

Določitev mutacij W515L in W515K v trombopoetinskem receptorju pri bolnikih z esencialno trombocitemijo

The thrombopoietin receptor W515L and W515K mutations detection in patients with essential thrombocythemia

Tadej Pajič, Leonida Kovačič, Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, SI-1525 Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

asist. dr. Tadej Pajič, univ. dipl. ing. kem. inž., spec. med. biokem, Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, SI-1525 Ljubljana, Slovenija; tel: + 386 1 43 20 230, e-mail: tadej.pajic@kclj.si

Ključne besede:

esencialna trombocitemija, trombopoetinski receptor, mutacija, verižna reakcija s polimerazo

Key words:

essential thrombocythemia, thrombopoietin receptor, mutation, polymerase chain reaction

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-180-17

Prispelo: 16. apr. 2012, Sprejeto: 10. maj 2012

Izvleček

Izhodišča: Namen naše raziskave je bil ugotoviti pojavnost mutacij W515L in W515K v trombopoetinskem receptorju (MPL) pri bolnikih z esencialno trombocitemijo (ET) in negativnim izsledkom za prisotnost somatske mutacije JAK2 V617F. Smatramo, da se pojavnost obeh mutacij v naši raziskavi ne bo bistveno razlikovala od pojavnosti, objavljene v literaturi.

Metode: V raziskavo smo vključili 77 bolnikov z ET (59 žensk in 18 moških) in negativnim izsledkom za prisotnost somatske mutacije JAK2 V617F. Mediana starosti bolnikov je bila 48 let, razpon od 18 do 89 let. Granulocite smo osamili z gostotnim gradientnim centrifugiranjem vzorcev periferne krvi preko fikola ter z liziranjem eritrocitov. DNA smo osamili z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ZDA). Mutaciji MPL W515L in MPL W515K smo določili z reagenčnim kompletom podjetja Ipsogen (Francija) z načinom kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) in alelni diskriminaciji.

Rezultati: Prisotnost mutacije MPL W515L smo ugotovili pri 4 % bolnikov z ET (N = 3). Prisotnost mutacije MPL W515K v 2 % (N = 1). Obe mutaciji se skupno pojavljata pri 5 % bolnikov z ET, ki smo jih vključili v raziskavo (N = 77).

Zaključki: Pogostost pojavljanja mutacij MPL W515L/K v naši raziskavi je podobna pogostosti iz drugih raziskav. Tudi v naši raziskavi se mutacija MPL W515L pogosteje pojavi kot mutacija MPL W515K. Smatramo, da je preiskava primerena za redno uporabo v laboratoriju in jo je smiselno opraviti pri bolnikih z ET in negativnim izsledkom za prisotnost somatske mutacije JAK2 V617F.

Abstract

Background: The aim of the study was to investigate the frequency of the thrombopoietin receptor (MPL) W515L and W515K mutations in our cohort of essential thrombocythemia (ET) patients negative for the somatic JAK2 V617F mutation, and to compare the results to those published in the literature.

Methods: Seventy-seven ET patients (59 female, 18 male), median age 48 (range from 18 to 89 years) and negative for JAK2 V617F mutation were included in the study. Granulocytes were isolated from patients' venous blood samples by Ficoll density gradient centrifugation followed by red blood cell lysis procedure. DNA was isolated from granulocytes by QIAamp DNA Mini Kit from Qiagen (USA). The detection of MPL W515L/K mutations was carried out by test designed by Ipsogen (France) using the fluorescence-based quantitative real-time PCR (qPCR) and allelic discrimination method.

Results: MPL W515L and MPL W515K mutations in our cohort of patients with ET and negative for the somatic JAK2 V617F mutation was found in 4 % (N = 3) and 2 % (N = 1), respectively. Both mutations were found in 5 % of ET patients included in the study (N = 77).

Conclusions: We have found out that the frequency of MPL W515L/K mutation was similar to those published in the literature and was 5 %. The MPL W515L mutation frequency was higher than MPL W515K. The assay is suitable for the routine detection of MPL W515L/K mutations in patients with ET and negative for the somatic JAK2 V617F mutation.

