

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd



Vyšetření MPL genu u myeloproliferativních onemocnění

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Konzultant práce: Mgr. Iva Dolinová, PhD.

Hradec Králové 2020

Liana Vitásková, DiS.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného kvalifikačního titulu.“

Datum: 30. 4. 2020

Podpis: Liana Vitásková, DiS.

Děkuji Mgr. Ivě Dolinové, PhD., za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady, podněty a materiálové podklady k práci. A dále také svým kolegyním z oddělení klinické biochemie a molekulární genetiky v Krajské nemocnici Liberec, a.s. za odborný dohled při provádění metodické části této práce.

V neposlední řadě děkuji panu prof. Pharm.Dr. Martinu Beránkovi, PhD., za odborné zaštitění této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Autor práce: Liana Vitásková, DiS.

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Název práce: Vyšetření MPL u myeloproliferativních onemocnění

Tato bakalářská práce zpracovává téma myeloproliferativních onemocnění v souvislosti s mutacemi v MPL genu. Jejím cílem bylo zavést vyšetřovací laboratorní postupy na oddělení molekulární genetiky v Krajské nemocnici Liberec, a.s. Zvolením použitých metod jsem tuto metodu zavedla a je možné ji na našem pracovišti vyšetřovat. Určením konkrétní mutace je možné lépe určit diagnózu pacientů s myeloproliferativními onemocněními a nastavit tak vhodnou léčbu.

Cíl práce:

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s problematikou myeloproliferativních onemocnění a s jejich základní charakteristikou. Dále podrobné seznámení se s problematikou a významem mutací v MPL genu u myeloproliferativních onemocnění. Hlavním cílem bylo zavést a osvojit si metody používané při stanovení mutací MPL genu na pracovišti molekulární genetiky v Krajské nemocnici Liberec, a.s.

Metody:

V metodické části jsou popsány pracovní postupy, které jsem zavedla pro diagnostiku mutace v MPL genu na pracovišti molekulární genetiky Krajské nemocnice v Liberci, a.s. Jedná se o následující metody:

1. Izolace granulocytů z plné nesrážlivé krve metodou gradientové centrifugace
2. Kolonková izolace DNA
3. Real-time PCR s využitím hybridizačních FRET sond

Závěr:

Shrnutí problematiky mutací MPL genu u myeloproliferativních onemocnění s možnostmi jejich detekce. Díky optimalizování a zavedení laboratorní metodiky pro stanovení mutací v MPL genu jsme schopni nyní na našem pracovišti vyšetřovat mutace v MPL genu.

Klíčová slova: MPL gen, MPL mutace, hematopoéza, trombopoetin, trombopoetinový receptor, myeloproliferativní neoplázie, real-time PCR

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biochemical science

Study program: Medical bioanalytics

Author: Liana Vitásková, DiS.

Supervisor: prof. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Title: Examination of MPL in myeloproliferative diseases

This bachelor thesis is focused on the myeloproliferative diseases related to mutations in the MPL gene. By identifying a specific mutation, it is possible to determine the diagnosis of patients with myeloproliferative diseases and thus set appropriate treatment. This thesis, therefore, aimed to introduce new diagnostic procedure at the Department of Molecular Genetics at the Regional Hospital Liberec.

The aims of the work:

The first objective was to get acquainted with the myeloproliferative diseases and their essential characteristics. The second objective was to study the role of mutations in the MPL gene in myeloproliferative diseases. The main aim was then to introduce a method for the determination of MPL gene mutations at the Department of Molecular Genetics at the Regional Hospital Liberec.

Methods:

The methodological part describes the protocol that I established for the diagnosis of mutations in the MPL gene:

1. Isolation of granulocytes from whole non-coagulated blood by gradient centrifugation
2. DNA column isolation
3. Real-time PCR using hybridization FRET probes

Conclusion:

The bachelor thesis summarizes the role of the MPL gene mutations in myeloproliferative diseases and the methods for their detection. The protocol for the

determination of mutations in the MPL gene was optimized and successfully implemented into laboratory praxis in the hospital.

