i čuvati na -80⁰C. Da bi se izbegla degradacija CAT enzima i β -galaktozidaze, uzorak bi trebalo brzo zalediti kratkotrajnom inkubacijom u tečnom azotu, a tek tada skladištiti na -80⁰C.

β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ

β -galaktozidazni esej služi za normalizaciju rezultata CAT eseja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se prilikom transfekcije ćelija CAT reporterskim vektorom istovremeno vrši i kotransfekcija β -galaktozidaznim reporterskim vektorom (pCH110). Aktivnost enzima β -galaktozidaze sintetisanog u ćeliji je direktno proporcionalna količini pCH110 unetog transfekcijom i meri se pomoću eseja β -galaktozidazne aktivnosti (" β -galactosidase Enzyme Assay System"; Promega).

Protokol:

Uzorku razblaženom u Tris-HCl pH=7.8 dodati isti volumen 2 x Assay pufera koji sadrži 200 mM natrijum fosfatni pufer pH=7.3, 2 mM MgCl₂, 100 mM β -merkaptioetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Inkubirati na 37⁰C najmanje 30 minuta (tokom ovog vremena β -galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju).

Izmeriti absorbancu na talasnoj dužini od 420 nm (Microplate reader Multiscan RC, Labsystems)

Određivanje koncentracije β -galaktozidaze (mU) u ispitivanim ćelijskim lizatima vršeno je na osnovu standardne krive koja je dobijena istim postupkom, korišćenjem poznatih razblaženja ovog enzima: 1.5625 mU, 3.125 mU, 6.25 mU, 12.5 mU, 25 mU, 50 mU, i 100 mU.

CAT ELIZA ESEJ

Aktivnost CAT enzima (hloramfenikol acetil-transferaza) je određivana "CAT ELIZA esejom" ("CAT Enzyme Linked Immunosorbent Assay", Roche). CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej koji služi za kvantifikaciju hloramfenikol acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u eukariotskim ćelijama transfekovanim plazmidima koji sadrže CAT reporterski gen.

CAT ELIZA esej se bazira na "sendvič" ELIZA principu. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu bunarića mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetil-transferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitelo je obeleženo digoksigeninom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetil-transferazu. Za njega se vezuje sekundarno antitelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kvantifikacija hloramfenikol acetil-transferaze obezbeđuje se dodavanjem supstrata peroksidaze (ABTS). Peroksidaza razlaže supstrat dajući obojeni produkt. Apsorbanca uzorka je direkno proporcionalna količini hloramfenikol acetil-transferaze prisutne u uzorku.

Protokol:

Ćelijske ekstrakte pomešati sa "puferom za uzorak" do finalne zapremine od 200 μ l, naneti u bunariće na mikrotitar ploči i pokrivene inkubirati na 37⁰C/1 sat. Nakon vezivanja hloramfenikol acetil-transferaze iz uzorka, bunariće pet puta isprati sa po 250 μ l pufera za ispiranje. U bunariće dodati po 200 μ l anti-CAT-DIG antitela i pokriveno inkubirati na 37⁰C/1 sat. Nakon vezivanja primarnog antitela, bunariće pet puta isprati sa po 250 μ l pufera za ispiranje. U bunariće dodati po 200 μ l anti-DIG-POD antitela i pokriveno inkubirati na 37⁰C/1 sat.

Nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunariće pet puta isprati sa po 250 μ l pufera za ispiranje na kraju u bunariće dodati po 200 μ l supstrata i inkubirati pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Izmjeriti absorbancu na talasnoj dužini 405/492 nm (Microplate reader Multiskan RC, Labsystems).

Koncentracija CAT enzima u ispitivanim ćelijskim lizatima određena je na osnovu standardne krive koja je dobijena istim postupkom, korišćenjem poznatih razblaženja CAT enzima *E coli*: 1.5625 pg, 3.125 pg, 6.25 pg, 12.5 pg, 25 pg, 50 pg, i 100 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost β -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti plazmidnih konstrukata su izražene relativno u odnosu na normalizovanu vrednost CAT aktivnosti pBLCAT5 plazmida, i predstavljene su kao srednja vrednost \pm SEM dobijena iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

IZOLACIJA NUKLEARNIH PROTEINA

Za izolaciju nuklearnih proteina iz K562 ćelija u kulturi korišćena je metoda definisana od strane Schreiber *et al.* [152].

Protokol:

0.5-1 x 10⁶ ćelija ćelije resuspendovati u 1 ml 1 x TBS (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150 mM NaCl) i prebaciti u epruvetu. Nakon kratkog centrifugiranja na 13000 rpm, talog resuspendovati u 400 μ l hladnog pufera A (10 mM HEPES pH=7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) laganim provlačenjem kroz nastavak. Ćelije inkubirati 15 minuta na ledu, a zatim dodati 25 μ l 10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat centrifugirati na 13000 rpm/30 sekundi. Talog resuspendovati u 50 μ l hladnog pufera C (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) i epruvetu snažno protresati 15 min/+4⁰C. Jedarni ekstrakt centrifugirati na 13000 rpm/ 5 min/+4⁰C. Odvaditi supernatant sa proteinima i čuvati ga u alikvotima na -80⁰C.

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NUKLEARNIH PROTEINA

Koncentracija nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija određena je Bradford metodom [153].

U smešu finalne zapremine 1 ml stavlja se 10 µl proteinskog uzorka i 200 µl Bradford reagensa (Protein Assay Dye Reagent, BioRad). Nakon mešanja, meri se apsorpcije smeše na talasnoj dužini od 595 nm na spektrofotometru.

Koncentracije proteina u uzorku određuje se očitavanjem sa standardne krive, koja se pravi tako što se poznata razblaženja BSA proteina, uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I NUKLEARNIH PROTEINA

***In silico* analiza potencijalnih intronskih regulatornih sekvenci gena za JAK2**

In silico predikcija mogućih elemenata za vezivanje transkripcionih faktora sekvence koja sadrži SNP rs12343867 u okviru introna 14 JAK2 gena izvršena je korišćenjem programa MatInspector [154]. Parametri su podešeni za pronalaženje transkripcionih faktora kod Vertebrata, nivo značajnosti preko 80/100.

METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI

Za proučavanje interakcija enhancerskih DNK sekvenci i transkripcionih faktora korišćena je metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (*“electrophoretic mobility shift assay”* - EMSA).

U ovom radu analizirana je interakcija nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija sa dve dvolančane probe dužine 30 nukleotida Tabela 7, koje su se međusobno razlikovale u jednom, centralno postavljenom nukleotidu. Smeštanjem polimorfizma koji se ispituje u sredinu, potencira se destabilizacija nespecifičnih DNK/protein kompleksa. S obzirom da u *in vivo* uslovima regulatorne sekvence postoje u obliku dvolančane DNK, od komplementarnih jednolančanih oligonukleotida je, nakon obeležavanja, renaturacijom pravljena dvolančana proba.

U “supershift” esejima korišćena su anti-TGIF i anti-MEIS1/2 antitela, čije su karakterisitke prikazane u Tabeli 7.

Obeležavanje dvolančane probe

Reakcija obeležavanja 5' kraja dvolančane probe vršena je pomoću T4 Polinukleotidne kinaze (Fermentas).

- 5 pmol jednolančanog oligonukleotida, navedenog u Tabeli 8.
- 1 μ l γ -³²P ATP-a
- 1 x pufer A (Fermentas)
- 3U T4 Polinukleotidne kinaze (USB Europe GmbH)

Reakciona smeša je inkubirana na 37⁰C /30 min, nakon čega je proba prečišćena od neugrađenog aktiviteta propuštanjem kroz G-50 kolonu (GE Healthcare).

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određen je merenjem na scintilacionom brojaču.

Obeleženi jednolančani „coding“ oligonukleotid se uparava u vakuum centrifugi i rastvara u 25 μ l 10 puta razblaženom puferu za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA i 1 mM DTT). Zatim se dodaje komplementarni oligonukleotid u velikom višku (50 pmol), radi sigurnosti da će sve jednolančane obeležene probe biti uključene u reakciji hibridizacije. Reakcija hibridizacije obeleženog i neobeleženog oligonukleotida postiže se kratkom denaturacijom na temperaturi od 90⁰C u toku 3 minuta i renaturacijom - sporim hlađenjem do sobne temperature.

Reakcija prevođenja neobeleženih proba u dvolančanu formu se vrši na isti način.

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)

Interakcija nuklearnih proteina sa odabranom probom analizirana je modifikovanom standardnom metodom usporene elektroforetske pokretljivosti [155, 156]. Pri određenim uslovima nuklearni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment. Nakon razdvajanja na 4% poliakrilamidnom gelu, formirani kompleksi se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u poređenju sa onom koju ima slobodan fragment.

Reakciona smeša finalne zapremine 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 1-5 ng 32 P obeležene dvolančane probe (specifičnog aktiviteta oko 10000 cpm)
- 2-5 μ g jedarnih proteina
- 1 x reakcioni pufer (5 mM Tris pH=8.0; 25 mM NaCl; 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA; 50 % glicerol)

U odgovarajuće reakcije smeši su dodavane i sledeće komponente:

- specifični kompetitor (ista, ali neobeležena dvolančana proba)
- odgovarajuća antitela (1 μ g po reakciji)

Smeša se priprema na ledu, dok se reakcija vezivanja transkripcionih faktora za DNK probu odvija na 37⁰C/30 min. Nakon isteka tog vremena, reakciona smeša se meša sa 6 μ l boje (0.25%, bromfenol-plavo, 0.25% ksilen-cijanol, 30% glicerol) i nanosi na 4% poliakrilamidni gel (akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED). Elektroforeza se odvija u 0.5 x TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH=8), pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA. Poliakrilamidni gel se suši (45 min/75°C) i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski.

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim testovima i prikazani u tabelama i graficima uz propratnu diskusiju.

Od deskriptivnih statističkih parametara korišćeni su: srednja vrednost i standardna greška, raspon vrednosti promenljivih (minimum, maksimum), Odds Ratio (OR) i Confidence Interval (CI) i medijana vrednosti.

Za izračunavanje OR i CI između dve grupe kотиšćenj je program MedCalc [http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php]

Za ispitivanje veze između kategorijskih promenljivih korišćen je

neparametarski Hi-kvadrat test nezavisnosti (χ^2 - test).

Od statističkih testova za poređenje grupa korišćeni su neparametarski testovi: t-test i Man-Vitnijev test (Test sume rangova).

Svi statistički testovi su posmatrani na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0,05$. Statistička analiza je urađena primenom SigmaStat 3.5 statističkog paketa.

REZULTATI

Mijeloproliferativne neoplazije su heterogena grupa hematoloških maligniteta čija se molekularna osnova još uvek ispituje. Okarakterisana onkogenom *JAK2-V617F* mutacija nije prisutna kod svih pacijenata sa MPN, što govori o tome da su kod njih prisutni neki drugi mutacioni događaji ili neki drugi mehanizmi koji dovode do iste bolesti. Takođe, prisustvo *JAK2-V617F* mutacije objašnjava samo deo fenotipskih karakteristika ovih pacijenata.

Trenutna istraživanja u ovoj oblasti u fokusu imaju tri aspekta:

1. Transformacija u akutnu mijeloidnu leukemiju je u fokusu naučne pažnje, jer se smatra da bi otkrivanje diferencijalne ekspresije gena pre i posle ovog događaja moglo da rasvetli proces leukemogeneze uopšte.
2. Prisustvo 46/1 haplotipa kod ovih pacijenata stvara predispoziciju da nastane *JAK2-V617F* mutacija, ali se mehanizam njegovog dejstva ne zna; uticaj na transkripciju *JAK2* gena je još u prvim radovima potenciran kao jedan od mogućih mehanizama koji daju proliferativnu prednost malignom klonu.
3. Proces apoptoze je kod ovih pacijenata direktno pogođen prisustvom *JAK2-V617F* mutacije, jer ona aktivira STAT5 put, koji direktno aktivira anti-apoptotski *BCL2-xL* gen. Upotreba molekularnih terapeutika dovela je istraživanja procesa apoptoze kod ovih bolesnika u fokus, jer se ispostavilo da neki od njih deluju upravo preko apoptotskih puteva.

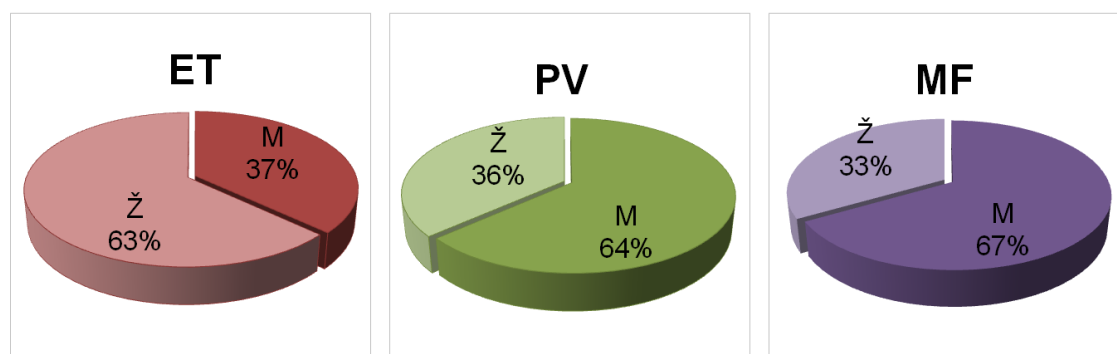
Naša istraživanja su uzela u obzir sva tri aspekta:

1. Okarakterisano je prisustvo aktivirajuće somatske mutacije *FLT3-ITD* kod pacijenta sa MPN, jer mutirani *FLT3* protein koristi isti signalni STAT5 put kao mutirani *JAK2* protein u procesu maligne transformacije progenitorske mijeloidne ćelije.
2. Praćena je ekspresija *JAK2* gena kod pacijenta sa MPN u korelaciji sa 46/1 haplotipom u funkciji karakterizacije njegovog transkripcionog potencijala

3. Praćena je ekspresija gena vezanih za proces apoptoze (*BCL2*, *BAX*, *BCL2L12*, *FASR*), njihova međusobna povezanost i povezanost sa procentom zastupljenosti *JAK2-V617F* mutacije, a sve u pokušaju da se rasvetli molekularni mehanizam patogeneze mijeloproliferativnih neoplazija

OSNOVNA OBELEŽJA GRUPE PACIJENTA SA MPN KORIŠĆENIH U STUDIJI

Studija je obuhvatila ukupno 199 pacijenata, od čega je bilo 102 pacijenta sa ET, 76 pacijenata sa PV i 21 pacijent sa MF. Prosečna starost ispitanika bila je 49 godina (opseg 12-81), zastupljenost polova je bila podjednaka u ukupnom uzorku (100 muškaraca i 99 žena). Kada se pogleda raspodela prema polovima unutar grupa kod ET je veći procenat obolelih žena, dok kod PV i MF je veći procenat obolelih muškaraca (Slika 19).

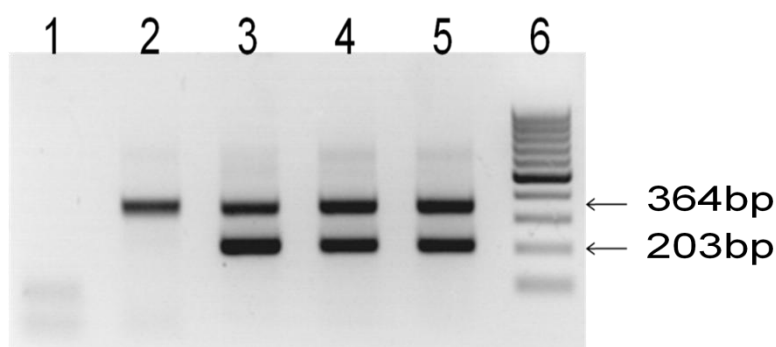


Slika 19. Raspodela pacijenata prema polovima. ET-esencijalna trombocitemija; PV-policitemija vera; MF-mijelofibroza.

DETEKCIJA *JAK2-V617F* MUTACIJE I MUTACIONI STATUS PACIJENATA SA MPN

Detekcija mutacije rađena je metodom alel-specifičnog PCR-a, a očekivane trake su bile dužine 364bp za *wt* alel i 203bp za mutirani alel. PCR produkti vizuelizovani su pomoću EtBr na 2% agaroznim gelovima i posmatrani pod UV

svetlom. Svaki gel sadržavao je kontrolu PCR reakcije (reakcija bez DNK), negativnu kontrolu (reakcija sa DNK pacijenta koji nema mutaciju) i pozitivnu kontrolu (reakcija sa DNK pacijenta sa mutacijom). Tipičan gel prikazan je na Slici 20.



Slika 20. Detekcija mutacije V617F u genu *JAK2* metodom alel-specifičnog PCR. 1. kontrola PCR reakcije; 2. uzorak pacijenata negativnih za mutaciju *JAK2*-V617F; 3, 4, 5. uzorci pacijenata pozitivnih za mutaciju *JAK2*-V617F; 6. DNK marker – lestvica od 100 bp.