Uvod

Odkritje točkovne mutacije v genu za tirozinsko kinazo *JAK2* predstavlja pomemben napredek v opredelitvi in razumevanju mieloproliferativnih novotvorb (MPN).¹⁻⁵ Mutacija c.1849G>T v genu *JAK2* (referenčno zaporedje (ref. zap.) NM_004972.3) povzroči zamenjavo valina za fenilalanin na mestu aminokislinskega zaporedja 617 (ref. zap. NP_004963.1: p.Val617Phe; *JAK2* V617F), kar privede do kontinuirane kinazne aktivnosti in spodbujanja signalne poti.^{3,5-7} Danes za potrditev ET redno določamo somatsko mutacijo *JAK2* V617F, ki je prisotna pri nas pri 61 % bolnikov z ET.^{8,9} Redkeje se pri ET pojavljajo somatske mutacije v genu *MPL* (ang. Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene, *MPL*), ki kodira receptor za trombopoetin.^{1,10} Gen *MPL* se pri človeku nahaja na kromosomu 1p34, sestavljen je iz 12 eksonov. Trombopoetin je primarni in najpomembnejši regulator rasti in diferenciacije megakariocitov ter nastanka trombocitov.¹⁰

Najpogostejši somatični mutaciji v genu *MPL*, ki sta povezani z MPN, sta mutaciji *MPL* W515L in *MPL* W515K. Redkeje odkrijejo *MPL* W515A in druge mutacije.¹¹⁻¹³ Mutacije se zgodijo znotraj eksona 10 gena *MPL*. Mutacija c.1544G>T v nukleotidnem zaporedju (ref. zap. NM_005373.2) gena *MPL* povzroči zamenjavo aminokislinskega zaporedja receptorja za trombopoetin (ref. zap. NP_005364.1: p.Trp515Leu, *MPL* W515L). Mutacija c.1543_1544delTGinsAA (ref. zap. NM_005373.2) povzroči zamenjavo aminokislinskega zaporedja receptorja za trombopoetin (NP_005364.1: p.Trp515Lys; *MPL* W515K). Mutaciji sta najverjetneje povezani s povečano razrastjo hematopoetskih celic, ki je neodvisna od prisotnosti citokinov.¹³

Pogostost pojavljanja teh mutacij je največja pri bolnikih s primarno mielofibrozo (PM), pri katerih jih ugotovijo v 5 do 11 %. Pojavnost je nižja pri bolnikih z ET, zaznajo jo v 1 do 9 %. Ugotovili so jih tudi pri bolnikih z akutno megakariocitno levkemijo.^{14,15} Pri bolnikih z pravo policitemijo (PP) je

do sedaj niso ugotovili. Hkratno prisotnost mutacije *JAK2* V617F in *MPL* W515L/K so odkrili le pri redkih bolnikih. Nejasno je tudi, ali so te mutacije pri istem bolniku prisotne v istem klonu ali ločenih klonih.^{13,16} Razponi v pojavnosti mutacij so lahko posledica uporabe različnih meril za postavitev diagnoze in verjetno tudi od občutljivosti testa, s katerim so mutacije določili.

Določitvi mutacij *MPL* W515L/K sta pomembni dodatni diagnostični preiskavi pri opredelitvi MPN. Sta dokaz klonalnosti MPN.^{1,2} Namen naše raziskave je bil vpejati in ugotoviti pojavnost mutacij *MPL* W515L/K pri bolnikih z ET v Sloveniji, kjer somatske mutacije *JAK2* V617F nismo dokazali. Naše izsledke smo primerjali s tistimi iz literature. Preiskavo smo izvedli z načinom verižne reakcije s polimerazo v realnem času v vzorcih DNA granulocitov periferne krvi bolnikov z ET.

Bolniki in metode dela

Bolniki

V raziskavo smo vključili 77 bolnikov z esencialno trombocitemijo, 59 (77 %) žensk in 18 (23 %) moških. Vsi bolniki so bili negativni za prisotnost mutacije *JAK2* V617F.³ Starost bolnikov ob prvem odvzemu oz. ob napotni diagnozi je bila od 18 do 89 let. Mediana starosti bolnikov je znašala 48 let.