Key words: MPL gene, MPL mutations, hematopoiesis, thrombopoietin, thrombopoietin receptor, myeloproliferative neoplasms, real-time PCR

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1. Myeloproliferativní onemocnění.....	11
2.2. Klasifikace MPN.....	12
2.2.1. Esenciální trombocytémie (ET).....	12
2.2.2. Primární myelofibróza (PMF).....	12
2.2.3. Kongenitální amegakaryocytární trombocytopenie (CAMT).....	13
2.3. Trombopoetin.....	13
2.4. Trombopoetinový receptor c-MPL.....	14
2.5. MPL gen a jeho mutace.....	14
2.6. Janusova kináza 2.....	17
2.7. JAK/STAT signalizace.....	17
2.8. Incidence (výskyt) mutací u pacientů s MPN.....	20
2.9. Diagnostika MPN.....	21
3. Cíl práce.....	23
4. Metodická část.....	24
4.1. Detekce mutace W515L(K) v genu MPL metodou real-time PCR na pracovišti molekulární genetiky v KNL, a.s.	24
4.2. Biologický materiál.....	24
4.3. Izolace granulocytů z plné nesrážlivé krve metodou gradientové centrifugace.....	25
4.3.1. Princip metody.....	25
4.3.2. Pracovní postup.....	25
4.4. Kolonková izolace DNA.....	26
4.4.1. Princip metody.....	26

4.4.2. Pracovní postup	26
4.5. REAL-TIME PCR	27
4.5.1. Princip metody.....	27
4.5.2. Hybridizační FRET sondy	28
4.5.3. Pracovní postup	29
5. Výsledky.....	32
5.1. Detekce a interpretace	32
6. Závěr.....	35
7. Seznam použité literatury	36
7.1. Literární zdroje a prameny	36
7.2. Internetové zdroje a prameny.....	37
8. Seznam použitých zkratk.....	38

1. Úvod

Myeloproliferativní onemocnění zahrnují několik chorob, jejichž základní charakteristikou je maligní přeměna kmenové buňky. To následně vede k nadměrné tvorbě krevních buněk a rozvoji klinicky závažných stavů, které jsou příslušně specifikovány dle mezinárodně uznávané klasifikace. Problematika myeloproliferativních onemocnění zahrnuje nespočet individuálních a proměnlivých faktorů na úrovni morfologické, klinické i molekulární. Díky sledování konkrétních buněk a jejich numerických a morfologických odlišností je možné určit konkrétní onemocnění.

MPL gen kóduje informaci pro vznik trombopoetinového receptoru, na který se váží molekuly trombopoetinu, jejichž hlavní funkcí je regulace správného vývoje krvetvorných kmenových buněk. Tím je trombopoetin nezbytný pro správnou krvetvorbu. Mutace postihující MPL gen vedou ke změnám citlivosti receptoru vůči trombopoetinu a následně k rozvoji patologických procesů. Detekce těchto mutací pomocí molekulárně genetických metod nám pomáhá potvrdit či vyloučit dané onemocnění a určit diagnózu. Ke konečné diagnostice je ovšem zapotřebí kombinace všech aspektů, jak molekulárně genetických, tak i morfologických či klinických.

2. Teoretická část

2.1. Myeloproliferativní onemocnění

Pojem myeloproliferativní onemocnění (MPO) byl poprvé použit Williamem Dameshekem v roce 1951 pro popis čtyř různých onemocnění, která si byla klinicky i biologicky podobná, a dnes jsou označována jako „klasická“ MPO. Jedná se o polycythemii vera (PV), esenciální trombocytémii (ET), primární myelofibrózu (PMF) a chronickou myeloidní leukémii (CML). Jelikož je CML charakterizovaná přítomností fúzního genu BCR-ABL1, jsou PV, ET a PMF někdy označovány jako BCR-ABL1-negativní MPO (Tefferi a kol., 2009).

Později byly mezi MPO zahrnuty i další choroby a v roce 2008 vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučení pro přejmenování myeloproliferativních onemocnění na myeloproliferativní neoplázie (MPN), (Vainchenker a kol., 2011).

MPN vznikají díky geneticky transformované hematopoetické kmenové buňce, která si zachovává schopnost diferenciaci v několik vývojových řad hematopoézy. Somatickou mutací těchto buněk dojde k rychlejší proliferaci v porovnání s buňkou normální (zdravou, nezměněnou). To vede k maligní hematopoéze z důvodu hypersenzitivity nebo nezávislosti buněk na normální cytokinové regulaci. MPN zasahují tři hlavní vývojové řady hematopoetických buněk a u každé choroby převládá jedna z nich (Vainchenker a kol., 2011).