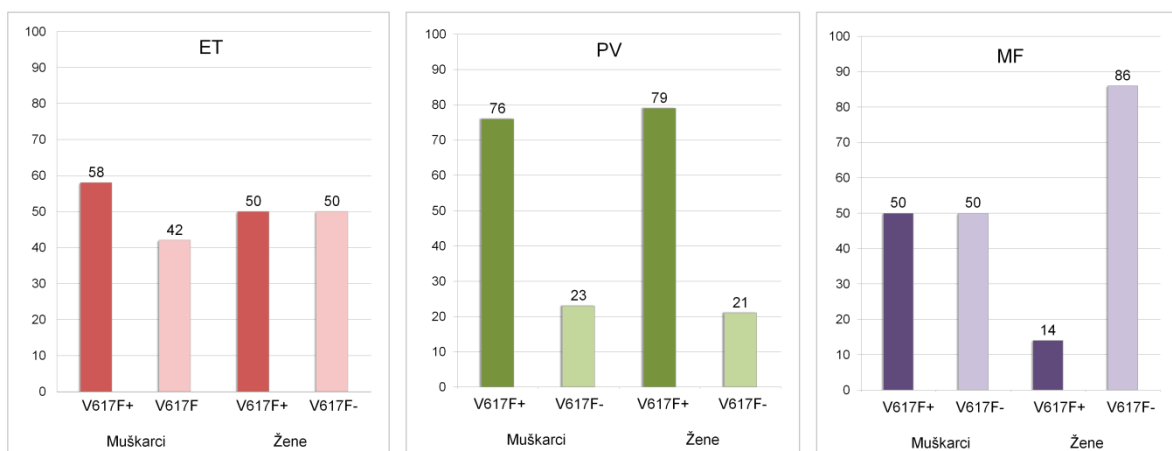
Od ukupnog broja od 199 analiziranih pacijenata sa MPN, *JAK2*-V617F mutacija je detektovana kod 53% ET, 78% PV i 38% MF pacijenata (Tabela 8).

Tabela 8. Detekcija *JAK2*-V617F mutacije kod pacijenata sa MPN

Dijagnoza	<i>JAK2</i> -V617F+	<i>JAK2</i> -617F-	Ukupan br. pacijenata
Esencijalna trombocitemija	54 (53%)	48 (47%)	102
Policitemija vera	59 (78%)	17 (22%)	76
Mijelofibroza	8 (38%)	13 (62%)	21

Kada se analizira zastupljenost *JAK2*-V617F mutacije po polovima, vidi se da je ona podjednaka kod osoba muškog i ženskog pola kod ET i PV, dok kod MF u grupi žena ima manje osoba sa mutacijom (Slika 21). Smatramo da je ovaj rezultat posledica neuravnoteženosti grupe pacijenata sa mijelofibrozom, u kojoj je bilo samo sedam

osoba ženskog pola.



Slika 21. Zastupljenost mutacije u bolestima zavisno od pola. ET-esencijalna trombocitemija; PV-policitemija vera; MF-mijelofibroza.

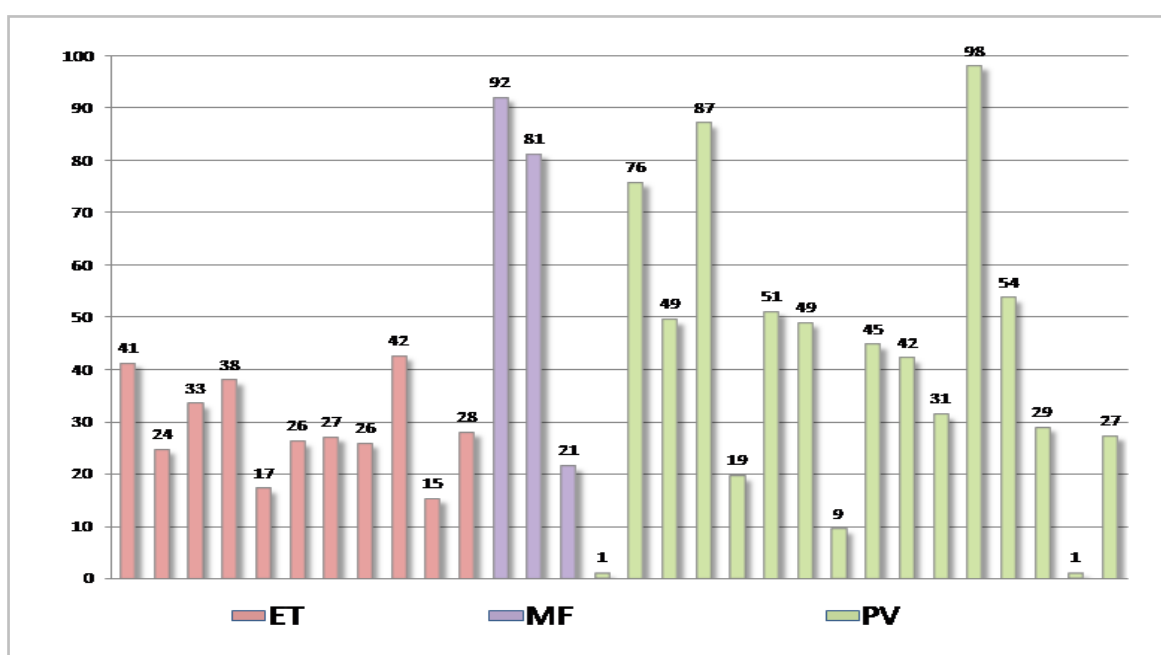
Prikazani rezultati su u potpunosti u skladu sa literaturom što se tiče zastupljenosti mutacije po grupama bolesti, kao i po distribuciji pola. Ono što ovu grupu čini specifičnom je opseg starosti pacijenata (12-81), a posebno činjenica da je u našoj grupi bolesnika čak njih 50/199 bilo mlađe od 40 godina. Ovakva distribucija je vrlo neuobičajena i važna kao populacioni marker.

ISPITIVANJE ZASTUPLJENOSTI *JAK2-V617F* ALELA (“*ALLELE BURDEN*”)

Analiza zastupljenosti *JAK2-V617F* alela kod pacijenta sa MPN ima značaja ne samo u dijagnostici i kliničkom tretmanu ovih pacijenata, već je i važan parametar u praćenju odgovora na terapiju. Stoga je njegovo određivanje važan korak u karakterizaciji fenotipskih karakteristika ovih bolesnika.

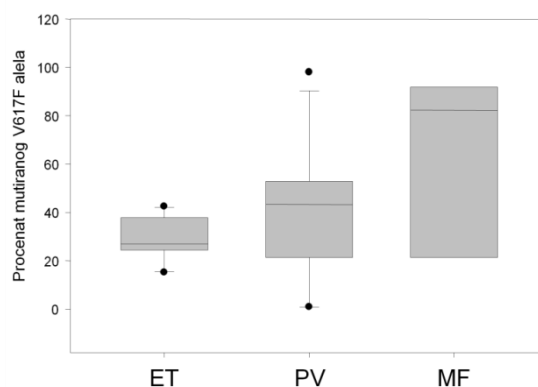
Za određivanje procenta zastupljenosti V617F alela u ukupnoj količini *JAK2* alela korišćena je metoda apsolutne kvantifikacije. Standardna kriva konstruisana je pravljem serije razblaženja DNK iz HEL ćelijske linije, koja je homozigot za *JAK2-V617F* mutaciju i DNK iz K562 ćelija, koje su homozigot za *wt* alel. Konstruisane su standardne krive za *wt* i mutirani alel i sa njih očitane vrednosti za uzorke.

Ispitivanje zastupljenosti mutiranog alela rađeno je na grupi od 30 *JAK2-V617F* pozitivnih pacijenata sa MPN. Kod njih je mutacioni status prethodno ustanovljen alel-specifičnim PCR-om. U našoj grupi, slično kao i u literaturnim podacima, pokazano je da različiti MPN entiteti imaju potpuno različit nivo mutiranog alela u svojim granulocitima. Kod pacijenata sa ET je prisutan nizak nivo mutiranog alela (medijana 27%; opseg 15–42%), kod pacijenata sa PV je prisutno značajno više (medijana 44%; opseg 1–98%), dok pacijenti sa MF imaju mutirani V617F alel u najvećem procentu: (medijana 81%; opseg 21–92%) (Slika 22).



Slika 22. Procenat mutiranog alela. Barovi predstavljaju procenat zastupljenosti mutiranog alela u ukupnoj količini alela u granulocitima MPN bolesnika. Bojama su označene bolesti, brojevi iznad barova su procenti prisutnog mutiranog V617F alela.

Kod PV dva pacijenta su imala procenat mutiranog alela manji od 1% (0.8%). Ovaj podatak je veoma značajan, jer govori da je metoda alel-specifičnog PCR-a kojom je detektovana mutacija kod naših pacijenata visoko osetljiva.



Slika 23. Grafički prikaz zastupljenosti *JAK2-V617F* mutacije kod pacijenta sa MPN. Pravougaonici predstavljaju 75% svih dobijenih vrednosti; linija unutar pravougaonika predstavlja medijanu; linije van pravougaonika predstavljaju maksimalne i minimalne vrednosti; tačke van pravougaonika predstavljaju ekstremne vrednosti.

Od ukupnog broja od 16 analiziranih pacijenata sa PV, njih 5 (31%) je imalo više od 50% mutiranog alela. Ova pojava objašnjava se činjenicom da je kod ovih bolesnika prisutan fenomen LOH, tako da se mutacija dovodi u homozigotno stanje. Proliferativni kapacitet ovakvog klona mnogostruko nadmašuje proliferaciju *wt* klona, te se kod njih detektuje mutirani alel u visokom procentu. U teoriji, ako je zastupljenost klona homozigotnog za mutaciju 50%, tada bi se detektovalo 50% mutiranog alela. Stoga se po konvenciji oni pacijenti kod kojih procenat zastupljenosti mutiranog alela prelazi 50% nazivaju homozigoti.

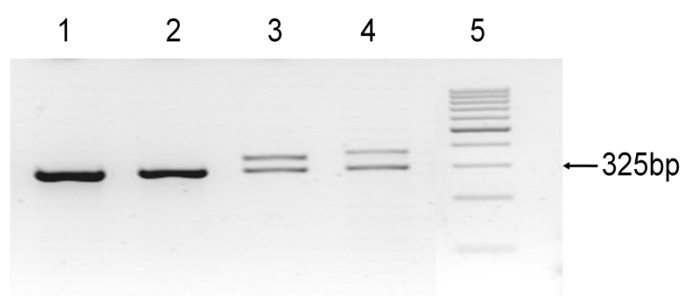
Kod pacijenata sa ET procenat mutiranog alela retko prelazi 50%, što je bio slučaj i kod naše grupe (medijana 27%; opseg 15–42%), To je važna karakteristika ET, jer kod nje, za razliku od PV i MF, postoji poliklonalna hematopoeza. Naime, istraživanja klonalnosti hematopoeze kod ovih pacijenata su pokazala da *wt* klon nije suprimiran postojanjem mutiranog klona, kao i da je pojava mitotičke rekombinacije retka.

Kod MF, *JAK2-V617F* alel je prisutan u visokom procentu: medijana 81%; opseg 21–92%), a procenat granulocita u kojima je mutacija prisutna u homozigotnom stanju je veoma visok (75%), što rezultuje visokim “*allele burden*”-om. Kod post- PV mijelofibroze klon koji nosi mutaciju u homozigotnom stanju kao da je u još većoj ekspanziji, tako da su kod ovih pacijenata prisutni najviši procenti mutiranog alela.

DETEKCIJA *FLT3*-ITD MUTACIJE KOD PACIJENTA SA MPN

Sve tri MPN bolesti se mogu transformisati u akutnu mijeloidnu leukemiju (AML), a ova transformacija poslednjih godina okupira pažnju velikog broja naučnika. Smatra se da će se izučavanjem mehanizama koji prevode druge hematološke malignitete u akutnu fazu, pronaći odgovor o mutacionim događajima koji su uzrok maligne transformacije hematopoetskog progenitora. U tom cilju mi smo istraživali prisustvo aktivirajuće *FLT3*-ITD mutacije kod pacijenta sa MPN.

Detekcija *FLT3*-ITD mutacije urađena je na 33 pacijenta sa MPN, od kojih je bilo 15 *JAK2*-V617F negativnih i 18 *JAK2*-V617F pozitivnih. Ni kod jednog od pacijenta nije detektovano prisustvo *FLT3*-ITD mutacije. Tipičan gel prikazan je na Slici 24.



Slika 24. Detekcija mutacije *FLT3*-ITD. Analiza PCR produkata na 4% agaroznom gelu: 1, 2. PCR produkt *wt-FLT3*; 3, 4. uzorci pacijenta sa AML sa različitim brojem ITD ponovaka; 5. DNK marker – lestvica od 100 bp.

Svi naši pacijenti analizirani su u ranoj fazi bolesti, neposredno nakon postavljanja dijagnoze na osnovu drugih kriterijuma. Naši rezultati pokazuju da je u ovom početnom stadijumu bolesti dovoljan jedan mutacioni događaj koji podiže proliferativni kapacitet malignog kлона. Dugoročno praćenje ovih bolesnika na markere proliferacije, među kojima *FLT3*-ITD može da ima značaj, mogli bi da rasvetle patogenezu ovih oboljenja i njihovu evoluciju u AML.

ANALIZA UTICAJA 46/1 HAPLOTIPA NA PATOGENEZU MPN

Haplotip 46/1 predstavljen je nizom SNP-ova koji se nalaze u *JAK2* genu. Ovaj haplotip za sada još nerazjašnjenim mehanizmom stvara predispoziciju za nastanak *JAK2-V617F* mutacije kod pacijenta sa MPN. Pokazano je da se SNP rs12343867 nalazi u LD (*linkadge disequilibrium*) sa *JAK2-V617F* pozitivnim MPN. Učestalost nukleotida C u okviru SNP rs12343867T>C je značajno povećana kod pacijenata u odnosu na kontrole, a takođe i učestalost CC genotipa. Naš prvi cilj bio je da okarakterišemo našu grupu pacijenta sa MPN i zdravih kontrola u odnosu na 46/1 haplotip.

DISTRIBUCIJA *JAK2* SNP rs12343867 GENOTIPA I ALELA KOD PACIJENTA SA MPN I KONTROLA

Određivanje genotipa SNP rs12343867T>C sprovedeno je direktnim sekvenciranjem PCR produkata na DNK izolovanoj iz granulocita i periferne krvi pacijenta sa MPN. Ispitivana grupa sastojala se od 58 pacijenata i 22 zdrave kontrole. Medijana starosti pacijenata je bila 56 godina (opseg 16-82), a kontrola 42 godine (opseg 22-84). U ispitivanoj grupi bilo je 38 V176F pozitivnih i 20 V617F negativnih pacijenata. Učestalost genotipova i alela kod pacijenta sa MPN, kod pacijenata sa *JAK2-V617F* mutacijom i pacijenata bez mutacije, kao i kod zdravih kontrola data je u Tabeli 9.

Tabela 9. JAK2 SNP rs12343867 genotip i frekvencija alela kod pacijenta sa MPN i kontrola

rs12343867 genotip/alel n (%)	Pacijenti			Kontrole
	V617F+ (n=38)	V617F- (n=20)	Ukupno (n=58)	Ukupno (n=22)
CC	14 (37)	3 (15)	17 (30)	2(9)
CT	15 (39)	9 (45)	23 (40)	8 (36)
TT	9 (24)	8 (40)	17 (30)	12 (55)
Frekvencija alela n (%)				
C alel	43 (56)	15 (37)	58 (50)	12 (27)
T alel	33 (44)	25 (63)	58 (50)	32 (73)

Analiza je pokazala da je učestalost CC/CT genotipa značajno veća u grupi pacijenata nego u kontrolnoj grupi ($p=0,04$; OR 2,8; 95% CI 1,0-7,8). Takođe, frekvencija C alela je značajno povećana kod pacijenata u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,01$; OR 2,7; 95% CI 1,3-5,7) (Tabela 3).

Kada se analizira genotip V617F pozitivnih pacijenata i kontrola, uočava se da postoji statistički značajna razlika u frekvenciji zastupljenosti CC/CT genotipa kod pacijenata u odnosu na kontrole ($p=0,01$; OR 3,9; CI 1,2-11,8). Kada se u istom kontekstu posmatra grupa V617F negativnih pacijenata, uočava se da nema razlike u zastupljenosti CC/CT genotipa u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,3$; OR 1,8; CI 0,6-4,0) (Tabela 10).

Tabela 10. Korelacija između *JAK2* SNP rs12343867 genotipa/alela prema *JAK2*-V617F mutacionom statusu

rs12343867 genotip/alel	MPN vs. kontrolna grupa		V617+ vs. V617-		V617+ vs. kontrolna grupa		V617- vs. kontrolna grupa	
	OR (95% CI)	p vrednost	OR (95% CI)	p vrednost	OR (95% CI)	p vrednost	OR (95% CI)	p vrednost
CC vs CT/TT	4.0 (0.9-0.2)	0.07	3.3 (0.8-13.3)	0.09	5.8 (1.2-28.7)	0.03	1.7 (0.2-1.8)	0.5
CC vs. TT	6.0 (1.2-0.9)	0.03	4.2 (0.8-19.9)	0.07	9.3 (1.7-51.8)	0.01	2.2 (0.3-16.)	0.4
CT vs TT	2.0 (0.7-6.1)	0.20	1.5 (0.4-5.2)	0.50	2.5 (0.7-8.4)	0.10	1.7 (0.4-6.2)	0.4
CC/CT vs TT	2.8 (1.0-7.8)	0.04	2.2 (0.7-6.9)	0.20	3.9 (1.2-11.8)	0.01	1.8 (0.5-6.1)	0.3
C alel vs. T alel	2.7 (1.3-5.7)	0.01	2.2 (0.9-4.7)	0.05	3.5 (1.5-7.7)	0.002	1.6 (0.6-4.0)	0.3

Analizom parametara krvne slike pacijenata sa normalnim vrednostima, ustanovljeno je da haplotip nema uticaja na nivo hemoglobina i hematokrit kod pacijenta sa MPN ($p > 0,05$).

Ovi rezultati ukazuju da se populacija naših pacijenata, kao i kontrola, nalaze u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži. Međutim, učestalost C alela je značajno povećana kod pacijenata, jasno ukazujući da alel C koreliše sa prisustvom bolesti. On zapravo predstavlja faktor rizika za nastanak *JAK2*-V617F- pozitivnih MPN, jer je frekvencija C alela kod *JAK2*-V617F negativnih pacijenata ista kao kod zdravih kontrola.