Vzorci periferne krvi bolnikov so bili odvzeti v ambulanti Kliničnega oddelka za hematologijo (KOH), UKC Ljubljana. Meritve smo opravili na vzorcih DNA, shranjenih pri temperaturi -20 °C v Specializiranem hematološkem laboratoriju KOH, UKC Ljubljana.

Diagnozo ET je postavil zdravnik hematolog na osnovi meril Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) 2008 in slovenskih smernic.^{1,2,17}

Bolnikom z ET smo odvzeli vensko krvi in izvedli gostotno gradientno centrifugiranje vzorcev periferne krvi preko fikola (Ficoll – Paque™ PLUS; GE Healthcare Bio-Science AB). Odstranili smo plazmo, enojdrne celice in fikol ter granulocite pridobili z liziranjem eritrocitov. DNA smo osamili s

komercialnim reagenčnim kompletom (QI-Aamp DNA Mini Kit, Qiagen, ZDA).

Izvedeni postopki so bili v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku (1975).

Določitev mutacij *MPL W515L* in *MPL W515K* z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času

Določitev izražanja mutacij *MPL W515L* in *MPL W515K* v vzorcih DNA smo izvedli z reagenčnim kompletom *MPL MutaScreen™* Kit (Ipsogen, Francija) in univerzalno reakcijsko mešanico (TaqMan® Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems, ZDA). Oba skupaj vsebujeta vse potrebne sestavine za izvedbo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR), v kateri encim Taq polimeraza razgradi fluorescenčno označeno sondo (TaqMan sondo), ki se je prilegla na specifično zaporedje znotraj nastalega pridelka PCR.

V testnem sistemu je bila sonda za zaznavo mutiranega zaporedja DNA -alela, bodisi *MPL W515L* bodisi *MPL W515K*, označena z reporterskim barvilom fluoresceinom (FAM™). Sonda za zaznavo nemutiranega zaporedja DNA-alela pa z reporterskim barvilom VIC® (Applied Biosystems, ZDA). To omogoča spremljanje pomnoževanja posameznega alela in določitev prisotnosti mutacije.¹⁸ Pri vsakem analiznem preizkusu smo najprej izvedli qPCR, da smo pridobili zadostno količino produkta PCR. Pridobili smo podatke o vrednosti kvantifikacijskega cikla (angl. quantification cycle, Cq) v reakciji qPCR, cikla pri katerem intenziteta izmerjene fluorescence v vzorcu preseže določen prag. Vrednost Cq je sorazmerna številu kopij segmenta DNA v začetku reakcije. Nato smo določili genotip z načinom alelne diskriminacije, v kateri smo po qPCR za vsak vzorec izmerili intenziteto fluorescence. Izračunali smo povprečno razmerje vrednosti intenzitete fluorescence reporterskih barvil za mutirani (barvilo FAM™-alel Y) in nemutirani (barvilo VIC®-alel X) alel. To razmerje smo primerjali z razmerjem intenzitete fluorescenčnih sond mutiranega in nemutiranega alela razmejitvenega vzorca (Cut-Off Sample), ki smo ga vsakič vključili

v izvedbo preiskave. Če je bilo to razmerje ≥ 1 , je bil vzorec pozitiven za mutacijo *MPL W515L/K*. Če je bilo razmerje < 1 , potem vzorec ni vseboval mutacije *MPL W515L/K*. Razmejitveni vzorec vsebuje 1,5 % mutiranega alela *MPL W515L* ali *W515K*. To je tudi meja občutljivosti našega načina.

Preizkuse smo opravili v dvojniku. Analizirali smo 25 ng DNA vzorca v skladu z navodili proizvajalca reagenčnega kompleta (Ipsogen, Francija). Preizkuse smo izvedli na napravi ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems).