MPN je skupina onemocnění zahrnující hematologická onemocnění vyznačující se nadprodukcí zralých funkčních krevních buněk s chronickým klinickým průběhem. Dalším znakem těchto neoplázií je hypercelularita kostní dřeně, s tím že u PV je zvýšené množství erytrocytů, u ET je zvýšený počet trombocytů a u PMF se vyskytuje pokročilá fibróza kostní dřeně. Pacienti s MPN mají sklony k trombotickým i krvácivým stavům a hrozí u nich riziko rozvoje leukémie (Akpinar a kol., 2013).

Na rozdíl od jiných myelodysplastických onemocnění nejsou MPN spojovány s buněčnou dysplázií, což představuje důležitý faktor při diagnostice těchto chorob.

U více než 95 % případů s MPN se mutace odpovědná za vznik onemocnění vyskytuje v genech pro Janusovu kinázu typu II (JAK2), kalretikulin (CALR) nebo trombopoetin (TPO).

2.2. Klasifikace MPN

Díky novým molekulárním poznatkům i prognostickým markerům provedla v roce 2016 WHO revizi klasifikace MPN. Do tohoto nového systému byly zahrnuty i klinicko-patologické studie, které ve svém přístupu zohledňují aspekty hematologické, morfologické, cytogenetické i molekulárně genetické. Mezi MPN jsou tedy nově řazeny chronická myeloidní leukémie (CML), chronická neutrofilní leukémie (CNL), polycythemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET), primární myelofibróza (PMF), chronická eozinofilní leukémie-nespecifikována jinak (CEL-NOS), mastocytóza a neklasifikovaná myeloproliferativní neoplazmata (Tefferi a kol., 2009).

Dále se budu zabývat popisem MPN spojených s mutacemi v MPL genu.

2.2.1. Esenciální trombocytémie (ET)

Esenciální (primární) trombocytémie je onemocnění, u kterého z důvodu poruchy krvetvorné kmenové buňky v kostní dřeni dominuje zvýšení počtu trombocytů v krvi. Zvýšené mohou být i erytrocyty a leukocyty, avšak ne tak výrazně jako trombocyty. U necelých 50 % pacientů je zjišťována mutace genu JAK2 V617F a/nebo genu pro CALR. U většiny pacientů nejsou dlouho pozorovány žádné příznaky, ale objevují se trombózy i krvácivé stavy. Základním parametrem pro určení diagnózy ET je zvýšený počet trombocytů v krvi. Dále se provádí vyšetření kostní dřene, které pomůže odlišit ET od jiných krevních onemocnění, zejména PMF (linkos.cz).

Dědičná forma tohoto onemocnění zvaná familiární esenciální trombocytémie je způsobena záměnou serinu za asparagin v pozici 505 ve struktuře trombopoetinového receptoru. Zatímco sporadická ET, která není dědičná, je způsobena záměnou tryptofanu za leucin. Tyto mutace se všeobecně označují jako W515 mutace. Záměny aminokyselin (AMK) v pozici 505 nebo 515 vedou k tomu, že trombopoetinový receptor je neustále aktivován, což v případě ET vede k nadprodukci abnormálních megakaryocytů a zvýšenému počtu trombocytů (Boyd a kol., 2010; Skoda, 2009).

2.2.2. Primární myelofibróza (PMF)

PMF je stav charakterizovaný postupnou vazivovou přestavbou kostní dřene. V průběhu onemocnění je krvetvorná tkáň kostní dřene nahrazena vazivem, což vede k produkci menšího počtu krevních buněk. Z tohoto důvodu se krvetvorba přesouvá do jater

a sleziny. Tyto orgány nejsou schopny vytvářet buňky v dostatečném množství, a tak dochází k poklesu všech krevních buněk. PMF je většinou diagnostikována u lidí starších 50 let a dvakrát častěji u mužů než u žen. V počáteční fázi onemocnění mohou být klinické příznaky shodné s ET, proto je důležité pacienta pravidelně sledovat a provádět kontrolní vyšetření kostní dřeně. Častým projevem PMF bývá únava, která je dána zejména nedostatkem erytrocytů. Dále může docházet k trombózám (počet trombocytů je při začátku onemocnění zvýšený), ale i ke krvácení. Často dochází k trombóze portální žíly a k rozvoji portální hypertenze s bolestmi břicha a hepatomegalií (linkos.cz).