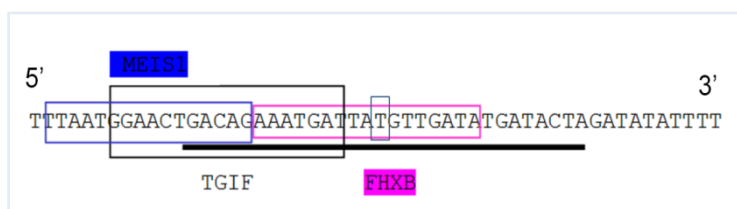
ANALIZA UTICAJA HAPLOTIPA 46/1 NA EKSPRESIJU *JAK2* GENA

Mogućnost da 46/1 *JAK2* haplotip doprinosi proliferativnom kapacitetu malignog klona uticajem na transkripciju *JAK2* gena sugerirana je u prvim studijama koje su okarakterisale ovaj haplotip. U našoj studiji pokušali smo da utvrdimo postojanje transkripcionih regulatornih elemenata u intronskim sekvencama gena za Janus kinazu 2, koji bi imali ulogu u finom regulisanju njegove transkripcije. Stoga smo ispitali regulatorni potencijal dela introna 14 gena za *JAK2* u kome se nalazi SNP

rs12343867T>C, koji pripada 46/1 haplotipu.

IN SILICO PREDIKCIJA

In silico predikcija mogućih elemenata za vezivanje transkripcionih faktora (TF) u okviru sekvence koja sadrži SNP rs12343867T>C introna 14 *JAK2* gena, izvršena je korišćenjem programa MatInspector [154]. Parametri su podešeni za pronalaženje transkripcionih faktora kod Vertebrata, nivo značajnosti preko 80/100. Programom je pronađeno više mogućih mesta vezivanja različitih transkripcionih faktora u ovom DNK regionu. Posebno je bio interesantan TF FHXB, koji se po predikciji vezuje kada je nukleotid T prisutan u sekvenci, a ne vezuje se kada je nukleotid C prisutan u sekvenci. Ipak, za rad smo se odlučili za dva TF za koja je pokazana ekspresija u mijeloidnim ćelijama: transkripcioni represor TGIF (TG interaction factor) i transkripcioni aktivator MEIS1 (Myeloid ectopic viral integration site 1). Sekvenca ovog regiona sa TF koji se vezuju za njega data je na Slici 25.

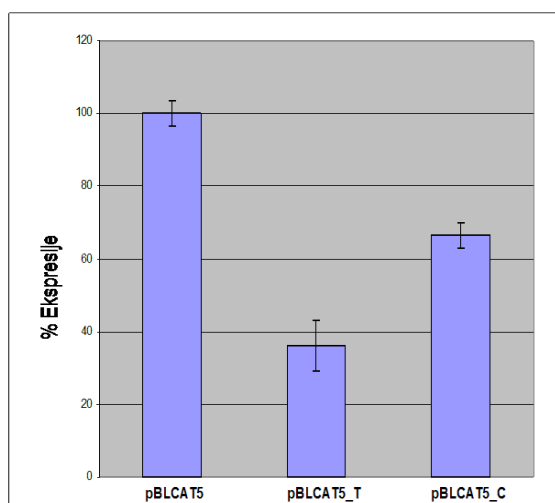


Slika 25. In silico predikcija potencijalnih transkripcionih faktora koji se vezuju za *JAK2* SNP rs12343867. Uokvireni su regioni za koje se po predikciji vezuju transkripcioni faktori MEIS1, TGIF i FHXB (Fork head domain factor). Polimorfno mesto T/C označeno je uokvirenim nukleotidom T. FHXB se po predikciji ne vezuje za sekvencu u kojoj je nukleotid T zamenjen nukleotidom C.

FUNKCIONALNA ANALIZA DELA INTRONA 14 *JAK2* GENA

Da bismo potvrdili ulogu odabranog DNK segmenta u regulaciji ekspresije gena za *JAK2 in vitro*, transfekovali smo humane K562 ćelije sa reporterskim plazmidnim konstruktom koji eksprimira CAT pod kontrolom bazalnog promotora i odabranog DNK segmenta. Konkretno, korišćen je pBLCAT5 plazmid kod koga *tk* promotor

omogućava bazalnu ekspresiju *CAT* gena, a ispitivana 470bp dugačka sekvenca iz četrnaestog introna gena za *JAK2* je potencijalni regulator. Funkcionalna analiza introna 14 *JAK2* gena koji sadrži SNP rs12343867 pokazala je statistički značajnu razliku između konstrukata koji sadrže ovo polimorfno mesto u obe varijante (T/C): konstrukt pBLCAT5_T je pokazao 2,7 smanjenje reporterske aktivnosti ($p < 0,001$), dok je konstrukt pBLCAT5_C pokazao 1,4 ($p = 0,001$) smanjenje u odnosu na kontrolni plazmid sa bazalnom promotorskom aktivnošću pBLCAT5, koji je uzet kao 100% (Slika 26). Takođe, statistički značajna bila je i razlika u aktivnostima analiziranih konstrukata međusobno ($p < 0,05$). Značajnost razlike između srednjih vrednosti u odnosu na standardnu devijaciju potvrđena je Studentovim t-testom. Ovo pokazuje da je analizirani DNK segment *cis*-element koji ima mogućnost smanjenja promotorske aktivnosti.



Slika 26. Funkcionalna analiza potencijalnog *cis* regulatornog elementa u intronu 14 gena za *JAK2*. pCH110 vektor koji eksprimira β -gal korišćen je da normalizuje razlike u transfekcionoj efikasnosti. Vektor pCAT5 (*tk* promotor omogućava ekspresiju *CAT* gena) korišćen je kao pokazatelj bazalnog nivoa ekspresije *tk* promotora. Normalizovana *CAT* aktivnost analiziranog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost pCAT5 konstrukta, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost \pm standardna devijacija dobijena iz tri nezavisna eksperimenta. Razlika u aktivnosti pCAT5 i konstrukata dostiže statističku značajnost ($p < 0,001$ i $p = 0,001$).

Prikazani rezultati pokazuju da analizirani deo četrnaestog introna gena za *JAK2* predstavlja transkripcioni regulatorni *cis*-element i funkcioniše kao represor. Ovo je prvi

put da je za neki region u okviru introna gena za *JAK2* pokazano da je regulatorni transkripcioni element.

EMSA ANALIZA

S obzirom da je *in silico* analiza predvidela vezivanje transkripcionog faktora za deo sekvence četrnaestog introna gena za *JAK2* koji sadrži SNP rs12343867, kreirali smo oligonukleotidnu probu T/C. Da bismo utvrdili da li se za posmatrani region vezuju transkripcioni faktori, koji transkripcioni faktori su u pitanju, i da li postoje razlike u formiranju kompleksa između dve probe, primenili smo metodu usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA).

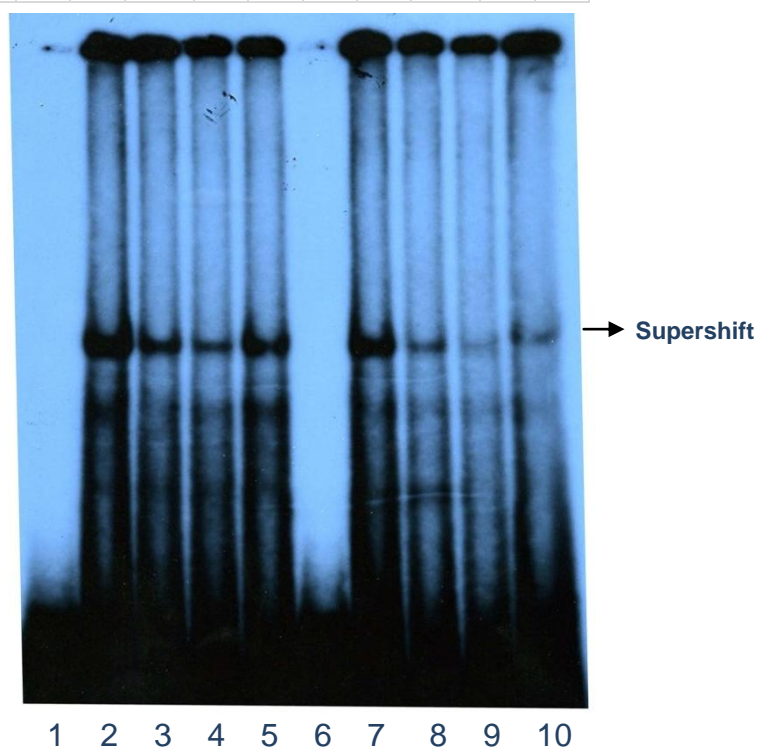
Probe su inkubirane sa jedarnim proteinima iz K562 i HEL ćelijskih linija. Ekstrakti humane eritroleukemične ćelijske linije, K562, uključeni su u analizu jer predstavljaju dobar surogat za mijeloidnu prirodu ovih bolesti, dok ćelijska linija HEL ima *JAK2* mutaciju u homozigotnom stanju, te se može smatrati reprezentativnom za stanje koje postoji kod pacijenata.

Inkubacija radioaktivno obeleženih proba koje su se razlikovale u jednom nukleotidu (T/C) sa jedarnim proteinima iz HEL i K562 ćelija dovela je do pojavljivanja istog paternog traka kod obe probe i kod obe ćelijske linije. Obzirom da razlika ne postoji, prikazana je samo proba koja sadrži K562 varijantu. Analizirane probe formiraju jedan kompleks sa jedarnim proteinima. Specifičnost kompleksa demonstrirana je kompeticionim esejima dodavanjem neobeležene probe.

Identitet transkripcionih faktora vezanih unutar kompleksa otkriven je u "supershift" EMSA reakciji uz primenu antitela specifičnih za TGIF i MEIS1/2 proteine. "Supershift" analiza korišćenjem antitela na protein TGIF pokazala je da nema razlike između pokretljivosti kompleksa na dvema probama. Međutim, antitelo na MEIS1/2 specifično je usporavalo pokretljivost kompleksa sa probom koja je sadržala nukleotid C, a ne i sa probom T (prikazano strelicom, Slika 27).

Ovaj rezultat potvrđuje da ispitivani DNK region, koji sadrži rs12343867, deluje kao intronski transkripcioni regulatorni element *JAK2* gena. Što je još važnije, ovaj *cis*-regulatorni element pokazuje diferencijalni afinitet za vezivanje transkripcionog aktivatora MEIS1/2 u odnosu na nukleotid T/C.

	Oligonukleotid T					Oligonukleotid C				
Obeležena proba T	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Neobeležena proba T	-	-	x1.3	x2	-	-	-	-	-	-
K562 nuklearni ekstrakti	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
MEIS 1/2 antitelo	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Obeležena proba C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Neobeležena proba C	-	-	-	-	-	-	-	x1.3	x2	-

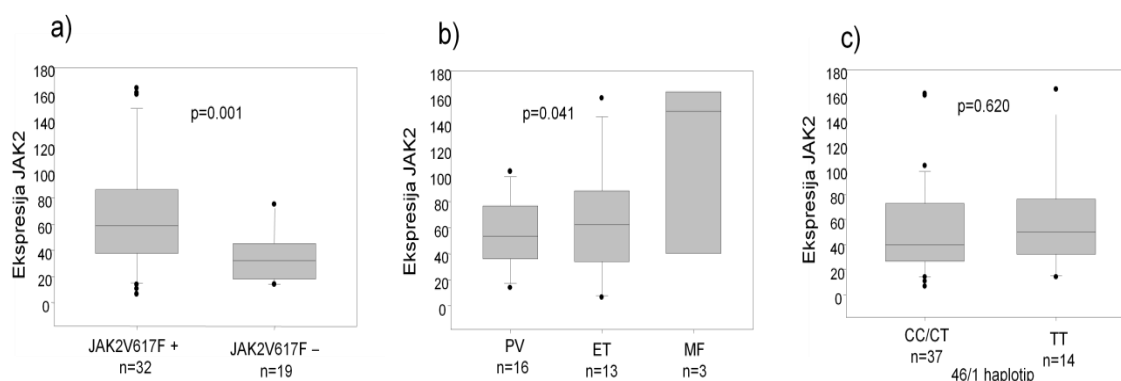


Slika 27. EMSA analiza. Analiza interakcije radioaktivno obeleženih dvolančanih T/C proba sa jedrnim proteinima iz K562 ćelija metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Radi potvrde specifičnosti formiranih kompleksa, ista neobeležena tj. hladna proba dodavana je u naznačenom molarnom višku. “Supershift” reakcija dodavanjem antitela na transkripcijski faktor MEIS1/2 prikazana je u poslednjoj koloni. Formirani kompleks (“supershift”) označen je strelicom.

EKSPRESIJA *JAK2* GENA KOD PACIJENATA SA MPN: KORELACIJA SA SNP rs12343867 U INTRONU 14 GENA ZA JANUS KINAZU 2

Nema mnogo podataka u literaturi o ekspresiji *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN. Uočeno je da postoji korelacija između nivoa *JAK2* iRNK i prisustva *JAK2*-V617F mutacije [40]. Mi smo analizirali ekspresiju *JAK2* gena u granulocitima MPN pacijenata i zdravih kontrola metodom qRT-PCR-a, korišćenjem TaqMan tehnike. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL-60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama ("relative units"; RU).

Ekspresija *JAK2* gena praćena je u grupi od 51 pacijenta (18 PV, 27 ET i 6 MF) i 12 zdravih kontrola. Medijana starosti pacijenata (26 muškaraca i 25 žena) je bila 48,5 godina (opseg 16 - 75), dok je medijana starosti zdravih kontrola (6 muškaraca i 6 žena) bila 42 godine (opseg 22 - 84). Uočena je izuzetna heterogenost u ekspresiji *JAK2* gena kod pacijenata (medijana 43,24; opseg 6,40–164,16), dok je kod kontrola uočena znatno ujednačenija ekspresija (medijana 35,77; opseg 20,62-100,57). Nije uočena razlika u ekspresiji *JAK2* gena između ukupne grupe analiziranih pacijenata i kontrola ($p=0,539$). Međutim, kada se analizira ekspresija *JAK2* gena u vezi sa prisustvom *JAK2*-V617F mutacije, uočavaju se značajne razlike: MPN pacijenti sa mutacijom imali su značajno viši nivo *JAK2* iRNK u svojim granulocitima u odnosu na one bez mutacije ($p=0,001$) (Slika 28a).



Slika 28. Analiza ekspresija *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN. a) Ekspresija *JAK2* gena kod pacijenata sa V617F mutacijom i bez mutacije; b) Poređenje ekspresije *JAK2* gena kod PV, ET i MF pacijenata; c) Zavisnost ekspresije *JAK2* gena u zavisnosti od SNP rs12343867 genotipa. p vrednosti za svaki rezultat date su u okviru slike.

Pored toga, u grupi bolesnika sa *JAK2-V617F* mutacijom, značajna razlika u ekspresiji *JAK2* gena uočena je između pacijenata sa PV, ET i MF ($p=0,041$), gde su pacijenti sa MF imali najviši nivo *JAK2* iRNA (Slika 28b).

Posebno je analizirana ekspresija *JAK2* gena u korealaciji sa prisustvom C/T alela u okviru SNP rs12343867 u intronu 14 *JAK2* gena. Ispitivanje uticaja ovog novog regulatornog elementa u intronu 14 pokazalo je da su pacijenti sa C alelom u okviru rs12343867 imali sličan nivo ekspresije *JAK2* gena kao pacijenti sa T alelom ($p=0,620$) (Slika 28c). Prema tome, uticaj SNP rs12343867 na *JAK2* ekspresiju nije utvrđen.

Sažetak

- Na osnovu ovih rezultata zaključili smo da represorski regulatorni element u intronu 14 gena za *JAK2*, koji smo pronašli i okarakterisali na *in vitro* nivou, deo složene mašinerije koja moduliše ekspresiju *JAK2* gena.

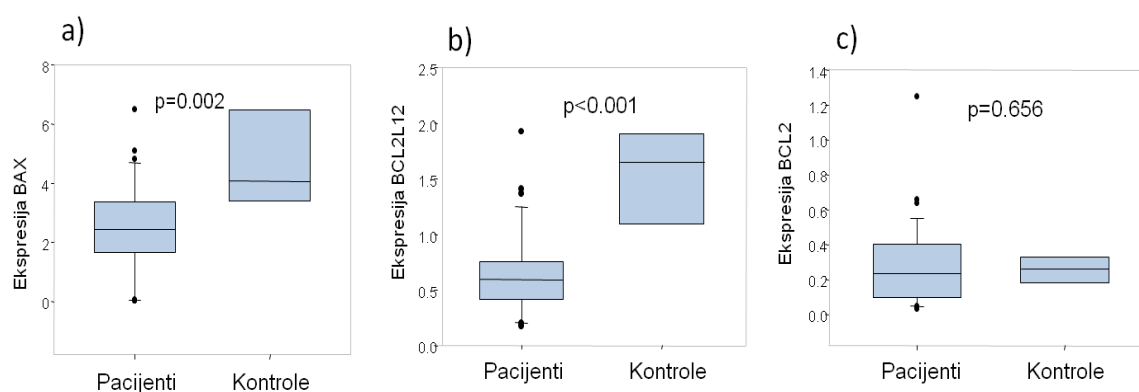
ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH GENA KOD PACIJENATA SA MPN

U ovom radu analizirana je ekspresija članova *BCL2* familije gena *BAX*, *BCL2* i *BCL2L12* u granulocitima pacijenata sa MPN i zdravih kontrola. Ekspresija je praćena qPCR metodom korišćenjem SYBR Green tehnike. Takođe, ispitana je i ekspresija *FASR* gena, kao najznačajnijeg predstavnika markera spoljašnjeg apoptotskog puta korišćenjem TaqMan tehnike. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL-60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama ("relative units"; RU). Takođe je korelisana ekspresija apoptotskih gena sa mutacionim statusom MPN pacijenata, kao i sa procentom zastupljenosti *JAK2-V617F* alela.