Statistično obdelavo vzorcev smo izvedli s pomočjo statističnega programa SPSS (Statsoft Inc, ZDA). Kot parametre opisne statistike smo določili povprečno vrednost, standardno deviacijo in koeficient variacije.

Rezultati

Izvedli smo štiri analize preizkuse, kjer smo sočasno določali obe mutaciji, *MPL W515L* in *MPL W515K*. Pridobili smo podatke o vrednosti kvantifikacijskega cikla (angl. quantification cycle, Cq) v qPCR reakciji in intenzitete fluorescenčnih sond mutiranega in/ali nemutiranega alela za pozitivni, negativni kontrolni vzorec, razmejitveni vzorec in vzorce bolnikov po načinu alelne diskriminacije, opisane v poglavju Bolniki in metode:

Vpeljava načina določitve mutacij *MPL W515L/K* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in z načinom alelne diskriminacije

Pri pozitivnih kontrolnih vzorcih smo pomnožili le alel z mutacijo (Cq FAM), nemutiranega alela (Cq VIC), to je divjega tipa v qPCR, nismo zaznali. Vrednost Cq za nemutirani alel je bila 0 (Tabela 1). Pri negativnem kontrolnem vzorcu smo pomnožili ravno obratno, le nemutirani alel – divji tip. Vrednost Cq za mutirani alel je bila 0 (Tabela 1). Pri razmejitvenem vzorcu smo pomnožili tako mutirani kot nemutirani alel, pri čemer je bila vrednost Cq za mutirani alel večja, kar pomeni manjšo začetno količino DNA, ki vsebuje mutacijo (Tabela 1).

Tabela 1: Vrednosti kvantifikacijskega cikla (Cq) verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) pozitivnih, negativnih kontrolnih in razmejitenih vzorcev za mutaciji MPL W515K in MPL W515L.

	Pozitivni kontrolni vz.						Negativni kontrolni vz.						Razmejitveni vz.					
	MPL W515K			MPL W515L			MPL W515K			MPL W515L			MPL W515K			MPL W515L		
	Cq FAM	Cq VIC		Cq FAM	Cq VIC		Cq FAM	Cq VIC		Cq FAM	Cq VIC		Cq FAM	Cq VIC		Cq FAM	Cq VIC	
Eksp. 1	24,64	0		24,33	0		0	25,23	0		26,45	0		38,82	26,16		36,64	26,51
Eksp. 1	24,73	0		24,31	0		0	26,03	0		26,13	0		38,24	26,83		35,67	26,64
Eksp. 2	24,56	0		24,38	0		0	26,10	0		26,52	0		40,76	26,17		35,31	26,80
Eksp. 2	24,48	0		24,29	0		0	25,98	0		26,46	0		39,25	26,29		35,83	26,73
Eksp. 3	24,79	0		25,02	0		0	25,91	0		26,11	0		39,64	26,20		36,67	26,55
Eksp. 3	24,79	0		25,02	0		0	26,31	0		26,07	0		40,16	26,56		37,30	26,66
Eksp. 4	24,93	0		24,35	0		0	26,04	0		26,06	0		39,91	26,08		35,47	26,46
Eksp. 4	25,01	0		24,31	0		0	25,84	0		26,26	0		41,13	26,21		34,55	26,48
Srdnja vrednost Cq ± SD	24,74±0,18	0		24,50±0,32	0		0	25,93±0,31	0		26,26±0,19	0		39,74±0,97	26,31±0,25		35,93±0,89	26,60±0,12
Koef. variacije (%)	0,73	0		1,31	0		0	1,20	0		0,72	0		2,44	0,95		2,48	0,45

Iz izmerjenih vrednosti Cq v štirih analiznih preizkusih smo za pozitivni in negativni kontroli ter razmejitveni vzorec pri posameznem genotipu izračunali srednjo vrednost, standardni odklon in koeficient variacije vrednosti Cq. Ugotovili smo dobro ponovljivost vrednosti Cq kontrolnih vzorcev in razmejitvenega vzorca pri posameznem genotipu (Tabela 1). Pri rednem delu nam lahko vrednosti Cq kontrolnih vzorcev

in razmejitvenega vzorca služijo kot nadzor natančnosti določanja prisotnosti mutacij MPL W515L/K v različnih preizkusih.