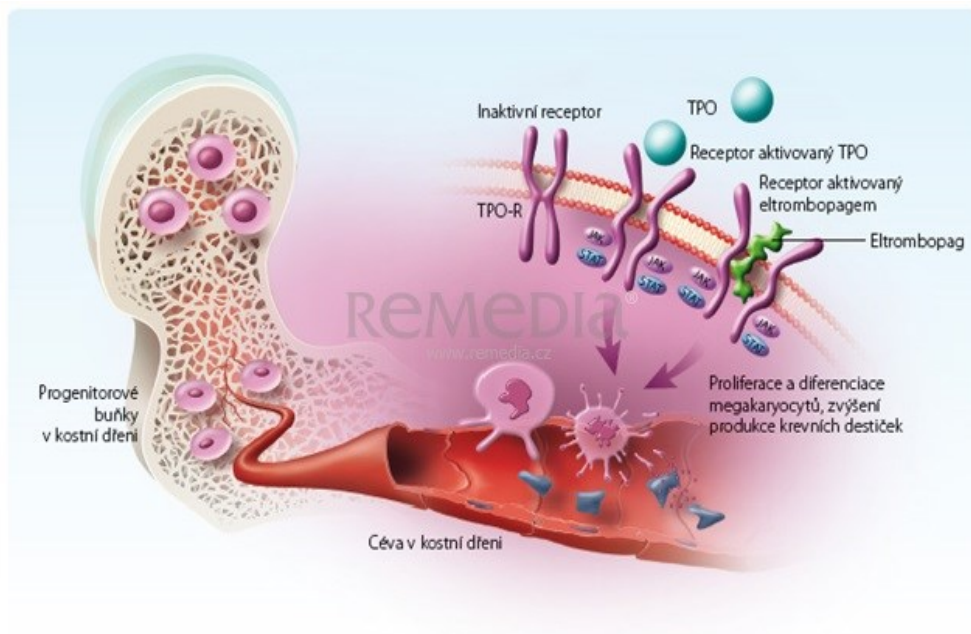
Stejně jako ET, PMF je spojována s mutací W515 MPL genu. Nadměrné množství megakaryocytů vede ke stimulaci ostatních buněk, které produkují kolagen, protein který za normálních okolností poskytuje v kostní dřeni strukturní podporu pro buňky, ale u PMF způsobuje tvorbu vazivové tkáně. Kostní dřeň postupně ztrácí funkci produkce dostatku normálních krevních buněk, což vede k rozvoji tohoto onemocnění (linkos.cz).

2.2.3. Kongenitální amegakaryocytární trombocytopenie (CAMT)

CAMT je vzácný stav způsobený mutací v MPL genu. Vyskytuje se již u novorozenců a je charakterizován nízkým počtem jak megakaryocytů, tak trombocytů. Tento stav může vést až k selhání kostní dřeně. Rozlišujeme dvě formy. CAMT I je závažný stav, kdy je trombopoetinový receptor zcela nefunkční a CAMT II je mírnější formou, u které je funkce receptoru snížena (Germeshausen a kol., 2006).

2.3. Trombopoetin

Trombopoetin (TPO) je základní hematopoetický cytokin označovaný také jako megakaryocytární růstový a diferenciací faktor. Řídí vývoj megakaryocytů pomocí produkce trombocytů a tím homeostázu krvetvorných kmenových buněk. TPO se váže na specifický receptor na buněčném povrchu (c-MPL kódovaný genem MPL). Vytvoření dimeru vede k aktivaci JAK/STAT regulační dráhy uvnitř buňky a důsledkem je aktivace syntézy megakaryocytů a následně zvýšení počtu trombocytů (obr. 1). TPO je nepostradatelným regulátorem hematopoetických kmenových buněk (HSC), je nezbytný pro udržení jejich stagnace, ale i sebeobnovy. TPO se tvoří hlavně v játrech a po jeho vazbě na receptor cílové buňky dojde k internalizaci a degradaci (Ng a kol., 2014).