ANALIZA EKSPRESIJE GENA UNUTRAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA

Studija markera unutrašnjeg apoptotskog puta je obuhvatila 37 pacijenata (18 žena i 19 muškaraca; medijana starosti 48 godina; raspon 16-74) i 8 zdravih kontrola (6

žena i 2 muškarca; medijana starosti 45,5 godina; raspon 31-84). Rezultati su pokazali da je kod pacijenata smanjena ekspresija gena *BAX* i *BCL2L12* (medijana 2,51; 0,59) u poređenju sa normalnim kontrolama (medijana 4,61 i 1,61) ($p=0,002$, $p<0,001$) (Slika 29 a i b). Ekspresija anti-apoptotskog *BCL2* gena nije promenjena kod pacijenata u odnosu na kontrole (medijana 0,23 i 0,25; $p=0,656$) (Slika 29c).



Slika 29. Ekspresija gena unutrašnjeg apoptotskog puta kod pacijenata sa MPN. a) ekspresija pro-apoptotskog *BAX* gena smanjena je kod pacijenata u odnosu na kontrole; b) ekspresija *BCL2L12* gena smanjena je kod pacijenata u odnosu na kontrole; c) anti-apoptotski *BCL2* gen nije različito eksprimiran kod pacijenata i kontrola. Odgovarajuće p vrednosti prikazane su u okviru svake slike.

Sažetak

- Posmatrajući celokupan uzorak pacijenata sa MPN, primećeno je da je ekspresija pro-apoptotskog *BAX* gena smanjena kod pacijenata u odnosu na kontrole, a takođe je smanjena ekspresija *BCL2L12* gena čija se anti- ili pro-apoptotska uloga još ne zna. Ekspresija anti-apoptotskog *BCL2* gena nije promenjena kod pacijenata u odnosu na kontrole. Ovi rezultati ukazuju da deregulisana apoptoza kod MPN pacijenata predstavlja mehanizam akumulacije malignog klona.

Određivanje odnosa ekspresije BCL2/BAX kod obolelih od MPN

Poznato je da su proteini BCL2 i BAX sposobni da međusobno interaguju formirajući homo- i hetero- dimere i na taj način vrše modulaciju apoptotskog procesa. Pretpostavlja se da odnos ekspresije *BCL2* i *BAX* gena može odrediti u kom smeru će

ćelija odreagovati na apoptotski stimulus [157].

Analizom *BCL2/BAX* odnosa kod pacijenata sa MPN i zdravih kontrola nije primećena statistički značajna razlika ($p=0,119$), a takođe su i medijane odnosa *BCL2/BAX* bile slične kod pacijenata i kontrola (0,1 vs. 0,06).

Sažetak

- Određivanjem vrednosti odnosa ekspresije *BCL2/BAX* gena nije se došlo do zaključaka o efektima njihove međusobne interakcije u procesu patogeneze MPN. Može se zaključiti da oni predstavljaju snažne supresore, odnosno aktivatore procesa apoptoze, a brojne međusobne interakcije u koje stupaju apoptotski proteini određuju krajnju sudbinu ćelije.

ANALIZA EKSPRESIJE GENA UNUTRAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA KOD MPN ENTITETA I KORELACIJA SA PRISUSTVOM *JAK2-V617F* MUTACIJE

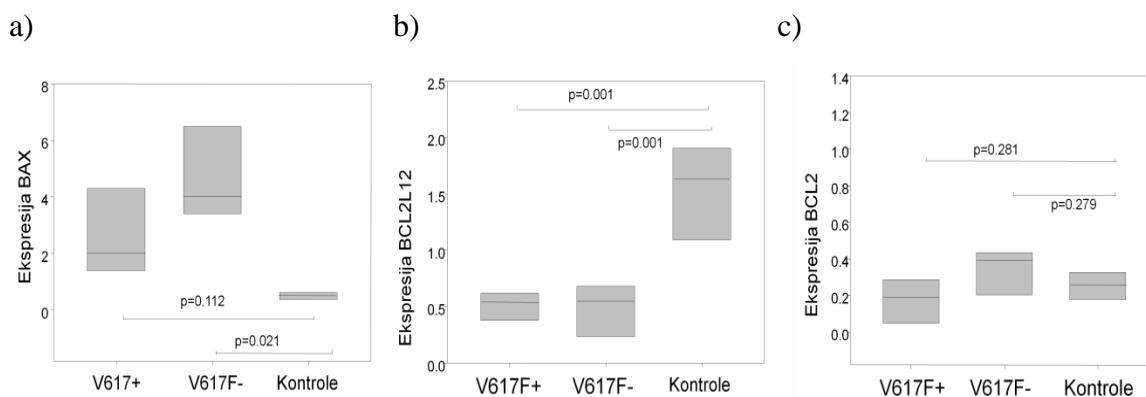
Esencijalna trombocitemija

U ovoj grupi analizirano je 15 pacijenata, od kojih je njih 7 bilo sa *V617F* mutacijom, a 8 bez mutacije. Kada se analizira zavisnost nivoa ekspresije apoptotskih markera od mutacionog statusa pacijenata sa ET, primećeno je da za *BAX* gen postoji negativna korelacija ovih parametara. Naime, kod pacijenata sa *V617F* mutacijom nivo ekspresije ovog gena je isti kao u kontrolnoj grupi ($p=0,112$), dok je kod pacijenata bez *V617F* mutacije nivo iRNK pro-apoptotskog *BAX* gena smanjena u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,021$). Rezultati pokazuju da je ukupno u ovoj grupi smanjen nivo ekspresije *BAX* gena u odnosu na normalne kontrole ($p=0,023$; medijana = 2,71 i 4,61) (Slika 30a).

Nivo iRNK za *BCL2L12* gen smanjen je kod pacijenata sa ET u odnosu na kontrole (medijana 0,53 i 1,52; $p<0,001$), dok je uočeno da prisustvo mutacije nema efekat na nivo ekspresije *BCL2L12* gena ($p=0,001$ kako kod pacijenata sa mutacijom tako i kod onih bez *V617F* mutacije) (Slika 30b).

Kod pacijenata sa ET nivo iRNK za *BCL2* gen isti je kao kod kontrolne grupe

($p=1,000$), a pokazano je i da nema razlike u nivou *BCL2* iRNK kod pacijenata sa V617F mutacijom i onih bez mutacije u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,281$; $p=0,279$) (Slika 30c).



Slika 30. Ekspresija gena unutrašnjeg apoptotskog puta kod pacijenata sa ET. Za svaki gen je prikazana ekspresija odgovarajućeg gena kod *JAK2-V617F+*, *JAK2-V617F-* pacijenata i kontrolne grupe. Odgovarajuće p vrednosti date su u okviru slike.

Sažetak

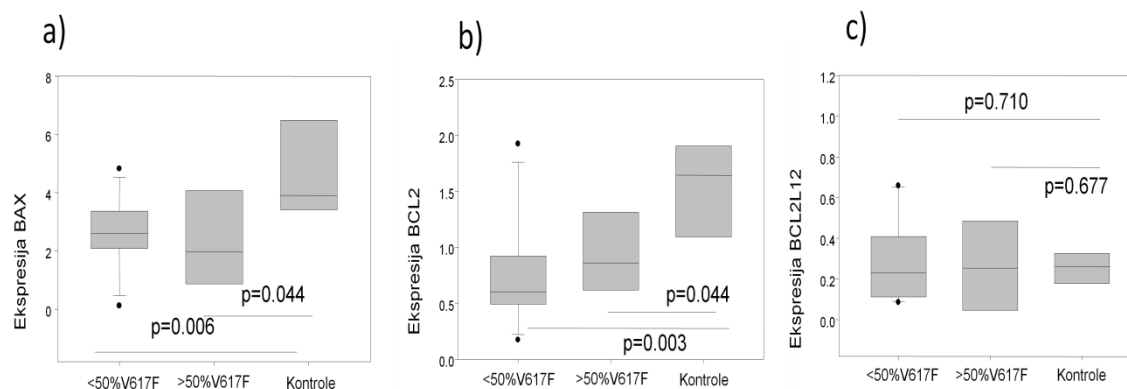
- Kod pacijenata sa ET primećeno je smanjenje ekspresije *BAX* gena, a prisustvo *JAK2-V617F* mutacije koreliše sa povećanjem njegove ekspresije. Takođe je smanjena ekspresija *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu.

Policitemija vera

Ukupno je analizirano 18 pacijenata sa PV, od kojih je kod 16 detektovana *JAK2-V617F* mutacija. Primećeno je da je kod ovih pacijenata ekspresija *BAX* gena smanjena u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,004$; medijana 2,51 i 4,61). Analiza zastupljenosti *JAK2-V617F* alela kod ovih pacijenata pokazala je da nema korelacije između količine mutiranog V617F alela i nivoa ekspresije ovog markera apoptoze, odnosno pacijenti sa niskim procentom mutiranog *JAK2* alela (<50%) imaju smanjenu apoptozu kao i oni sa visokim procentom (>50%) u odnosu na normalne kontrole ($p=0,006$ i $p=0,044$) (Slika 31a).

Slično tome, za *BCL2L12* gen je pokazano da je ekspresija ovog gena smanjena kod pacijenata sa PV u odnosu na kontrole ($p < 0,001$; medijana 0,78 i 1,52), a pokazano je da nivo ekspresije ovog pro-apoptotskog markera ne pokazuje korelaciju sa procentom prisutnog mutiranog V617F alela, odnosno pacijenti sa niskim procentom V617F alela imaju smanjenu ekspresiju kao i oni sa visokim procentom ($p = 0,003$; $p = 0,044$) (Slika 31b).

Za *BCL2* gen kod pacijenata sa PV je pokazano da nema razlike u ekspresiji ovog anti-apoptotskog člana BCL2 familije gena kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,677$), kao i da ne postoji razlika u njegovoj ekspresiji u odnosu na nivo mutiranog alela ($p = 0,710$ kod onih sa $< 50\%$ V617F alela, i $p = 0,833$ kod onih sa $> 50\%$ mutiranog V617F alela) (Slika 31c).



Slika 31. Zavisnost ekspresije gena unutrašnjeg apoptotskog puta kod pacijenata sa PV od količine mutiranog V617F alela. Za svaki gen je prikazana ekspresija odgovarajućeg gena kada je količina alela kod pacijenata $< 50\%$ V617F i $> 50\%$ V617F, kao i kontrolna grupa. Odgovarajuće p vrednosti date su u okviru slike.

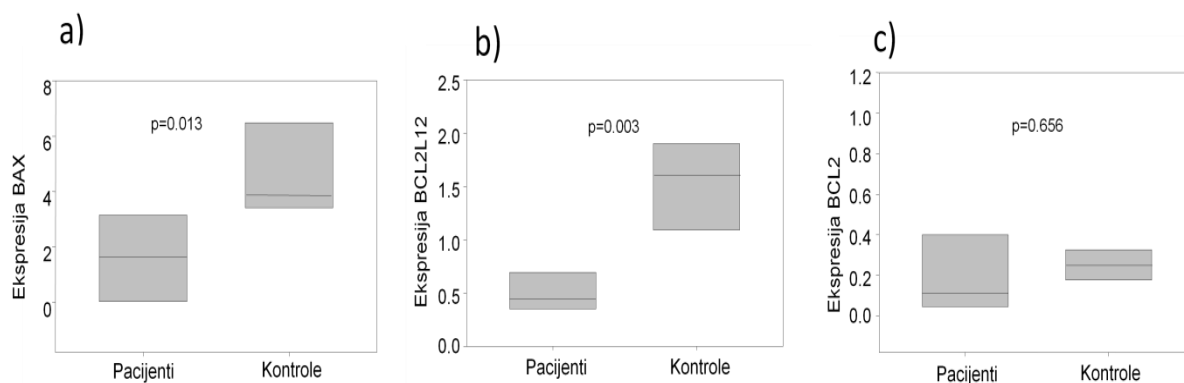
Sažetak

- Kod pacijenata sa PV primećeno je smanjenje ekspresije *BAX* i *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu. Prisustvo različitog procenta *JAK2*-V617F alela kod ovih pacijenata ne utiče na nivo ekspresije ispitivanih apoptotskih gena.

Mijelofibroza

Ukupno su analizirana 4 pacijenta sa MF, od kojih je 3 bilo sa V617F

mutacijom. Iako je broj analiziranih pacijenata mali, isti trend postoji i kod ove bolesti u odnosu na analizirane markere apoptoze: snižen nivo *BAX* i *BCL2L12* gena u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,013$; $p=0,003$) (Slika 32 a i b), i isti nivo ekspresije *BCL2* gena kod pacijenata i zdravih kontrola ($p=0,656$) (Slika 32c).



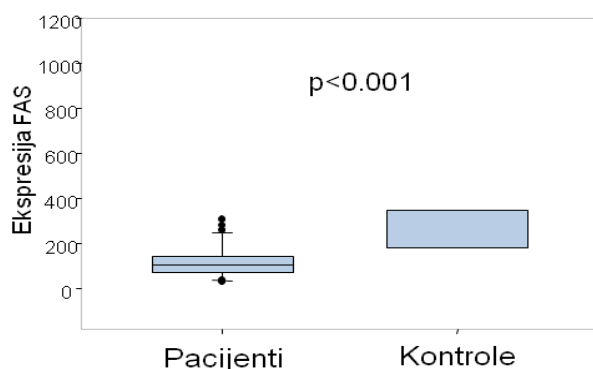
Slika 32. Ekspresija markera unutrašnjeg apoptotskog puta kod pacijenata sa MF. Prikazana je smanjena ekspresija *BAX* i *BCL2L12* gena kod pacijenata sa MF u odnosu na kontrolnu grupu, kao i nepromenjena ekspresija *BCL2* gena.

Sažetak

- I kod MF pacijenata, kao i kod ostalih grupa pacijenata sa MPN, primećeno je smanjenje ekspresije *BAX* i *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu.

ISPITIVANJE EKSPRESIJE MARKERA SPOLJAŠNJEG APOPTOTSKOG PUTA KOD PACIJENATA SA MPN

Spoljašnji apoptotski put proučavan je analizom ekspresije *FASR* u granulocitima kod ukupno 31 pacijenta sa MPN (13 ET, 15 PV, 3 MF) i 7 zdravih kontrola. Prosečna starost pacijenata bila je 47 godina (raspon 16-74), od toga je bilo 16 muškaraca i 15 žena. Medijana starosti kontrola bila je 47 godina (raspon 31-84), od toga je bilo 5 žena i 2 muškarca. Kao što se vidi sa Slike 33, statistički visoko značajna razlika u ekspresiji *FASR* prisutna je kod pacijenata sa MPN u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,001$, medijana 105,682 i 268,063).

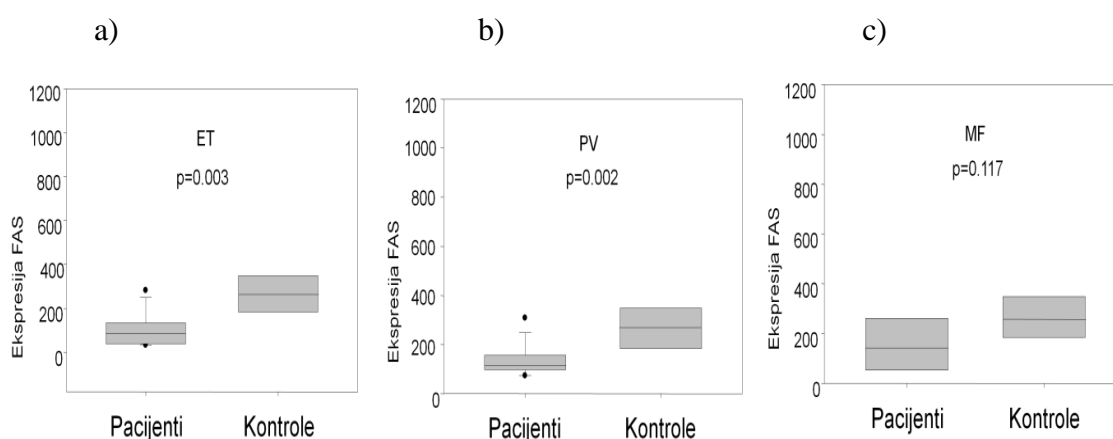


Slika 33. Ekspresija *FASR* gena kod pacijenata sa MPN. Ekspresija *FASR* gena smanjena je kod pacijenata u odnosu na kontrole.

Kada se analizira ekspresija gena za *FASR* kod različitih bolesti zapaža se da je kod pacijenata sa ET prisutan snižen nivo ekspresije *FASR* u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,003$; medijana 85,899 i 268,063) (Slika 34a). Prisustvo V617F mutacije ne menja značajno razliku u ekspresiji gena za *FASR* između pacijenata i kontrola (pacijenti sa mutacijom: $p=0,048$, pacijenti bez mutacije $p=0,002$).

Kod pacijenata sa PV konstatovan je snižen nivo iRNK za *FASR* u odnosu na kontrole ($p=0,002$, medijana 113,345, 268,063) (Slika 34b), a analiza količine prisutnog V617F alela je pokazala da nema značajne razlike u ekspresiji *FASR* kod pacijenata sa <50% mutiranog alela ($p=0,013$) i onih sa >50% mutiranog alela ($p=0,006$).

Grupa pacijenata sa MF je mala za statističku obradu (3 pacijenta), što je možda razlog što nije uočena razlika u ekspresiji *FASR* u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,117$) (Slika 34c). Ovu grupu pacijenata treba proširiti i dodatno ispitati.



Slika 34. Ekspresija *FASR* gena kod pacijenata sa ET, PV i MF.

Sažetak

- Posmatrajući celokupan uzorak pacijenata sa MPN, primećeno je da je ekspresija gena za *FASR* smanjena kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Prisustvo *JAK2-V617F* mutacije ne utiče na nivo ekspresije ovog apoptotskog gena.