Genotipizacija oz. določitev mutacije MPL W515K/L z uporabljenim reagenčnim kompletom temelji na načinu alelne diskriminacije in na razmejitvenem vzorcu, ki označuje mejo občutljivosti našega testnega sistema. Preglednica 2 prikazuje vrednosti intenzitete fluorescence mutiranega in

Tabela 2: Vrednosti intenzitete fluorescence mutiranega in nemutiranega alela razmejitvenega vzorca za mutacijo MPL W515K in mutacijo MPL W515L, pridobljenih v štirih analiznih preizkusih qPCR in alelne diskriminacije.

	Mutirani alel-Y	Nemutirani alel-X	Srednja vrednost mutirani alel-Y	Srednja vrednost nemutirani alel-X	Razmerje= Srednja vrednost nemutirani alel-X/ srednja vrednost mutirani alel-Y
Razmejitveni vzorec W515K					
Eksp. 1	1,965	1,009	1,889	0,999	0,529
Eksp. 1	1,812	0,989			
Eksp. 2	2,164	1,353	2,069	1,335	0,645
Eksp. 2	1,974	1,316			
Eksp. 3	1,974	1,035	1,900	1,025	0,539
Eksp. 3	1,826	1,015			
Eksp. 4	2,051	1,289	1,965	1,220	0,621
Eksp. 4	1,879	1,151			
Srednja vrednost ± SD	/	/	1,956 ± 0,083	1,145 ± 0,160	0,584 ± 0,058
Koef. variacije (%)	/	/	4,243	13,973	9,96
Razmejitveni vzorec W515L					
Eksp. 1	1,976	1,338	1,974	1,290	0,653
Eksp. 1	1,972	1,242			
Eksp. 2	2,029	1,073	2,029	1,061	0,523
Eksp. 2	2,029	1,048			
Eksp. 3	2,379	1,384	2,382	1,393	0,585
Eksp. 3	2,384	1,401			
Eksp. 4	2,062	1,187	2,053	1,214	0,591
Eksp. 4	2,043	1,241			
Srednja vrednost ± SD	/	/	2,109 ± 0,184	1,239 ± 0,140	0,588 ± 0,053
Koef. variacije (%)	/	/	8,724	11,299	9,04

Legenda: SD, standardni odklon; Cq FAM; vrednost kvantifikacijskega cikla za mutiran alel; Cq VIC, vrednost kvantifikacijskega cikla za nemutirani alel, divji tip.

nemutiranega alela razmejitvenega vzorca za mutacijo MPL W₅₁₅K in mutacijo MPL W₅₁₅L, pridobljenih v štirih analiznih preizkusih qPCR in alelne diskriminacije. Koeficienti variacije so nekoliko večji kot pri koeficientih variacije za C_q, dobljenih za razmejitveni vzorec (Tabela 1).

Določitev mutacij MPL W₅₁₅L/K s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času in z načinom alelne diskriminacije pri bolnikih z esencialno trombocitemijo

Z uporabljenima testnima sistemoma smo prisotnost mutacije MPL W₅₁₅L ugotovili pri 3 bolnikih z ET (4 %) (Tabela 3). Prisotnost mutacije MPL W₅₁₅K pa pri 1 bolniku z ET (2 %) (Tabela 3). Obe mutaciji se skupno pojavljata pri 5 % bolnikov z ET, ki smo jih vključili v raziskavo.

V testnem sistemu za določitev mutacije MPL W₅₁₅L je povprečna vrednost in standardni odklon vrednosti C_q vzorcev bolnikov za nemutirani alel znašal $28,01 \pm 0,97$. Koeficient variacije je bil 3,46 %. V testnem sistemu za določitev mutacije MPL W₅₁₅K je srednja vrednost in standardni odklon vrednosti C_q vzorcev bolnikov za nemuti-

rani alel znašal $28,73 \pm 1,10$. Koeficient variacije je bil 3,82 %. Pri bolnikih, ki niso imeli prisotne mutacije MPL W₅₁₅L/K, so srednje vrednosti, standardni odklon in koeficient variacije vrednosti C_q nemutiranega alela zelo podobne in kažejo na dobro ponovljivost analiznega postopka.