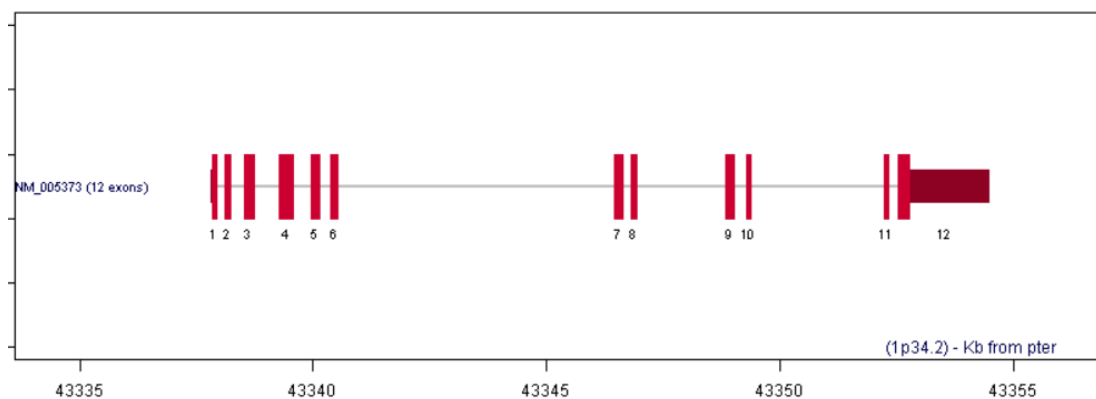
Obr. 1 - Vazba TPO na c-MPL (převzato a upraveno – <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profily/Eltrombopag/6-I-1SZ.magarticle.aspx>)

2.4. Trombopoetinový receptor c-MPL

c-MPL patří mezi skupinu cytokinových receptorů. Exprimován je převážně na povrchu hematopoetických buněk. Jedná se o transmembránový protein typu I, který je charakterizován přítomností 200 AMK obsahujících 4 cysteiny a sekvenci Trp-Ser-X-Trp-Ser poblíž svého karboxylového konce. Vlastní receptor nemá kinázovou aktivitu, ta je k němu asociována JAK2. Trombopoetinový receptor se řadí mezi klíčový faktor přežití a růstu megakaryocytů (Drachman a kol., 1995).

2.5. MPL gen a jeho mutace

MPL gen je lokalizován na krátkém raménku prvního chromozomu (1p34) a zahrnuje 12 exonů (obr. 2). Penciolelli a kol. v roce 1987 poprvé identifikovali tento protein jako retrovirus, který způsobuje akutní leukémii u myši, a proto ho pojmenovali „virus myeloproliferativní leukémie“ (MPLV).



Obr. 2 - Lokalizace a struktura MPL genu (převzato a upraveno - <http://atlasgeneticsoncology.org>)

MPL gen kóduje trombopoetinový receptor, což je transmembránový protein (označovaný jako CD 110), skládající se z 635 AMK, a vážící na sebe TPO. Vazba TPO na c-MPL vede k aktivaci JAK2, která fosforyluje MPL a spouští tak kaskádu řetězových signálů regulujících přežívání buněk, jejich proliferaci a diferenciaci. Aktivovaný receptor stimuluje signalizační kaskádu tzv. JAK/STAT dráhu přenášející chemické signály z extracelulárního prostoru do jádra buňky (obr. 3). Tento proces je důležitý pro tvorbu krevních buněk (Gong a kol., 2013).

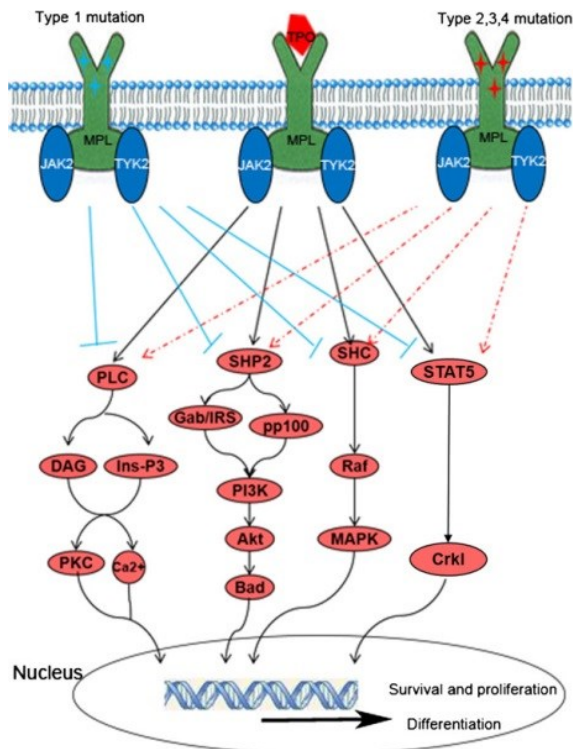
MPL mutace jsou lokalizovány v juxtamembránové oblasti receptoru (oblast blízko buněčné membrány). Nejčastější MPL mutace jsou W515L (náhrada tryptofanu za leucin) a W515K (náhrada tryptofanu za lyzin), (obr. 4). Tyto mutace mohou být nalezeny až u 10 % pacientů s PMF a až u 6 % pacientů s ET. MPL mutace způsobují u buněk jak růst nezávislý na cytokinech, tak i zvýšenou citlivost na TPO. Další MPL mutace (W515R, W515A a S505N) byly zjištěny u případů s dědičnou trombocytózou (Akpınar a kol., 2013).