DISKUSIJA

MIJELOPROLIFERATIVNE NEOPLAZIJE – OPŠTE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANE GRUPE BOLESNIKA

Mijeloproliferativne neoplazije (MPN) su hronični hematološki maligniteti koji se odlikuju autonomnom proliferacijom opredeljenih progenitora hematopoeze i aberantnom aktivacijom tirozin kinaznih signalnih puteva u kombinaciji sa snažnim odgovorom na citokine i faktore rasta. Tri bolesti predstavljaju MPN u užem smislu: policitemija vera (PV), esencijalna trombocitemija (ET) i mijelofibroza (MF). One pokazuju značajnu fenotipsku mimikriju, gde može doći do fenotipske promene od ET u PV, kao i do evolucije u mijelofibrozu (post -PV/ post -ET mijelofibroza).

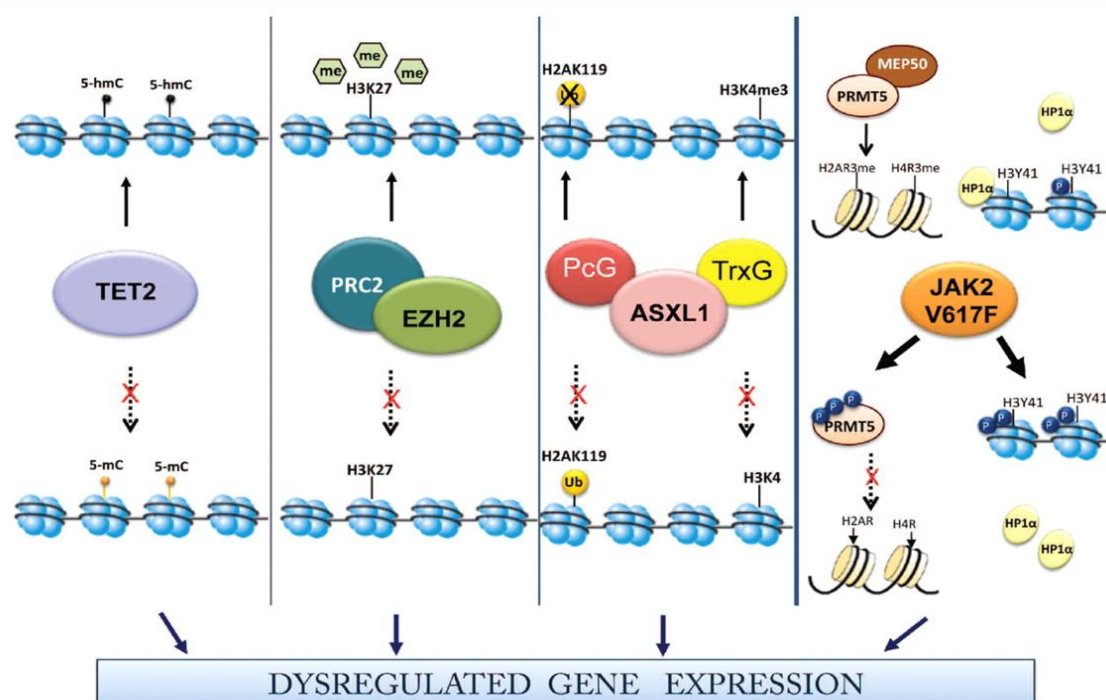
Naša grupa ispitanika sastojala se od 199 pacijenata sa MPN i pokazala je neke značajne karakteristike: medijana starosti pacijenata bila je 49 godina, mada se MPN smatraju bolestima starijeg životnog doba (preko 60 godina). Ono što ovu grupu bolesnika čini specifičnom je starost pacijenata (opseg 12-81), a posebno činjenica da je u našoj grupi bolesnika čak njih 50 bilo mlađe od 40 godina. Ovakva distribucija je vrlo neuobičajena i važna kao populacioni marker.

Važno obeležje ovih bolesti ja prisustvo „missense“ *JAK2-V617F* mutacije u sve tri bolesti, s tom razlikom što je procenat zastupljenosti mutacije po bolestima različit. Procenat detektovane mutacije zavisi od dužine trajanja bolesti pre dijagnoze, čistoće izolovanih granulocita i osetljivosti metode koja se koristi za detekciju. Po literaturi, procenat zastupljenosti mutacije kod ET je 39-75%, kod PV 75-97%, a kod MF od 30-55% [32-35, 39, 40]. Kod naših pacijenata sa postavljenom ili suspektom dijagnozom MPN, *JAK2-V617F* mutacija je detektovana kod 53% ET, 78% PV i 38% MF pacijenata.

U nedavno objavljenoj studiji detaljno je analiziran uticaj pola kao modifikujućeg faktora koji utiče na zastupljenost mutacije po polovima, kao i na količinu mutiranog alela kod muškaraca i žena [158]. Slično kao i u ovom radu, u našoj grupi pacijenata sa ET preovlađuju žene (63%), dok kod PV i MF dominiraju muškarci (64% i 67%). Procenat pacijenata sa mutacijom u našoj grupi bolesnika ne varira u odnosu na pol, izuzev kod MF pacijenata, što smatramo posledicom malog broja pacijenata u toj grupi (21; 14 muškaraca i 7 žena).

TRANSFORMACIJA MPN U AKUTNU MIJELOIDNU LEUKEMIJU

Velika pažnja poslednjih godina usmerena je na izučavanje mehanizama koji vode ka nastanku tzv. sekundarne akutne mijeloidne leukemije (sAML), koja predstavlja evoluciju drugih hematoloških maligniteta u AML [159-161]. Smatra se da će se izučavanjem mehanizama koji prevode druge hematološke malignitete u akutnu fazu, pronaći odgovor o mutacionim događajima koji su uzrok početne promene koja dovodi do maligne transformacije hematopoetskog progenitora. Sve tri MPN bolesti se mogu transformisati u AML, koja obično ima lošu prognozu, a do ove kasne transformacije (nakon 10-20 godina od početka bolesti) dolazi kod 4-8% ET i PV i 8-23% MF pacijenata [17]. Ranije je pokazano da kod pacijenata koji su imali *JAK2-V617F* mutaciju u svojim granulocitima u toku hronične faze bolesti, u toku tzv. blastne (leukemične) faze u klonu koji dominira nemaju ovu mutaciju [22, 162]. Studije koje koriste metodologiju SNP array i GWAS otkrile su lokuse i potencijalne gene uključene u ovaj proces. Česte mutacije su identifikovane u *TET2* (26,3%), *ASKSL1* (19,3%), *IDH1* (9,5%), i *JAK2* (36,8%) u sAML, a primećene su sve moguće kombinacije ovih mutacija [17]. Međutim, za razliku od *JAK2-V617F*, koja se retko identifikuje van klasičnih mijeloproliferativnih neoplazija, mutacije u ovim genima, među kojima su i geni uključeni u epigenetsku regulaciju transkripcije, prisutne su u širokom spektru mijeloidnih maligniteta, uključujući bolesnike sa primarnim mijelodisplastičnim sindromom i akutnim mijeloidnim leukemijama, sugerišući da ove mutacije mogu biti zajednički genomski događaj u mijeloidnim malignitetima [163] (Slika 29). Nedavno otkriće engleske grupe naučnika [164] da *JAK2* protein ima nuklearnu lokalizaciju i da učestvuje u fosforilaciji histona H3, izazvalo je otvaranje nove dimenzije uticaja *JAK2* gena. Ova novootkrivena uloga otvara mogućnost da i sam *JAK2* protein, kao i drugi faktori uključeni u epigenetsku regulaciju, menja mikrosredinu u kostnoj srži, tako da se stvara okolina pogodna za nastanak mutacija u određenim hipermutabilnim regionima DNK.



Slika 35. Poznate funkcije EZH2, TET2, ASXL1 i JAK2 u epigenetskoj regulaciji genske ekspresije. U gornjem delu slike predstavljena je funkcija normalnog proteina, a u donjem delu slike funkcija mutiranog proteina. Jedino *wt* JAK2 protein nema ulogu u epigenetskoj regulaciji, već samo JAK2-V617F protein. Preuzeto iz Vannucchi *et al.* *Haematologica* (2011) [163].

Još jedan važan marker akutnih mijeloidnih leukemija je *FLT3*-ITD mutacija, koja se javlja kod oko 30% *de novo* AML pacijenata sa normalnim kariotipom i predstavlja loš prognostički marker kod ovih bolesnika [82]. Poznato je da *FLT3*-ITD dovodi do proliferacije ranih hematopoetskih progenitorskih ćelija, a prekliničke studije su pokazale da *FLT3*-ITD mutacija kod mišjeg modela izaziva promene koje daju sliku esencijalne trombocitemije [84]. Takođe, pokazano je da je *FLT3*-ITD prisutan kod 15% sAML nastale od mijelodisplazije [161]. U literaturi je opisano udruženo prisustvo *JAK2*-V617F i *FLT3*-ITD mutacije kod pacijenata sa AML, mada se klinički značaj ovog događaja još uvek ne zna [42]. Nije isključena mogućnost da bi udruženost ove dve aktivirajuće mutacije sa snažnim uticajem na proliferaciju, moglo da objasni evoluciju MPN u AML. Obzirom na prethodne studije koje su ispitivale prisustvo ove mutacije kod *JAK2*-V617F negativnih pacijenata [86], mi smo odlučili da ispitamo

prisustvo ove mutacije i kod *JAK2-V617F* pozitivnih pacijenata. Ni kod jednog od ispitivanih pacijenata nije utvrđeno prisustvo *FLT3-ITD* mutacije. Svi naši pacijenti analizirani su u ranoj fazi bolesti, neposredno nakon postavljanja dijagnoze na osnovu drugih kriterijuma. Za početnu transformaciju maligne ćelije očigledno je dovoljna jedna mutacija koja pogađa proces proliferacije. Dugoročno praćenje ovih bolesnika na markere proliferacije, među kojima *FLT3-ITD* može da ima značaj, mogli bi da rasvetle patogenezu ovih oboljenja i njihovu evoluciju u AML.

JAK2 “ALLELE BURDEN”

Analiza zastupljenosti mutiranog *JAK2-V617F* alela kod pacijenata sa MPN ima značaja ne samo u dijagnostici i kliničkom tretmanu ovih pacijenata, već je i važan parametar u praćenju odgovora na terapiju. Povećani nivo *V617F* alela povezan je sa povećanom ekspresijom nizvodnih ciljnih gena [40, 45, 58], aktivacijom granulocita [165], kao i nekim kliničkim parametrima (broj leukocita, nivo hemoglobina, veličina jetre i dr.) [56-58].

Više različitih metoda kojima se određuje procenat mutiranog alela u ukupnoj količini alela postoji u literaturi, koji se odlikuju različitim pristupima (alelska diskriminacija vs. alel specifični qPCR), različitim nivoom osetljivosti, kao i po upotrebi različitih standarda (upotreba plazmida sa kopijama *wt* i *V617F* alela vs. razblaženja mutirane u *wt* DNK poreklom iz ćelijskih linija) za apsolutnu kvantifikaciju. Naš pristup podrazumevao je korišćenje strategije alel specifičnog qPCRa preuzeta iz rada Lippert *et al.* 2006, gde su korišćeni specifični nizvodni prajmeri (*JAK2-wt* i *JAK2-V617F*), zajednički uzvodni prajmer i fluorescentno obeležena proba [40]. Za konstrukciju standardne krive korišćena je serija razblaženja mutirane DNK poreklom iz HEL ćelijske linije homozigotne za *JAK2-V617F* mutaciju i K562 ćelijske linije, koja je *wt* za *JAK2* gen. Konstruisane su standardne krive za *wt* i *V617F* alel i iz njih određen procenat mutiranog i *wt* alela za svaki od analiziranih uzoraka.

Naša analiza pokazuje specifičnu distribuciju mutiranog alela kod različitih MPN entiteta, koja odgovara literaturnim podacima [166, 167]. Kod ET je prisutan relativno nizak nivo mutiranog alela (medijana 27%; opseg (15–42%), što je

karakteristika ET, jer kod nje, za razliku od PV i MF, postoji poliklonalna hematopoeza [9]. Naime, istraživanja klonalnosti hematopoeze kod ovih pacijenata su pokazala da *wt* klon nije suprimiran postojanjem mutiranog klona, kao što je slučaj kod PV. Kod PV nivo eritropetina igra glavnu ulogu, i regulisan je brojem eritrocita: kada se poveća broj eritrocita, to postaje okidač sensorima za kiseonik da se smanji nivo eritropoetina. Tada ćelije nosioci mutacije, koje mogu da se dele i u odsustvu eritropoetina, stiču proliferativnu prednost i dolazi do ekspanzije mutiranog klona. Kod ET, gde nivo trombopetina određuje broj cirkulišućih trombocita, pokazano je da nivo ovog faktora rasta ostaje konstantan tokom bolesti, tako da *wt* ćelije proliferišu uporedo sa mutiranim klonom [168]. Stoga procenat ćelija koje nose *JAK2* mutaciju nikada nije visok kao kod PV, a takođe je retka pojava mitotičke rekombinacije kod pacijenata sa ET [53], te je broj homozigota mali ili ih nema, kao kod naše grupe.

Kod pacijenata sa PV je prisutno značajno više mutiranog alela (medijana 44%), a opseg detektovanog mutiranog alela bio je od 1 do 98%. Ovakva distribucija je karakteristična za PV, obzirom da je kod PV prisutna mitotička rekombinacija i veliki broj pacijenata ima mutaciju u homozigotnom stanju (31% kod naših pacijenata sa PV).

Kod MF *JAK2-V617F* mutirani alel je prisutan u visokom procentu: medijana 81%; opseg 21–92%), a procenat homozigotnih nosilaca mutacije je veoma visok, (75%), što je u saglasnosti sa literaturom [158, 167]. Kod post- PV mijelofibroze klon koji nosi mutaciju u homozigotnom stanju kao da je u još većoj ekspanziji, tako da su kod ovih pacijenata prisutni najviši procenti zastupljenosti mutiranog alela.

46/1 HAPLOTIP

Još jedan suštinski pomerač u rasvetljavanju patogeneze mijeloproliferativnih neoplazija napravljen je kada su tri nezavisne grupe naučnika 2009 god. objavile otkrića vezana za haplotip koji predisponira nastanak *JAK2-V617F* mutacije [63-65]. Postojanje jedne mutacije u tri različita oboljenja, dokazi da *JAK2-V617F* mutacija nije primarni događaj u ovim bolestima, kao i familijarni slučajevi u kojima se ne nasledjuje *JAK2-V617F* mutacija, potencirali su ubeđenje da još neki genetički i epigenetički faktori utiču na patogenezu ovih bolesti. Zahvaljujući GWAS tehnologiji locirani su SNP koji

predstavljaju haplotip koji asocira sa mijeloproliferativnim neoplazijama. Ovaj specifični *JAK2* haplotip se usled prisustva GG i CC nukleotida na određenim pozicijama naziva GGCC haplotip, ili 46/1. Osam SNP-ova bliže definiše ovaj haplotip i locirani su u intronima *JAK2* gena. Nekoliko važnih paradigmi vezano je za *JAK2* haplotip: *JAK2*-V617F mutacija događa se u 80% slučajeva na ovom haplotipu [63]; mutacija se dešava *in cis* sa dva asocirana SNP [63]; više nezavisnih mutacionih događaja dešavaju se u različitim progenitorima pacijenata sa MPN [63]; ovaj haplotip predisponira nastanak *JAK2* egzon 12 [169], ali ne i *MPL* mutacija [67]; haplotip ne predisponira familijarne MPN slučajeve [16].

Dve hipoteze pokušale su da objasne mehanizam dejstva 46/1 haplotipa: hipoteza „plodnog tla“ govori o tome da se *JAK2* mutacija dešava na svakom haplotipu, ali ako se desi na 46/1 haplotipu, ona dovodi do razvoja MPN; hipoteza „hipermutabilnosti“ pretpostavlja da ovaj haplotip stvara osetljivost na DNK-repair defekte ili replikacione netačnosti i kao rezultat genetičke nestabilnosti dovodi do nastanka *JAK2* mutacija.

Mi smo ispitali korelaciju haplotipa sa *JAK2*-V617F mutacijom kod naše grupe pacijenata sa MPN i dobili signifikantno veću učestalost genotipa CC u okviru rs12343867 ($p=0.04$) kod pacijenata u odnosu na kontrole, kao i učestalost C alela kod pacijenata ($p<0.05$). Takođe smo ispitali uticaj haplotipa na kliničke parametre (nivo hemoglobina i hematokrit) i ustanovili da haplotip ne utiče na ove parametre. Ovi rezultati se u potpunosti uklapaju u literaturne.

Ovi rezultati pokazuju da se populacija naših pacijenata, kao i kontrola, nalaze u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži. Međutim, učestalost C alela je značajno povećana kod pacijenata, jasno ukazujući da alel C koreliše sa prisustvom bolesti. On zapravo koreliše sa prisustvom *JAK2*-V617F mutacije, jer je frekvencija alela kod *JAK2*-V617F negativnih pacijenata ista kao kod zdravih kontrola. Povećana učestalost C alela kod pacijenata PV u odnosu na pacijente sa ET očigledno rezultuje povećanom frekvencom *JAK2*-V617F mutacije kod PV.

POLIMORFIZMI U GENU ZA JANUS KINAZU 2 KAO REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE

Transkripciona regulacija humanog *JAK2* gena nije detaljno izučena. Okarakterisani su promotorski regioni familije Janus kinaza kod riba [170], gde je pokazano da su kod svih članova ove familije gena prisutni „TATA-less“ promotori i da odsustvuje tipična oragnizacija promotorskog regiona. Jedna od novijih studija bavila se promotorom humanog *JAK3* gena [171]. Postojanje transkripcionih regulatornih elemenata u intronskim sekvencama opisano je literaturi za različite gene [172-174], a mogućnost da je i u slučaju *JAK2* gena transkripcija fino regulisana intronskim regulatornim elementima, postala je predmet izučavanja sa otkrićem 46/1 haplotipa. U našoj studiji smo u pokušaju da pronađemo nove intronske regulatorne elemente analizirali polimorfizam rs12343867, koji pripada 46/1 haplotipu gena za *JAK2*. *In silico* predikcijom, kojom je analiziran rs12343867 polimorfizam u intronu 14 *JAK2* gena, pokazano je vezivanje većeg broja različitih transkripcionih faktora za ovaj DNK region. Takođe, predikcija je pokazala razliku u vrsti transkripcionih faktora u slučaju kada je nukleotid T ili nukleotid C prisutan na ovoj poziciji.