Razpravljanje

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) in način alelne diskriminacije je občutljiv in specifičen način za zaznavo somatskih mutacij in se v molekularnogenetski diagnostiki pogosto uporablja za ta namen. Izbira, načrtovanje visoko specifičnih oligonukleotidov in sond je ključna za zaznavo mutacij, še posebej z načinom alelne diskriminacije. Pomembno je, da v qPCR reakciji za posamezen alel dobimo specifično pomnoževanje ciljnega DNA (ali cDNA) odseka in prileganje fluorescenčno označenih sond. Vrednost C_q alela, ki ga ne določamo, bi naj bila enaka nič. Če ta ni nič, smatramo, da je prišlo do pomnoževanja neznanega, nespecifičnega odseka DNA (ali cDNA) ali nespecifične zaznave. Preizkusi na kontrolnih vzorcih nam lahko ob vpeljavi načina služijo za to oceno. Nespecifično

Tabela 3: Vrednosti intenzitete fluorescence mutiranega in nemutiranega alela vzorcev bolnikov z ET in prisotno mutacijo MPL W₅₁₅L ali MPL W₅₁₅K.

vzorec	Mutirani alel-Y	Nemutirani alel-X	Srednja vrednost mutirani alel-Y	Srednja vrednost nemutirani alel-X	Razmerje = Srednja vrednost nemutirani alel-X / srednja vrednost mutirani alel-Y	Razmerje = [Srednja vrednost nemutirani alel-X / srednja vrednost mutirani alel-Y] / [RV Srednja vrednost nemutirani alel-X / RV srednja vrednost mutirani alel-Y]
MPL W ₅₁₅ L						
J1980	1,884	1,652	1,912	1,652	0,864	1,461
	1,939	1,652				
J1751	1,374	4,136	1,352	4,018	2,973	5,026
	1,329	3,899				
J1583	1,213	3,802	1,222	3,854	3,155	5,334
	1,230	3,906				
MPL W ₅₁₅ K						
J1509	1,549	2,655	1,567	2,733	1,745	3,298
	1,584	2,811				

Legenda: RV, razmejitveni vzorec.

pomnoževanje odseka DNA (ali cDNA) ali nespecifično prileganje fluorescentno označenih sond nam lahko moti način alelna diskriminacije. Ker način sloni na končno izmerjeni intenziteti fluorescenčno označenih sond, nam ta nespecifičnost znižuje občutljivost in specifičnost preiskave. Zato je pomembno, da pri kontrolnih vzorcih zaznamo le želeno, ciljno pomnožitev odseka DNA (ali cDNA), kar je primer tudi v naših preizkusih določanja mutacije *MPL* W515K/L (Tabela 1).

Vrednosti standardne deviacije in koeficienta variacije za pozitivni in negativni kontroli ter razmejitveni vzorec, pridobljene v 4 analizi poskusih, kažejo na dobro ponovljivost vrednosti Cq. Z nadaljnjimi preizkusi v rednem delu v laboratoriju se te vrednosti lahko nadgradijo z namenom pridobiti še bolj natančnejše podatke. Že sedaj lahko te vrednosti služijo za oceno natančnosti analiz za določitev prisotnosti mutacij *MPL* W515L/K.