Přítomnost MPL mutací u pacientů s MPN byly poprvé publikovány Pikmanem a kol. v roce 2006. MPL mutace nebyly prokázány u pacientů s PV, myelodysplastickým syndromem (MDS), CML nebo akutní myeloidní leukémií (AML). Dále byly tyto mutace prokázány u pacientů s ET a PMF (Akpınar a kol., 2013).

MPL mutace mohou být přítomny jak u pacientů s JAK2 mutací, tak i u těch bez této mutace (Gong a kol., 2013).

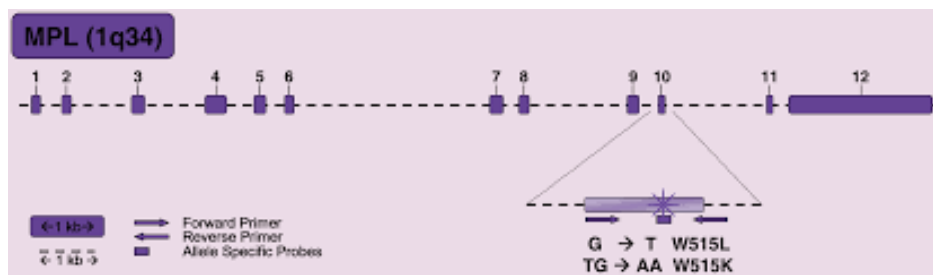
Výsledkem MPL mutace je narušení (poškození) autoinhibiční oblasti a následně aktivace trombopoetinového receptoru bez navázání ligandu. To vede k aktivaci tyrosin kináz a tím k aktivaci transkripce faktorů STAT3 a STAT5, což má za následek transformaci

hematopoetických buněk v klonu nezávislé na cytokinech. Důsledkem je vznik megakaryocytární hyperplazie a fibróza kostní dřeně (Gong a kol., 2013).



Obr. 3 - Vliv mutací MPL genu na JAK/STAT dráhu (převzato a upraveno - He et al., 2013)

Nejčastější mutace u ET a PMF jsou JAK2 V617F a MPL. Stanovení MPL je doporučováno u pacientů s podezřením na ET a PMF, u kterých nebyla prokázána JAK2 V617F mutace. Avšak u pár případů byla prokázána přítomnost obou mutací. Důležitým aspektem je to, že tyto mutace nebyly prokázány u pacientů s PV (Furtado a kol., 2013).



Obr. 4 - Znárodnění nejčastějších mutací MPL genu (převzato a upraveno- <https://theses.cz/id/4lq54s/00110808-732248932.pdf>)

2.6. Janusova kináza 2

Gen pro JAK2 je uložen na krátkém raménku chromozomu 9 (9p24) a kóduje tyrosin kinázový protein skládající se z 1132 AMK. Skládá se ze tří hlavních domén: JH1, JH2 a FERM (Gong a kol., 2013).

Tato cytoplazmatická tyrosin kináza má důležitou roli v přenosu signálů uvnitř hematopoetických buněk pomocí erythropoetinu (EPO), TPO, interleukinu 3 (IL3), růstového faktoru pro granulocyty (G-CSF) a růstového faktoru pro granulocyty a makrofágy (GM-CSF), (Akpınar a kol., 2013).