Smanjenje CAT aktivnosti za ispitivane konstrukte pBLCAT_T i pBLCAT_C u odnosu na bazalnu CAT aktivnost reporterskog sistema, ukazalo je na represorski potencijal ovog regiona. Pokazana razlika u ekspresiji između konstrukata koji sadrže nukleotid T ili C ukazuje na njihovu potencijalnu različitu ulogu u regulaciji transkripcije. EMSA analiza fragmenta dužine 30bp koji sadrži rs12343867 polimorfno mesto, potvrdila je da bi ova DNK sekvenca mogla biti novi regulatorni *cis*- element lociran u četrnaestom intronu gena za *JAK2*. Supershift analiza je pokazala učešće transkripcionog aktivatora MEIS1/2 jedino u kompleksu sa probom koja sadrži nukleotid C, što zajedno sa rezultatima CAT esejaja ukazuje na različit transkripcioni modulacioni potencijal ovog *cis*-regulatornog elementa u transkripciji humanog *JAK2* gena.

MEIS1, MEIS2 and TGIF su članovi TALE (three amino acid loop extension family) homeodomen-posedujućih transkripcionih faktora koji se eksprimiraju, između ostalog, i u hematopoeznom tkivu, u mijeloidnim ćelijama [175]. MEIS1 je

transkripcioni aktivator i potreban je za odigravanje normalne hematopoeze. Takođe je prisutan u patološkim stanjima, kao što je leukemija [176]. Njegova povećana transkripcija praćena je udruživanjem sa multiplim HOX i NUP98-HOX fuzionim proteinima, što vodi ubrzanju početka AML [176]. TGIF je transkripcioni represor kod sisara i učestvuje u regulaciji transkripcije mnogih gena (TGF β , SMAD i dr.) u embrionalnoj i adultnoj ćeliji [177].

Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da analizirani deo četrnaestog introna gena za *JAK2* predstavlja transkripcioni regulatorni *cis*-element koji vezuje MEIS1/2 transkripcioni faktor i funkcioniše kao represor. Takođe, ovaj rad doprinosi razumevanju do sada nepoznatih fenomena koji mogu biti uključeni u nastanak kompleksnog fenotipa MPN.

EKSPRESIJA *JAK2* GENA KOD PACIJENATA SA MPN

Literaturni podaci pokazuju da je ekspresija *JAK2* gena povećana kod pacijenata sa MPN u odnosu na zdrave kontrole. Tačan doprinos ove pojave na patogenezu MPN nije utvrđen, ali predstavlja konstantan izazov i predmet je savremenih istraživanja. Stoga je poseban značaj u našoj studiji imalo praćenje ekspresije *JAK2* gena u korelaciji sa haplotipom, jer bi njegovo modulišuće dejstvo na transkripcionom nivou moglo da ide u prilog hipotezi „fertilnog tla“. Tada bi se moglo očekivati da ukoliko se na definisanom haplotipu koji podiže nivo transkripcije *JAK2* gena desi onkogeno *JAK2*-V617F mutacija, udruženim delovanjem ove dve promene mutirani klon bi imao dvojak efekat na nizvodne signalne puteve, što bi mu dalo selektivnu prednost. Naši rezultati su pokazali da haplotip ne deluje tako što menja ekspresiju *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN. Posmatrali smo i pacijente sa mutacijom i one bez nje, i korelisali ekspresiju u odnosu na haplotip. Uočili smo izuzetnu heterogenost u ekspresiji *JAK2* gena kod pacijenata, dok je kod zdravih kontrola ekspresija bila vrlo ujednačena. Nije pronađena značajna razlika u ekspresiji *JAK2* gena ni kod jedne od analiziranih grupa u odnosu na 46/1 haplotip. Na osnovu ovog rezultata zaključili smo da je represorska funkcija regulatornog elementa u intronu 14 gena za *JAK2*, koji smo pronašli i okarakterisali na *in vitro* nivou, u *in vivo* uslovima deo složene mašinerije koja utiče na finu regulaciju

ekspresije *JAK2* gena, tako da je njegova represorska uloga modifikovana uticajem drugih transkripcionih faktora.

Uticaj polimorfizama na ekspresiju *JAK2* gena bio je predmet istraživanja i drugih studija: ispitani su uticaji *JAK2* rs2230724, rs10429491 [65] i rs10974944 [64], i pokazano je da nemaju uticaj na ekspresiju *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN. Nedavno je pronađen polimorfizam u promotorskom regionu *JAK2* gena koji asocira sa MPN. Za ovaj polimorfizam autori su utvrdili da ima efekat na transkripciju u *in vitro* uslovima, a ostaje da se utvrdi njegovo dejstvo *in vivo*. Ovaj bi rezultat dao odgovor na mogući mehanizam dejstva 46/1 haplotipa u sticanju proliferativne prednosti maligne ćelije.

POREMEĆAJ EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH U PROCES APOPTOZE

Proces apoptoze je deregulisan u većem broju hematoloških maligniteta, što dovodi do rezistencije malignih ćelija na signale smrti i obezbeđuje im duži život u odnosu na normalne ćelije. Takođe, poremećena apoptoza dovodi do otpornosti na terapije i pospešuje napredovanje bolesti. Promene u apoptozi su opisane kod hronične mijeloidne leukemije (HML), hronične limfocitne leukemije (HLL), mijelodisplastičnom sindromu (MDS), AML i dr. Kod mijeloproliferativnih neoplazije proučavanje apoptotskih promena maligno izmenjenih ćelija nije zauzelo tako veliki značaj, i nema mnogo literaturnih podataka na ovu temu. Ipak, u poslednje dve godine broj publikacija vezanih za apoptozu naročito se uvećava kao posledica izučavanja efekata terapeutika koji se koriste u lečenju MPN, jer se pokazalo da ćelije kao odgovor na terapiju zauzimaju odbrambenu poziciju i stvaraju rezistenciju upravo pospešivanjem apoptoze. U tom kontekstu i naši rezultati mogu biti zanimljivi u rasvetljavanju potencijalnih puteva kojima ove maligne ćelije zaobilaze normalan put ćelijske smrti.

U našem istraživanju koristili smo granulocite kao populaciju ćelija gde se upravo odvija maligni proces kod pacijenata sa MPN. U istraživanjima Tognon *et al.* iz 2011. i 2012., koji su takođe pratili ekspresiju apoptotskih markera kod pacijenata sa MPN, korišćeni su limfociti i matične ćelije [109, 131]. Još od ranije je poznato da se ekspresija apoptotskih gena menja tokom sazrevanja normalnih hematopoetskih ćelija, te je stanje u terminalno diferenciranim ćelijama različito u odnosu na matičnu ćeliju

hematopoeze, kao i u odnosu na druge ćelijske populacije koje nisu zahvaćene mutacionim događajem. Proučavanje matične ćelije i limfocita kod pacijenata sa MPN moglo bi da da sliku stanja mikrosredine u samom hematopoeznom tkivu, koja vrši uticaj na sve ćelije i procese u njima. Sve više indicija ima da upravo ta mikrosredina, koju čine genetski i epigenetski faktori, predstavlja nišu koja diriguje nastanak hematoloških maligniteta. Kod HLL, na primer, nedvosmislen značaj mikrosredine pokazan je eksperimentima u kojima su B limfociti spontano ulazili u proces apoptoze prilikom *ex vivo* kultivacije [178], što ukazuje na značaj humoralnih faktora i ćelijskih interakcija na njihov opstanak *in vivo*. U proliferacionim centrima kod HLL pacijenata ćelije interaguju sa T limfocitima i različitim ćelijama strome, i te interakcije stimulišu proliferaciju, a inhibiraju apoptozu čime se favorizuje opstanak leukemičnih ćelija. Slično se može očekivati i kod pacijenata sa MPN, a posebno je u tome interesantna mijelofibroza. Kod ovog oboljenja efekat mikrosredine se odražava ne samo na ćelije hematopoeze, već i na ćelije strome kosti, te dolazi do zamene hematopoetskog tkiva fibroznim. Fibroblasti iz kostne srži su poliklonalni i pokazuju normalne osobine [20], što govori o tome da oni nisu zahvaćeni malignim procesom, već je stimulacija njihove deobe rezultat delovanja faktora iz okoline. Pokazano je da su ćelijski i međućelijski nivoi velikog broja citokina izmenjeni kod ovih pacijenata i da presudnu ulogu u njihovom lučenju imaju megakariociti [179-181]. Zato se i u terapiji ovih teških pacijenata koriste supresori citokina, i daju dobre rezultate na opštem nivou, mada ne deluju na uzrok bolesti [182]. Rezultati najnovijih istraživanja, u kojima je praćen efekat transplantacije kostne srži na ćelije strome, pokazali su da nakon kratkog perioda kod pacijenata dolazi do regresije fibroze u kostnoj srži [183], što govori o tome koliki efekat maligni klon ima na mikrosredinu u kojoj se nalazi.

Naši rezultati su pokazali da su u granulocitima pacijenata deregulisani kako spoljašnji, tako i unutrašnji apoptotski put. U ovom radu je analizirana uloga unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze u MPN preko praćenja ekspresije *BCL2* i *BAX* gena, kao tipičnih predstavnika *BCL2* familije apoptotskih regulatora. Analizirana je i ekspresija *BCL2L12* gena, novog člana *BCL2* familije, čija pro- ili anti- apoptotska uloga još nije definisana.

Mitohondrijalni put je deregulisan smanjenom ekspresijom *BAX* gena, koji ima pro-apoptotsku ulogu, kao i *BCL2L12* gena, kod svih pacijenata, što potencijalno ima

efekat na smanjenje apoptotskog procesa. Poznato je da članovi BCL2 familije proteina stvaraju heterodimere, pri čemu se menja njihova apoptotska aktivnost. U nekim drugim hematološkim malignitetima, kao što su HLL a AML, opisano je da odnos BAX/BCL2 proteina može da ima ulogu u regulaciji apoptotskog odgovora ćelije. U našoj studiji nismo našli korealciju u nivou ekspresije *BAX/BCL2* gena kod pacijenata u odnosu na kontrole, mada ostale interakcije naravno nisu isključene.

Analizirali smo efekat *JAK2-V617F* mutacije na ekspresiju apoptotskih markera i utvrdili da kod esencijalne trombocitemije prisustvo mutacije dovodi do povećanja ekspresije *BAX* gena. Pratili smo povezanost apoptotskih markera sa količinom mutiranog *V617F* alela kod PV, i rezultati ukazuju da nivo mutiranog alela nema uticaja na ekspresiju markera apoptoze.

SMANJENA EKSPRESIJA FASR KAO ZAŠTITA MALIGNNE ĆELIJE OD ĆELIJSKE SMRTI

FAS receptor (CD 95/APO-1) (FASR) je tip I transmembranski protein koji pripada TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor) familiji receptora i ima ulogu u indukciji procesa apoptoze na ćelijama na kojima se nalazi nakon interakcije sa FAS ligandom. U pitanju je glikoprotein, sastavljen od 325 aminokiselina [184], veličine 45 kD (humani tip) i organizovan je u tri domena: ekstraćelijski, transmembranski i intraćelijski domen. Ekstraćelijski domen je bogat cisteinom i ima ulogu u vezivanju FAS liganda [185]. Intracelularni domen označen kao „domen smrti“ (*Death Domain-DD*), ima ključnu ulogu u transdukciji apoptotskog signala [186]. FAS receptor može postojati i u solubilnoj ekstraćelijskoj formi, koja se dobija alternativnim splajsingom primarnog transkripta (OMIM:134637). U takvom obliku solubilni FAS štiti ćeliju od apoptoze, vezujući FAS ligand u kompeticiji sa FAS membranskim receptorom [187]. Kao membranski receptor, *FASR* je eksprimiran na velikom broju ćelija, pre svega na aktiviranim T i B limfocitima, na ćelijama timusa, jetre, jajnika i srca [188]. Takođe je eksprimiran na površini granulocita, kao i u različitim fazama tokom diferencijacije eritrocita [189]. Do gubitka funkcije FASR može doći zbog mutacija, najčešće

supstitucionih zamena („missens“ tip mutacija) koje na proteinskom nivou dovode do zamene aminokiseline u proteinu, ili manjih delecija [190, 191].

Maligna ćelija suprotstavlja se imunom sistemu eksprimiranjem visokog nivoa *FASL*, čime ubija T ćelije koje eksprimiraju *FASR* [122, 126]. Istovremeno, eksprimiranje niskog nivoa *FASR* dovodi do izbegavanja FAS-dirigovane ćelijske smrti [122].

Spoljašnji apoptotski put analiziran je praćenjem nivoa ekspresije *FASR* gena u granulocitima pacijenata sa MPN. Kod naše grupe MPN pacijenata uočen je smanjen nivo ekspresije gena za *FASR*, što može da utiče na smanjenje apoptoze kod MPN pacijenata. Ispitivanjem prisustva mutacije (kod ET), odnosno količine mutiranog alela (kod PV) nije pronađena korelacija sa nivoom ekspresije ovog apoptotskog markera.

ZAKLJUČCI

DETEKCIJA JAK2-V617F MUTACIJE I ZASTUPLJENOST MUTIRANOG ALELA U GRANULOCITIMA PACIJENATA SA MPN

- Ispitivanjem zastupljenosti *JAK2-V617F* mutacije kod obolelih od MPN je pokazano da je *JAK2-V617F* mutacija bila prisutna kod 53% pacijenata koji boluju od esencijalne trombocitemije, kod 78% pacijenata koji boluju od policitemije vere i 38% pacijenata koji boluju od mijelofibroze
- Analiza zastupljenosti mutiranog alela u granulocitima pacijenata sa MPN pokazala je širok raspon (od 1 do 98%), kao i veliki diverzitet između MPN entiteta
- Pacijenti sa ET su imali najnižu medijanu zastupljenosti mutiranog alela (27%), što je dokaz da je pojava mitotičke rekombinacije kod ovih pacijenata retka i da *wt* klon nije u potpunosti suprimiran mutiranim klonom
- Kod pacijenata sa PV je prisutan širok opseg mutiranog alela (1-98%), a kod 31% ispitanika je pokazano da u granulocitima imaju više od 50% mutiranog alela
- Kod pacijenata sa MF 75% ispitanika imalo je V617F alel u homozigotnom stanju, što rezultuje najvišim detektovanim “*allele burden*”-om (81%)

ANALIZA PRISUSTVA FLT3-ITD MUTACIJE KOD PACIJENATA SA MPN

- Kod naše grupe pacijenata sa MPN pokazano je odsustvo *FLT3-ITD* mutacije
- Naši rezultati pokazuju da u početnom stadijumu bolesti *FLT3-ITD* ne predstavlja mutacioni događaj koji podiže proliferativni kapacitet malignog klona.
- Dugoročno praćenje ovih bolesnika na markere proliferacije, među kojima *FLT3-ITD* može da ima značaj, moglo bi da rasvetli patogenezu ovih oboljenja i njihovu evoluciju u AML

46/1 HAPLOTIP

- Analiza distribucije SNP rs12343867T>C genotipa, koji je deo 46/1 haplotipa, je

pokazala da je učestalost nepovoljnog CC/CT genotipa značajno veća u grupi pacijenata sa MPN nego u kontrolnoj grupi

- Frekvencija CC/CT genotipa kod *JAK2*-V617F negativnih pacijenata je ista kao kod zdravih kontrola
- Ovi rezultati jasno ukazuju da alel C koreliše sa prisustvom bolesti i da predstavlja faktor rizika za nastanak *JAK2*-V617F- pozitivnih MPN

ISPITIVANJE REGULATORNOG ELEMENTA U INTRONU 14 GENA ZA *JAK2*

- Funkcionalna analiza je pokazala da ispitivani deo četrnaestog introna gena za *JAK2* predstavlja transkripcioni *cis*- regulatorni element koji ima represorsku funkciju
- Ovo je prvi put da je za neki intronski region u genu za *JAK2* pokazano da je transkripcioni regulatorni element
- Navedeni rezultati pokazuju da se za ispitivani region, koji sadrži SNP rs12343867, vezuje transkripcioni aktivator MEIS1/2 specifično kada je prisutan nukleotid C

ISPITIVANJE EKSPRESIJE *JAK2* GENA KOD PACIJENATA SA MPN

- Uočena je izuzetna heterogenost u ekspresiji *JAK2* gena kod pacijenata sa MPN
- Pacijenti sa *JAK2*-V617F mutacijom imali su značajno viši nivo *JAK2* iRNK u svojim granulocitima u odnosu na pacijente bez mutacije
- Pokazana je značajna razlika u ekspresiji *JAK2* gena u različitim MPN entitetima

EKSPRESIJA *JAK2* GENA U KORELACIJI SA 46/1 HAPLOTIPOM

- Analizirana ekspresija *JAK2* gena u korelaciji sa prisustvom C/T alela u okviru SNP rs12343867 u intronu 14 *JAK2* gena je pokazala da su pacijenti imali sličan

nivo ekspresije *JAK2* gena bez obzira na strukturu genotipa u okviru analiziranog polimorfnog mesta

- Na osnovu ovog rezultata zaključili smo da je represorska funkcija regulatornog elementa u intronu 14 gena za *JAK2*, koji smo pronašli i okarakterisali u *in vitro* sistemu, u *in vivo* uslovima sastavni deo složene mašinerije koja utiče na finu regulaciju ekspresije *JAK2* gena

ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH MARKERA KOD PACIJENATA SA MPN