Genotipizacija oz. določitev mutacije *MPL* W515K/L z uporabljenim reagenčnim kompletom temelji na razmejitvenem vzorcu, ki označuje mejo občutljivosti našega testnega sistema. Koeficienti variacije končno izmerjenih fluorescenčno označenih sond načina alelna diskriminacije so nekoliko večji kot koeficienti variacije vrednosti Cq, dobljenih za razmejitveni vzorec (Tabela 1), vendar je to v skladu s potekom reakcije qPCR, katerega intenziteta fluorescence pri koncu qPCR reakcija lahko doseže plato. Ta pa se od vzorca do vzorca razlikuje, večinioma bolj kot vrednost Cq, zato se v preiskavo vključi razmejitveni vzorec, ki ima znano vrednost deleža pozitivnega vzorca in nam omogoča zanesljivo določitev iskanega genotipa. Ob pojavu bolezni je lahko delež malignega klona med normalnimi levkociti različen. Tako negativen rezultat pomeni, da mutacije nismo zaznali na meji občutljivosti preiskave, v našem primeru 1,5 %. Izsledke je zato potrebno vedno vrednotiti skupaj s klinično sliko in drugimi preiskavami.

Z uporabljenima testnima sistemoma smo prisotnost mutacije *MPL* W515L ugotovili pri 3 bolnikih z ET (4 %) (Tabela 3). Prisotnost mutacije *MPL* W515K pa pri 1 bolniku z ET (2 %) (Tabela 3). Obe mutaciji

se skupno pojavljata pri 5 % bolnikov z ET, ki smo jih vključili v raziskavo. V naši raziskavi se delež prisotnosti mutacije ujema z objavljenimi podatki iz literature. Tako kot v literaturi smo tudi v naši raziskavi ugotovili, da je mutacija *MPL* W515L pogostejša od mutacije *MPL* W515K.

Zaključek

Na podlagi izsledkov naše raziskave lahko zaključimo, da je reagenčni komplet *MPL* MutaScreen™ Kit (Ipsogen) primeren za redno določitev prisotnosti somatskih mutacij *MPL* W515L in *MPL* W515K v vzorcih DNA, izoliranih iz granulocitov. Mutaciji *MPL* W515L in *MPL* W515K se pojavljata v 5 % bolnikov z ET in negativnim izvidom za prisotnost mutacije *JAK2* V617F. Mutacija *MPL* W515L je pogostejša od mutacije *MPL* W515K. Določitvi mutacij *MPL* W515L/K sta pomembni dodatni diagnostični preiskavi pri opredelitvi MPN. Sta dokaz klonskosti. Smiselno ju je opraviti pri bolnikih s sumom na ET ali PM in negativnim izsledkom za prisotnost mutacije *JAK2* V617F.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo ga. Anici Mihajlović in ga. Mariji Jedrt Mandelc Mazaj za pomoč pri zbiranju in evidentiranju vzorcev.

Literatura

1. Varidman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–51.
2. Černelč, P. Smernice za ugotavljanje in zdravljenje bolnikov z esencialno trombocitemijo. *Zdrav Vestn* 2008; Suppl 77: I-15–7.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–61.
4. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162–68.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–90.
6. Kaushansky, K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 533–7.
7. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland D. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature reviews cancer* 2007; 7: 673–83.
8. Škerget M, Pajič T, Kralj E, Vučković J. Prisotnost deleža mutiranega alela JAK2 V617F pri kroničnih mieloproliferativnih boleznih. *Zdrav Vestn* 2008; Suppl 77: I-57–61.
9. Vuckovic J, Pajič T, Kušec R, Grat M, Lorbek M, Rogulj D, et al. Klinični pomen mutacije V617F JAK2 gena pri kroničnih mieloproliferativnih boleznih – prve izkušnje. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 629–34.
10. Pardanani AD, Levine LR, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472–6.
11. Beer PA, Campbell JP, Scott ML, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141–9.
12. Skoda RC. Thrombocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009; 159–67.
13. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. *CA Cancer J Clin* 2009. 59: p. 171–91.
14. Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; 22: 1841–8.
15. Levine RL, Warnig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 233–9.
16. Levine RL, Heaney M. New Advances in the Pathogenesis and Therapy of Essential Thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 76–82.
17. Modic M. Mieloproliferativne novotvorbe In: Andoljšek D, ed. *Bolezni krvi in krvotvornih organov*. In: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M, eds. *Interna medicina*. 2011, Littera Picta d.o.o., Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana. p. 1312–20.
18. Applied Biosystems, Genotyping Experiments, In: *Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide* 2010, Applied Biosystems; 3–15.