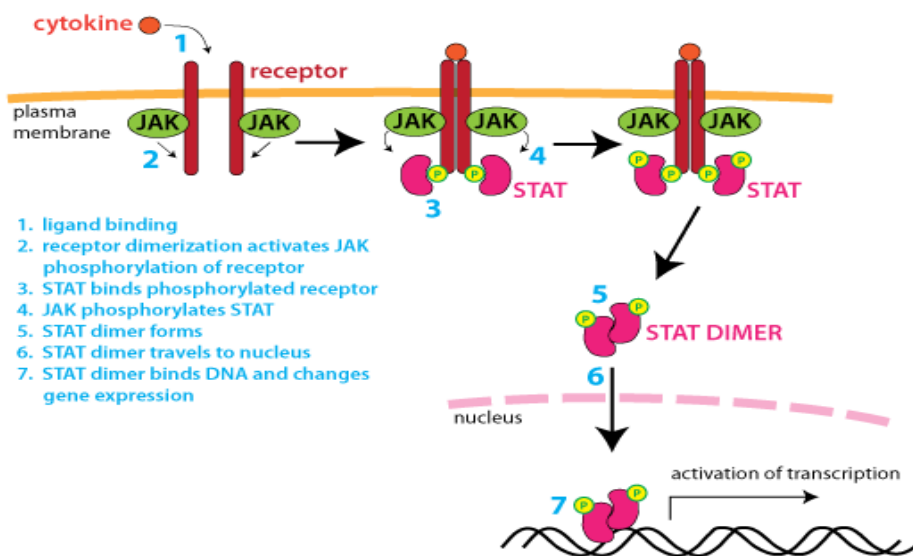
V roce 2005 byla u BCR-ABL negativních pacientů s MPN objevena somatická bodová mutace v genu pro JAK2 (JAK2 V617F mutace). Tato mutace je výsledkem náhrady valinu za fenylalanin v kodonu 617 a zvyšuje aktivitu receptoru pro růstové faktory. Přítomnost této mutace byla pozorována u 90-95 % pacientů s PV, 50-60 % pacientů s ET a u 40-50 % pacientů s PMF (Akpınar a kol., 2013).

V roce 2007 byla u 3 % pacientů s PV objevena další mutace v exonu 12. Mutace v exonu 12 a V617F mutace se vzájemně vylučují, je přítomna vždy jen jedna z nich (Gong a kol., 2013).

2.7. JAK/STAT signalizace

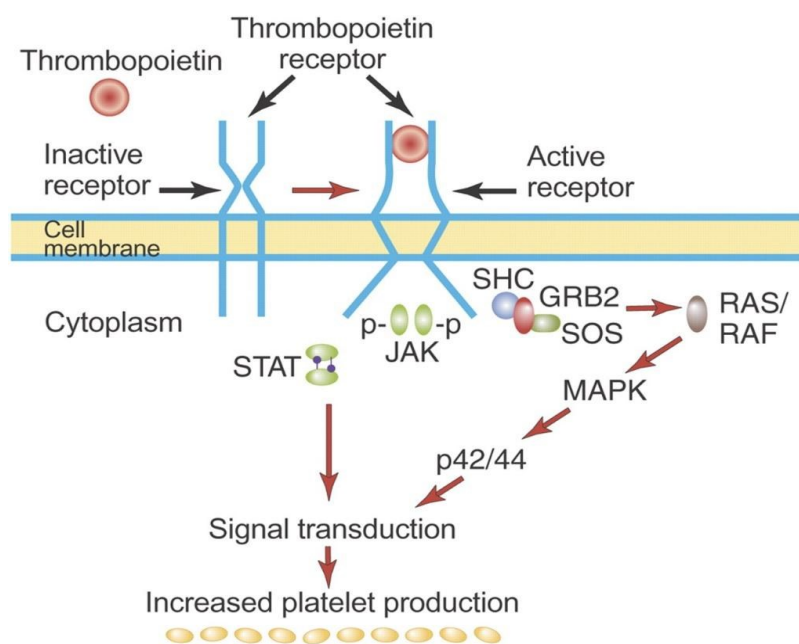
Většina signalizačních molekul se nalézá v extracelulárním prostoru a váže se na transmembránové receptory buněk. Ligand, který se naváže na extrabuněčnou doménu receptoru, způsobí konformační změnu ve vnitřní doméně, což stimuluje enzymovou aktivitu. V případě receptorových kináz tato konformační změna aktivuje kinázovou aktivitu, která je buď integrální pro receptor, nebo integrální pro protein, který je s receptorem sdružen. Toto jako první způsobí fosforylaci receptoru a poté umožní fosforylovat a aktivovat ostatní proteiny v buňce. Cílovými proteiny jsou často také kinázy, které dále fosforylují další proteiny. Nakonec, tato kaskáda kinázové aktivity dospěje k transkripčnímu faktoru, který je aktivován nebo inhibován jako důsledek změny genové exprese (obr. 5).