- Posmatrajući celokupan uzorak pacijenata sa MPN, primećeno je da je ekspresija pro-apoptotskog *BAX* gena smanjena kod pacijenata u odnosu na kontrole
- Pokazana je smanjena ekspresija *BCL2L12* gena, čija je pro- ili antiapoptotska uloga u apoptozi još nepoznata
- Ekspresija anti-apoptotskog *BCL2* gena nije promenjena kod pacijenata u odnosu na kontrole
- Analizom ekspresije gena za *FASR* pokazano je da je njegova ekspresija smanjena kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu

ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH MARKERA KOD MPN ENTITETA I KORELACIJA SA *JAK2-V617F* MUTACIJOM

- Kod pacijenata sa ET primećeno je smanjenje ekspresije *BAX* gena, a prisustvo *JAK2-V617F* mutacije povećava njegovu ekspresiju. Takođe je smanjena ekspresija *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu
- Kod pacijenata sa PV primećeno je smanjenje ekspresije *BAX* i *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu. Prisustvo različitog procenta *JAK2-V617F* alela kod ovih pacijenata ne utiče na nivo ekspresije ispitivanih apoptotskih gena
- Kod pacijenata sa MF je primećeno smanjenje ekspresije *BAX* i *BCL2L12* gena, dok ekspresija *BCL2* gena nije promenjena u odnosu na kontrolnu grupu

- Analizom ekspresije gena za *FASR* pokazano je da prisustvo *JAK2-V617F* mutacije ne utiče na nivo ekspresije ovog apoptotskog gena
- Ukupno sagledavajući analizu markera apoptoze zaključuje se da je apoptoza deregulisana kod MPN pacijenata i da predstavlja značajan mehanizam akumulacije malignog klona

LITERATURA

1. Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Masse, A., Godin, I., Le Couedic, J.P., Debili, N., Saulnier, P., Casadevall, N., Vainchenker, W., Giraudier, S. (2007) Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* **109**, 71-77.
2. James, C., Mazurier, F., Dupont, S., Chaligne, R., Lamrissi-Garcia, I., Tulliez, M., Lippert, E., Mahon, F., Pasquet, J.M., Etienne, G., Delhommeau, F., Giraudier, S., Vainchenker, W., de Verneuil, H. (2008) The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* **112**, 2429-38.
3. Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-51.
4. Dameshek, W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* **6**, 372-375.
5. Prchal, J.F., Axelrad, A.A. (1974) Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med* **290**, 1382.
6. Reid, C.D. (1987) The significance of endogenous erythroid colonies (EEC) in haematological disorders. *Blood Rev* **1**, 133-140.
7. Casadevall, N., Vainchenker, W., Lacombe, C., Vinci, G., Chapman, J., Breton-Gorius, J., Varet, B. (1982) Erythroid progenitors in polycythemia vera demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures. *Blood* **59**, 447-451.
8. Dai, C.H., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Means, R.T.J., Horn, S.T., Gilbert, H.S. (1992) Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood Rev* **80**, 891-899.
9. Lambert, J.R., Everington, T., Linch, D.C., Gale, R.E. (2009) In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. *Blood* **114**, 3018-23.
10. www.orpha.net.
11. Passamonti, F., Rumi, E., Pungolino, E., Malabarba, L., Bertazzoni, P., Valentini, M., Orlandi, E., Arcaini, L., Brusamolino, E., Pascutto, C., Cazzola, M., Morra, E., Lazzarino, M. (2004) Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* **117**, 755-761.
12. Hoffman, R., Rondelli, D. (2007) Biology and treatment of primary myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 346-354.
13. Bellane'-Chantelot, I.C., Chaumarel, I., Labopin, M., Bellanger, F., Barbu, V., De Toma, C., Delhommeau, F., Casadevall, N., Vainchenker, W., Thomas, G., Najman, A. (2006) Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*, 346-352.

14. Rumi, E., Passamonti, F., Pietra, D., Della Porta, M.G., Arcaini, L., Boggi, S., Elena, C., Boveri, E., Pascutto, C., Lazzarino, M., Cazzola, M. (2006) JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer* **107**, 2206-2211.
15. Landgren, O., Goldin, L.R., Kristinsson, S.Y., Helgadottir, E.A., Samuelsson, J., Björkholm, 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.
16. Olcaydu, D., Rumi, E., Harutyunyan, A., Passamonti, F., Pietra, D., Pascutto, C., Berg, T., Jager, R., Hammond, E., Cazzola, M., Kralovics, R. (2011) The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **96**, 367-374.
17. Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso-Ramos, C., Kantarjian, H., Levine, R.L., Verstovsek, S. (2010) Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* **70**, 447-452.
18. Cervantes, F., Alvarez-Larran, A., Talarn, C., Gomez, M., Montserrat, E. (2002) Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol* **118**, 786-90.
19. Passamonti, F., Rumi, E., Caramella, M., Elena, C., Arcaini, L., Boveri, E., Del Curto, C., Pietra, D., Vanelli, L., Bernasconi, P., Pascutto, C., Cazzola, M., Morra, E., Lazzarino, M. (2008) A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood* **111**, 3383-3387.
20. Castro-Malaspina, H. (1984) Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. *Prog Clin Biol Res* **154**, 427-454.
21. Verstovsek, S., Kantarjian, H., Mesa, R.A., Pardanani, A.D., Cortes-Franco, J., Thomas, D.A., Estrov, Z., Fridman, J.S., Bradley, E.C., Erickson-Viitanen, S., Vaddi, K., Levy, R., Tefferi, A. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* **363**, 1117-1127.
22. Campbell, P.J., Baxter, E.J., Beer, P.A., Scott, L.M., Bench, A.J., Huntly, B.J., Erber, W.N., Kusec, R., Larsen, T.S., Giraudier, S., Le Bousse-Kerdilès, M.C., Griesshammer, M., Reilly, J.T., Cheung, B.Y., Harrison, C.N., Green, A.R. (2006) Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation *Blood* **108**, 3548-3555.
23. Mertens, C., Darnell, J.J. (2007) JAK-STAT signaling. *Cell* **131**, 612.
24. Schindler, C., Levy, D.E., Decker, T. (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* **282**, 20059-20063.
25. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Cortes, J., Verstovsek, S. (2011) Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 127-140.
26. Leonard, W.J., O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**, 293-322.
27. Saharinen, p., Vihinen, M., Silvennoinen, O. (2003) Autoinhibition of Jak2

- Tyrosine Kinase Is Dependent on Specific Regions in Its Pseudokinase Domain. *Mol Biol Cell* **14**, 1448-1459.
28. Haan, C., Kreis, S., Margue, C., Behrmann, I. (2006) Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol* **72**, 1538-1546.
 29. answers.com.
 30. Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G., Ihle, J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-395.
 31. Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K. (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397-409.
 32. James, C., Ugo, V., Le Coue´dic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garc,on, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144-1148.
 33. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, R.C. (2005) A Gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* **352**, 1779-1790.
 34. Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott, M.A., Erber, W.N., Green, A.R. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054-1061.
 35. Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., Gilliland, D.G. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387-397.
 36. <http://atlasgeneticsoncology.org>.
 37. Bandaranayake, R.M., Ungureanu, D., Shan, Y., Shaw, D.E., Silvennoinen, O., Hubbard, S.R. (2012) Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant of V617F. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 754-759.
 38. Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.-B., Vainchenker, W., Constantinescu, S.N. (2005) JAK1 and Tyk2 activation by the homologous Polycythemia Vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor *J Biol Chem* **280**, 41893-41899.
 39. Gale, R.E., Allen, A.J., Nash, M.J., Linch, D.C. (2007) Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for many years. *Blood* **109**, 1241-1243.
 40. Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupre, N., Skoda, R.C., Hermouet, S. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and

- polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865-1867.
41. Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M., Issa, J.P. (2005) JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* **106**, 3370-3373.
 42. Vicente, C., Vázquez, I., Marcotegui, N., Conchillo, A., Carranza, C., Rivell, G., Bandrés, E., Cristobal, I., Lahortiga, I., Calasanz, M.J., Odero, M.D. (2007) JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers. *Leukemia* **21**, 2386-2390.
 43. Levine, R.L., Loriaux, M., Huntly, B.J., Loh, M.L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J.J., Willis, S.G., Nguyen, K.T., Flores, N.J., Estey, E., Gattermann, N., Armstrong, S., Look, A.T., Griffin, J.D., Bernard, O.A., Heinrich, M.C., Gilliland, D.G., Druker, B., Deininger, M.W. (2005) 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**, 3377-9.
 44. Goerttler, P.S., Steimle, C., März, E., Johansson, P.L., Andreasson, B., Griesshammer, M., Gisslinger, H., Heimpel, H., Pahl, H.L. (2005) The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* **106**, 2862-2864.
 45. Kralovics, R., Teo, S., Buser, A., Brutsche, M., Tiedt, R., Tichelli, A., Passamonti, F., Pietra, D., Cazzola, M., Skoda, R. (2005) Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* **106** 3374-3376.
 46. Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., Villeval, J.L. (2006) JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* **108**, 1652-1660.
 47. Bumm, T.G., Elsea, C., Corbin, A.S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R.T., Druker, B.J., Deininger, M.W. (2006) Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* **66**, 11156-11165.
 48. Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R., Lee, B., Gilliland, D. (2006) Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* **107**, 4274-81.
 49. Campbell, P.J., Scott, L.M., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Marsden, J.T., Duffy, A., Boyd, E.M., Bench, A.J., Scott, M.A., Vassiliou, G.S., Milligan, D.W., Smith, S.R., Erber, W.N., Bareford, D., Wilkins, B.S., Reilly, J.T., Harrison, C.N., Green, A.R. (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.
 50. Wadey, R.B., Pal, N., Buckle, B., Yeomans, E., Pritchard, J., Cowell, J.K. (1990) Loss of heterozygosity in Wilms' tumour involves two distinct regions of chromosome 11. *Oncogene* **5**, 901-907.
 51. Hagstrom, S.A., Dryja, T.P. (1999) Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. *Proc*

- Natl Acad Sci* **96**, 2952-2957.
52. Kralovics, R., Guan, Y., Prchal, J.T. (2002) Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* **30**, 229-236.
 53. Scott, L.M., Scott, M.A., Campbell, P.J., Green, A.R. (2006) Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood Rev* **108**, 2435-2437.
 54. <http://www.hematology.org/Publications/Hematologist/2007/2095.aspx>.
 55. Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., Skoda, R. (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* **111**, 3931-3940.
 56. Tefferi, A., Strand, J.J., Lesho, T.L., Knudson, R.A., Finke, C.M., Gangat, N., Pardanani, A., Hanson, C.A., Ketterling, R.P. (2007) Bone marrow JAK2 V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* **21**, 2074-2075.
 57. Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Rambaldi, A., Barosi, G., Marchioli, R., Marfisi, R.M., Finazzi, G., Guerini, V., Fabris, F., Randi, M.L., De Stefano, V., Caberlon, S., Tafuri, A., Ruggeri, M., Specchia, G., Liso, V., Rossi, E., Pogliani, E., Gugliotta, L., Bosi, A., Barbui, T. (2007) Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* **110**, 840-6.
 58. Tefferi, A., Sirhan, S., Lasho, T.L., Schwager, S.M., Li, C.Y., Dingli, D., Wolanskyj, A.P., Steensma, D.P., Mesa, R., Gilliland, D.G. (2005) Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol* **131**, 166-171.
 59. Tefferi, A. (2008) JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma* **49**, 388-397.
 60. Passamonti, F., Rumi, E. (2009) Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica* **94**, 7-10.
 61. Kittur, J., Knudson, R.A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Gangat, N., Wolanskyj, A.P., Li, C.Z., Wu, W., Ketterling, R.P., Pardanani, A., Tefferi, A. (2007) Clinical correlates of JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* **109**, 2279-84.
 62. Geron, I., Abrahamsson, A.E., Barroga, C.F., Kavalierchik, E., Gotlib, J., Hood, J.D., Durocher, J., Mak, C.C., Noronha, G., Soll, R.M., Tefferi, A., Kaushansky, K., Jamieson, C.H. (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors. *Cancer Cell* **13**, 321-330.
 63. Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jager, R., Berg, T., Gisslinger, B., Pabinger, I., Gisslinger, H., Kralovics, R. (2009) A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics* **41**, 450-454.
 64. Kilpivaara, O., Mukherjee, S., Schram, A.M., Wadleigh, M., Mullally, A., Ebert, B.L., Bass, A., Marubayashi, S., Heguy, A., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Offit, K., Stone, R.M., Gilliland, D.G., Klein, R.J., Levine, R.L. (2009) A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* **41**, 455-459.
 65. Jones, A.V., Chase, A., Silver, R.T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y.L., Cario, H., Pahl, H.L., Collins, A., Reiter, A., Grand, F., Cross, N.C. (2009) JAK2

- haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature Genetics* **41**, 446-9.
66. Jones, A.V., Campbell, P.J., Beer, P.A., Schnittger, S., Vannucchi, A.M., Zoi, K., Percy, M.J., McMullin, M.F., Scott, L.M., Tapper, W., Silver, R.T., Oscier, D., Harrison, C.N., Grallert, H., Kisialiou, A., Strike, P., Chase, A.J., Green, A.R., Cross, N.C. (2010) The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**, 4517-4523.
67. Pietra, D., Casetti, I., Da Vià, M., Elena, C., Milanese, C., Rumi, E. (2012) JAK2 GGCC haplotype in MPL mutated myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* **87**, 746-747.
68. Schram, A., Xing, X., Kilpivaara, O., Mukherjee, S., Viny, A., Guryanova, O., Klein, R.J., Levine, R.L. (2011) Genetic and Functional Investigation of Germline JAK2 Alleles That Predispose to Myeloproliferative Neoplasms. *53 ASH Annual Meeting and Exposition* **124**.
69. Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Warren, A.J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R. (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* **356**, 459-468.
70. Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Clark, J.J., Lee, S.J., Golub, T.R., Wadleigh, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L. (2006) MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* **3**, e270.
71. Pardanani, A., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., McClure, R.F., Litzow, M.R., Gilliland, D.G., Tefferi, A. (2006) MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **108**, 3472-3476.
72. Delhommeau, F., Dupont, S., James, C., Masse, A., le Couedic, J.P., Valle, V.D., Alberdi, A., Dessen, P., Fontenay, M., Casadevall, N., Soulier, J., Bernard, O.A., Vainchenker, W. (2008) TET2 Is a Novel Tumor Suppressor Gene Inactivated in Myeloproliferative Neoplasms: Identification of a Pre-JAK2 V617F Event *ASH Annu Meet Abstr* **112**, LBA-3 Late-breaking Abstract.
73. Tefferi, A., Pardanani, A., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Gangat, N., Finke, C.M., Schwager, S., Mullally, A., Li, C.Y., Hanson, C.A., Mesa, R., Bernard, O., Delhommeau, F., Vainchenker, W., Gilliland, D.G., Levine, R.L. (2009) TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* **23**, 905-911.
74. Sanada, M., Suzuk, i.T., Shih, L.Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koefler, H.P., Ogawa, S. (2009) Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* **460**, 904-908.
75. Grand, F.H., Hidalgo-Curtis, C.E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A.V., Score, J., Metzgeroth, G., Oscier, D., Hall, A., Brandts,

- C., Serve, H., Reiter, A., Chase, A.J., Cross, N.C. (2009) Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6182-6192.
76. 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.
77. Brecqueville, M., Rey, J., Bertucci, F., Coppin, E., Finetti, P., Carbuccia, N., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Gisserot, O., Verrot, D., Slama, B., Vey, N., Mozziconacci, M.J., Birnbaum, D., Murati, A. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* **51**, 743-755.
78. Rosnet, O., Mattei, M.G., Marchetto, S., Birnbaum, D. (1991) Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics* **9**, 380-385.
79. Shurin, M.R., Esche, C., Lotze, M.T. (1998) FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 37-48.
80. Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., Misawa, S. (1996) Internal tandem duplication of the Flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**, 1911-1918.
81. Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schoch, C., Haferlach, T., Hiddemann, W., Schnittger, S. (2002) A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* **100**, 3423-3425.
82. Gilliland, D.G., Griffin, J.D. (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532-1542.
83. Beisenherz-Huss, C., Mundt, M., Herrala, A., Vihko, P., Schubert, A., Groner, B. (2001) Specific DNA binding and transactivation potential of recombinant, purified Stat5. *Mol Cell Endocrinol* **183**, 101-112.
84. Lee, B.H., Williams, I.R., Anastasiadou, E., Boulton, C.L., Joseph, S.W., Amaral, S.M., Curley, D.P., Duclos, N., Huntly, B.J., Fabbro, D., Griffin, J.D., Gilliland, D.G. (2005) FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene* **24**, 7882-7892.
85. Mesa, R.A., Li, C.Y., Ketterling, R.P., Schroeder, G.S., Knudson, R.A., Tefferi, A. (2005) Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* **105**, 973-7.
86. Medeiros, B.C., Zhang, T., Lipton, J.H., Kamel-Reid, S. (2007) Absence of FTL3 mutations in patients with JAK2V617F mutation negative essential thrombocythemia. *Am J Hematol* **82**, 293-294.
87. Spasovski, V., Tosić, N., Kostić, T., Pavlović, S., Colović, M. (2010) JAK2-V617F mutation in patients with myeloproliferative neoplasms: association with FLT3-ITD mutation. *Srp Arh Celok Lek* **138**, 614-618.
88. Testa, U. (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **18**, 1176-1199.
89. Matalova, E., Setkova, J., Blackburn, J., Misek, I., Sharpe, P.T. (2006) CD 95 mediated apoptosis in embryogenesis: implication in tooth development. *Orthod Craniofac Res* **9**, 123-8.

90. Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V. (1999) The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* **16**, 512-519.
91. Li, G., Dickson, G.R., Marsh, D.R., Simpson, H. (2003) Rapid new bone tissue remodeling during distraction osteogenesis is associated with apoptosis. *J Orthop Res* **21**, 28-35.
92. Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* **4**, 410-415.
93. Eguchi, K. (2001) Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* **40**, 275-284.
94. Rabinowich, H., Reichert, T.E., Kashii, Y., Gastman, B.R., Bell, M.C., Whiteside, T.L. (1998) Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* **101**, 2579-2588.
95. Schriever, F., Huhn, D. (2003) New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* **63**, 953-969.
96. Cook, J.R., Craig, F.E., Swerdlow, S.H. (2003) bcl-2 expression by multicolor flow cytometric analysis assists in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node and bone marrow. *Am J Clin Pathol* **119**, 145-151.
97. Mattson, M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129.
98. Serban, N. (1997) O celiji. *Zavod za udzbenike i nastavna sredstva. Beograd.*
99. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
100. Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
101. Masood, A., Azmi, A.S., Mohammad, R.M. (2011) Small Molecule Inhibitors of Bcl-2 Family Proteins for Pancreatic Cancer Therapy. *Cancers* **3**, 1527-1549.
102. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516.
103. Thomadaki, H., Scorilas, A. (2006) BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* **43**, 1-67.
104. Burlacu, A. (2003) Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* **7**, 249-257.
105. Forro, G. (2009) The signalling pathway of BimL and BimS, two isoforms of the BH3-only protein Bim, in apoptosis. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/forro-gabriella-2009-12-02/HTML/chapter2.html>.
106. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-1911.
107. Silva, M., Richard, C., Benito, A., Sanz, C., Olalla, I., Fernández-Luna, J. (1998) Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* **338**, 564-571.
108. Garçon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., Lecluse, Y., Bennaceur-Griscelli, A., Vainchenker, W. (2006) Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* **108**, 1551-4.
109. Tognon, R., Gasparotto, E.P., Neves, R.P., Nunes, N.S., Ferreira, A.F., Palma, P., Kashima, S., Covas, D.T., Santana, M., Souto, E.X., Zanichelli, M.A., Simões, B.P., de Souza, A.M., Castro, F.A. (2012) Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele

- burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. *J Hem Oncol* **5**, 2-11.
110. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular cell* **3**, 287-296.
 111. Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**, 1966-1968.
 112. Scorilas, A., Kyriakopoulou, L., Yousef, G.M., Ashworth, L.K., Kwamie, A., Diamandis, E.P. (2001) Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family. *Genomics* **72**, 217-221.
 113. Mathioudaki, K., Scorilas, A., Papadokostopoulou, A., Xynopoulos, D., Arnogianaki, N., Agnanti, N., Talieri, M. (2004) Expression analysis of BCL2L12, a new member of apoptosis-related genes, in colon cancer. *Biol Chem* **385**, 779-783.
 114. Talieri, M., Diamandis, E.P., Katsaros, N., Gourgiotis, D., Scorilas, A. (2003) Expression of BCL2L12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. *Thromb Haemost* **89**, 1081-1088.
 115. Florou, D., Papadopoulos, I.N., Scorilas, A. (2009) Molecular analysis and prognostic impact of the novel apoptotic gene BCL2L12 in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 214-218.
 116. Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
 117. De Maria, R., Testi, R. (1998) Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* **19**, 121-5.
 118. Takahashi, T., Tanaka, M., Nagata, S. (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by point mutation in Fas Ligand. *Cell* **76**, 969-976.
 119. Watanabe-Fukunaga, C., Brannan, I., Copeland, G. (1995) Lymphoproliferation in mice explained by defect in Fas antigen that mediate apoptosis. *Nature* **356**, 314-317.
 120. Owen-Schaub, L.B., Radinsky, R., Kruzel, E., Berry, K., Yonehara, S. (1994) Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res* **54**, 1580-1586.
 121. Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**, 1363-1366.
 122. Gratas, C., Tohma, Y., Barnas, C., Taniere, P., Hainaut, P., Ohgaki, H. (1998) Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas in human esophageal cancer. *Cancer Res* **58**, 2057-2062.
 123. Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Lowrey, G.A., Russell, E.K., Lipkowitz, S. (1996) Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res* **56**, 4791-4798.
 124. Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* **2**, 1361-1366.
 125. Nambu, Y., Hughes, S.J., Rehemtulla, A., Hamstra, D., Orringer, M.B., Beer,

- D.G. (1998) Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* **101**, 1102-1110.
126. O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F. (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand *J Exp Med* **184**, 1075-1082.
127. Zhang, L., Zhao, H., Sun, A., Lu, S., Liu, B., Tang, F., Feng, Y., Zhao, L., Yang, R., Han, Z. (2004) Early down-regulation of Bcl-xL expression during megakaryocytic differentiation of thrombopoietin-induced CD34+ bone marrow cells in essential thrombocythemia. *Haematologica* **89**, 1199-1206.
128. De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., Peschle, C. (1999) Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* **93**, 796-803.
129. De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., Peschle, C. (1999) Negative regulation of erythropoiesis by caspase -mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489-493.
130. Spasovski, V., Tosić, N., Kostić, T., Zukic, B., Stojiljkovic, M., M., C., Pavlović, S. (2010) The role of FasR/FasL system in pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Arch Biol Sci* **62**, 223-230.
131. Tognon, R., Gasparotto, E., Leroy, J., Oliveira, G., Neves, R., Carrara, R., Kashima, S., Covas, D., Santana, M., Souto, E., Zanichelli, M., Velano, C., B., S.e., Alberto, F., Miyashiro, K., de Souza, A., Amarante-Mendes, G., de Castro, F. (2011) Differential expression of apoptosis-related genes from death receptor pathway in chronic myeloproliferative diseases. *J Clin Pathol* **64**, 75-82.
132. Lozzio, C., Lozzio, B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood Rev* **45**, 321-334.
133. Martin, P., Papayannopoulou, T. (1982) HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science* **216**, 1233-1235.
134. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**, 713-733.
135. Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4645-4649.
136. Boshart, M., Kluppel, M., Schmidt, A., Schutz, G., Luckow, B. (1992) Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* **110**, 129-130.
137. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
138. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory manual. *Cold Spring Harbor New York*, pp. 9.16-9.46.
139. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
140. www.qiagen.com.
141. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J.,

- van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **17**, 1013-1034.
142. <http://www.appliedbiosystems.com>.
143. Wang, B., Wang, X.F., Howell, P., Qian, X., Huang, K., Riker, A.I., Ju, J., Xi, Y. (2010) A personalized microRNA microarray normalization method using a logistic regression model. *Bioinformatics* **26**, 228-234.
144. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
145. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
146. Cohen, S.N., Chang, A.C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* **69**, 2110-2114.
147. Barnes, W.M. (1977) Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science* **195**, 393-4.
148. Zhou, C., Yang, Y., Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.
149. Shannon, J.R. (1973) *Tissue Culture Methods and Application*. New York: Academic Press Inc, pp 112-718, .
150. Meryman, H.T. (1963) Preservation of living cells. *Fed Proc* **22**, 81-89.
151. Ristić, M. (1979) Hematologija za III i IV razred medicinske škole. *Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, 242-243.
152. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419.
153. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
154. www.genomatix.de/online.
155. Fried, M., Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**, 6505-6525.
156. Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F. (1988) The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* **2**, 1089-1100.
157. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
158. Stein, B.L., Williams, D.M., Wang, N.Y., Rogers, O., Isaacs, M.A., Pemmaraju, N., Spivak, J.L., Moliterno, A.R. (2010) Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* **95**, 1090-1097.
159. Vawda, A., Davis, J., Vercauteren, S. Leukemic transformation of anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **118**, 3763.
160. Slape, C.I., Saw, J., Jowett, J.B., Aplan, P.D., Strasser, A., Jane, S.M., Curtis,

- D.J. Inhibition of apoptosis by BCL2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome. *Blood* **120**, 2475-83.
161. Horiike, S., Yokota, S., Nakao, M., Iwai, T., Sasai, Y., Kaneko, H., Taniwaki, M., Kashima, K., Fujii, H., Abe, T., Misawa, S. (1997) Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* **11**, 1442-1446.
162. Theocharides, A., Boissinot, M., Girodon, F., Garand, R., Teo, S., Lippert, E., Talmant, P., Tichelli, A., Hermouet, S., Skoda, R. (2007) Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* **110**, 375-379.
163. Vannucchi, A., Biamonte, F. (2011) Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **96**, 1398-1402.
164. Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., Kouzarides, T. (2009) JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* **461**, 819-822.
165. Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Della Porta, M.G., Boveri, E., Pascutto, C., Vanelli, L., Arcaini, L., Burcheri, S., Malcovati, L., Lazzarino, M., Cazzola, M. (2006) Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* **107**, 3676-82.
166. Theocharides, A., Passweg, J., Medinger, M., Looser, R., Li, S., Hao-Shen, H., Buser, A., Gratwohl, A., Tichelli, A., Skoda, R. (2008) The allele burden of JAK2 mutations remains stable over several years in patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica* **93**, 1890-1893.
167. Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Moller, M.B., Hasselbalch, H.C. (2007) The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. *Eur J Haematol* **79**, 508-515.
168. Kaushansky, K. (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* **115**, 3339-47.
169. Olcaydu, D., Skoda, R.C., Looser, R., Li, S., Cazzola, M., Pietra, D., Passamonti, F., Lippert, E., Carillo, S., Girodon, F., Vannucchi, A., Reading, N.S., Prchal, J.T., Ay, C., Pabinger, I., Gisslinger, H., Kralovics, R. (2009) The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* **23**, 1924-1926.
170. Leu, J.H., Yan, S.J., Lee, T.F., Chou, C.M., Chen, S.T., Hwang, P.P., Chou, C.K., Huang, C.J. (2000) Complete genomic organization and promoter analysis of the round-spotted pufferfish JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 genes. *DNA Cell Biol* **19**, 431-446.
171. Aringer, M., Hofmann, S.R., Frucht, D.M., Chen, M., Centola, M., Morinobu, A., Visconti, R., Kastner, D.L., Smolen, J.S., O'Shea, J.J. (2003) Characterization and analysis of the proximal Janus kinase 3 promoter. *J Immunol* **170**, 6057-6064.
172. Lacy, J., Rudnick, H. (1992) Transcriptional regulation of the human IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23) by EBV. Identification of EBV-responsive regulatory elements in intron 1. *J Immunol* **148**, 1554-1560.
173. Labie, D., Pagnier, J., Lapoumeroulie, C., Rouabhi, F., Dunda-Belkhodja, O., Chardin, P., Beldjord, C., Wajcman, H., Fabry, M.E., Nagel, R.L. (1985)

- Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2111-2114.
174. Stojiljkovic, M., Zukic, B., Tomic, N., Karan-Djurasevic, T., Spasovski, V., Nikcevic, G., Pavlovic, S. (2010) Novel transcriptional regulatory element in the phenylalanine hydroxylase gene intron 8. *Mol Genet Metab* **101**, 81-83.
175. Yang, Y., Hwang, C., D'Souza, U., Lee, S., Junn, E., Mouradian, M. (2000) Three-amino acid extension loop homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. *J Biol Chem* **275**, 20734-41.
176. Argiropoulos, B., Yung, E., Humphries, R. (2007) Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev* **21**, 2845-2849.
177. Wotton, D., Lo, R.S., Swaby, L.A., Massague, J. (1999) Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* **274**, 37105-37110.
178. Ghia, P., Caligaris-Cappio, F. (2000) The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* **79**, 157-173.
179. Martyre, M.C., Magdelenat, H., Bryckaert, M.C., Laine-Bidron, C., Calvo, F. (1991) Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* **77**, 80-6.
180. Bock, O., Loch, G., Schade, U., von Wasielewski, R., Schlue, J., Kreipe, H. (2005) Aberrant expression of transforming growth factor beta-1 (TGF beta-1) per se does not discriminate fibrotic from non-fibrotic chronic myeloproliferative disorders. *J Pathol* **205**, 548-557.
181. Tefferi, A., Vaidya, R., Caramazza, D., Finke, C., Lasho, T., Pardanani, A. (2011) Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol* **29**, 1356-163.
182. Tyner, J.W., Bumm, T.G., Deininger, J., Wood, L., Aichberger, K.J., Loriaux, M.M., Druker, B.J., Burns, C.J., Fantino, E., Deininger, M.W. (2010) CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**, 5232-5240.
183. Kröger, N., Kvasnicka, M., Jürgen, T. (2012) Replacement of hematopoietic system by allogeneic stem cell transplantation in myelofibrosis patients induces rapid regression of bone marrow fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S25.
184. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243.
185. Naismith, J.H., Sprang, S.R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* **23**, 74-79.
186. Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
187. Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D., Valcarcel, J. (2005) Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* **19**, 475-484.

188. Nagata, S., Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
189. Zeuner, A., Pedini, F., Signore, M., Ruscio, G., Messina, C., Tafuri, A., Girelli, G., Peschle, C., De Maria, R. (2006) Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood* **107**, 3495-502.
190. Takakuwa, T., Dong, Z., Takayama, H., Matsuzuka, F., Nagata, S., Aozasa, K. (2001) Frequent mutations of Fas gene in thyroid lymphoma. *Cancer Res* **61**, 1382-5.
191. Takayama, H., Takakuwa, T., Dong, Z., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S., Aozasa, K. (2001) Fas gene mutations in prostatic intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis of laser capture microdissected specimens. *Lab Invest* **81**, 283-8.

BIOGRAFIJA

Vesna Spasovski rođena je 20. 07. 1971. godine u Čačku, gde je završila Osnovnu školu i Gimnaziju. Biološki fakultet je završila 1997. godine sa prosečnom ocenom 8.64. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, Program Molekularna biologija, upisala je 2007. godine.

Vesna Spasovski ima publikovanih trinaest radova u domaćim i stranim časopisima i više usmenih i poster prezentacija na domaćim i stranim kongresima.

Publikovani radovi:

1. **Spasovski V**, Tosic N, Nikcevic G, Stojiljkovic M, Zukic B, Radmilovic M, Karan – Djurasevic T, Srzentic S, Colovic M and Pavlovic S. The influence of novel transcriptional regulatory element in intron 14 on expression of Janus kinase 2 gene in myeloproliferative neoplasms. *J Appl Genet.* 2012; DOI: 10.1007/s13353-012-0125-x
2. Vukašinović Z, Spasovski D, Kralj-Iglič V, Marinković-Erić J, Šešlija I, Živković Z, **Spasovski V**. Impact of Triple Pelvic Osteotomy on Contact Stress Pressure Distribution in the Hip Joint. *Intern Ortop.* 2012. in press
3. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Kostic T, **Spasovski V**, Nikcevic G, Srzentic S, Colovic M, Colovic N, Vidovic A, Antic D, Mihaljevic B, Pavlovic S, Tosic N. Mutational status and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012; 12(4): 252-60.
4. Kuzmanovic M, Tosic N, Colovic N, Karan-Djurasevic T, **Spasovski V**, Radmilovic M, Nikcevic G, Suvajdzic-Vukovic N, Tomin D, Vidovic A, Virijevec M, Pavlovic S, Colovic M. Prognostic Impact of NPM1 Mutations in Serbian Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Acta Haematol.* 2012; 128(4): 203-212.
5. Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, Ugrin M, **Spasovski V**, Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular genetics and genotype based estimation of BH4-responsiveness in Serbian PKU patients: spotlight on phenotypic implications of p.L48S. *JIMD Reports.* 2012; DOI 10.1007/8904_2012_178
6. Karan-Djurasevic T, Palibrk V, Zukic B, **Spasovski V**, Glumac I, Colovic M, Colovic N, Jurisic V, Scorilas A, Pavlovic S, Tosic N. Expression of Bcl2L12 in chronic lymphocytic leukemia patients: association with clinical and molecular prognostic markers. *Med Oncol.* 2012.
7. Stojiljkovic M, Zukic B, Tosic N, Karan-Djurasevic T, **Spasovski V**, Nikcevic G, Pavlovic S. Novel transcriptional regulatory element in the phenylalanine hydroxylase gene intron. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 101 (1), 81-83.
8. Krstovski N, Tosic N, Janic D, Dokmanovic L, Kuzmanovic M, **Spasovski V**, Pavlovic S. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood

- acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med. Oncol.* 2010; 27(3), 640-645.
9. Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B, Karan-Djurasevic T, Stojiljkovic M, **Spasovski V**, Tosic N, Dokmanovic L, Janic D, Pavlovic S. Thalassemia Syndromes in Serbia: An update. *Hemoglobin.* 2010; 34 (5), 477-485.
 10. **Spasovski V**, Tosic N, Kostic T, Zukic B, Stojiljkovic M, Colovic M, Pavlovic S. The role of FasR/FasL system in pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Arch. Biol. Sci.* 2010; 62 (2), 223-230.
 11. **Spasovski V**, Tošić N, Kostić T, Pavlović S, Čolović M. Mutacija JAK2-V617F kod bolesnika s mijeloproliferativnim neoplazijama - veza sa mutacijom FLT3-ITD. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2010; 138 (9-10), 614-618.
 12. **Verbic V**, Grujic D, Sokolovic M, Stevanovic M. Detection of chromosome 21 aneuploidy by fluorescent in situ hybridisation. *Archive of Biological Sciences*, 2000; 52 (1), 15-20.
 13. Jovicic D, Milacic S, **Verbic V**. Chromosome aberrations in persons that were in contact with 60Co. *Genetika.* 2000; Vol. 31, No 3, 261-267

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Весна Спасовски _____

број индекса _____ ИО 07103 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекуларни механизми патогенезе мијелопролиферативних неоплазија:

поремећај експресије гена укључених у пролиферацију и апоптозу“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 20. 11. 2012. _____

Весна Спасовски

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Весна Спасовски

Број индекса ИО 07103

Студијски програм Молекуларна Биологија

Наслов рада „Молекуларни механизми патогенезе мијелопролиферативних
неоплазија: поремећај експресије гена укључених у пролиферацију и апоптозу“

Ментор др Соња Павловић и др Душанка Савић-Павићевић

Потписани/а Весна Спасовски

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20. 11. 2012.

Весна Спасовски

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Молекуларни механизми патогенезе мијелопролиферативних неоплазија:

поремећај експресије гена укључених у пролиферацију и апоптозу“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20. 11. 2012.

Зесна Спасовски