V některých případech je tato signalizační kaskáda krátká (např. JAK/STAT signalizace), zatímco v jiných případech je součástí kaskády mnoho kroků (Strachan a Read, 2004).



Obr. 6 - JAK/STAT signalizace (převzato a upraveno - <https://courses.washington.edu/conj/bess/jakstat/>)

JAK a STAT tvoří cestu, která je jednou z pleiotropních kaskád používaných pro převod mnoha signálů při vývoji živočichů a udržování homeostázy. JAK aktivace stimuluje buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci, ale i apoptózu. Tyto buněčné procesy jsou nezbytné pro hematopoézu, vývoj imunitního systému, prsní žlázy a laktace, adipogenezi, pohlavní vývoj a řadu dalších procesů. Dle očekávání, mutace snižující aktivitu JAK/STAT signalizace ovlivňují tyto procesy. Naopak, mutace, které neustále aktivují nebo správně neregulují JAK signalizaci, způsobují zánětlivá onemocnění, erytrocytózu, gigantismus a celou řadu leukémií (Rawlings a kol., 2004).



Obr. 7 – Interakce mezi trombopoietinovým receptorem a JAK/STAT signalizací (převzato a upraveno - <http://www.bloodjournal.org/content/109/11/4607?sso-checked=true>)

2.8. Incidence (výskyt) mutací u pacientů s MPN

Objevení mutace genu JAK2 V617F v roce 2005 kompletně změnilo pohled pro stanovení diagnózy a přístupu k léčbě MPN. JAK2 V617F mutace je prokázána zhruba u 97 % pacientů s PV a u 60 % pacientů s ET nebo s PMF. Rozdíl mezi klonální (neoplastickou) a reaktivní (sekundární) byl podpořen objevením mutací exonu 12 v JAK2 u většiny pacientů s PV, kteří byli JAK2 V617F-negativní, a identifikace MPL mutací u 10-20 % pacientů s ET, kteří byli také JAK2 V617F-negativní. Teoreticky vzato, všichni pacienti s PV mohou být nyní identifikováni přítomností mutace JAK2, kde zhruba 30 % pacientů s ET nebo PMF nemělo prokázáný klonální marker, což znamená, že byli negativní jak pro JAK2, tak pro MPL mutaci (Gong a kol., 2013; Pardanani a kol., 2007).

Přibližně u 50 % pacientů s ET a PMF nebyla prokázána JAK2 V617F mutace. A až 5 % z těchto pacientů má MPL mutaci exonu 10, ale testování pro MPL mutace není rutinním postupem, jako je to v případě JAK2. Získané mutace v exonu 10 MPL byly popsány u 3-4 % případů s ET a 4-8 % případů s PMF, ale ne s PV. Menšina těchto pacientů měla jak mutaci JAK2 V617F, tak i mutaci MPL (Boyd a kol., 2010).

MPL mutace v exonu 10 mají výrazný klinický fenotyp, pacienti mají tendenci být více anemičtí. Pacienti trpící ET a mající MPL mutace mají také vyšší počet trombocytů

a ojedinělou megakaryocytární proliferaci v porovnání s JAK2 V617F pozitivními ET pacienty (Boyd a kol., 2010).

2.9. Diagnostika MPN

Klasifikace MPN WHO z roku 2008 zahrnuje JAK2 mutace jako diagnostické kritérium u PV a JAK2 a MPL mutace u ET a PMF. Určení diagnózy PV může být stanoveno na základě detekce mutace JAK2 V617F nebo mutace v exonu 12, spolu s nálezem zvýšené hodnoty hemoglobinu a nízké nebo normální hodnoty EPO (obr. 8), (Gong a kol., 2013).

Pokud je detekce mutací JAK2 V617F a MPL prokázána, znamená to potvrzení diagnózy pro ET a PMF, ale nepřítomnost mutací neznamená vyloučení těchto onemocnění. Tyto mutace nejsou naprosto specifické pro MPN, jejich nález nezaručuje diagnostikování MPN (Gong a kol., 2013).

Analýza mutace MPL není indikována v případě podezření na PV, protože u tohoto onemocnění nebyla tato mutace popsána. Vyšetření je nejlepší naordinovat po zhodnocení biopsie kostní dřeně. Pokud je zvažována diagnóza PMF nebo ET, podle kritérií WHO by měla analýza MPL následovat po negativním výsledku JAK2 V617F mutace (Gong a kol., 2013).

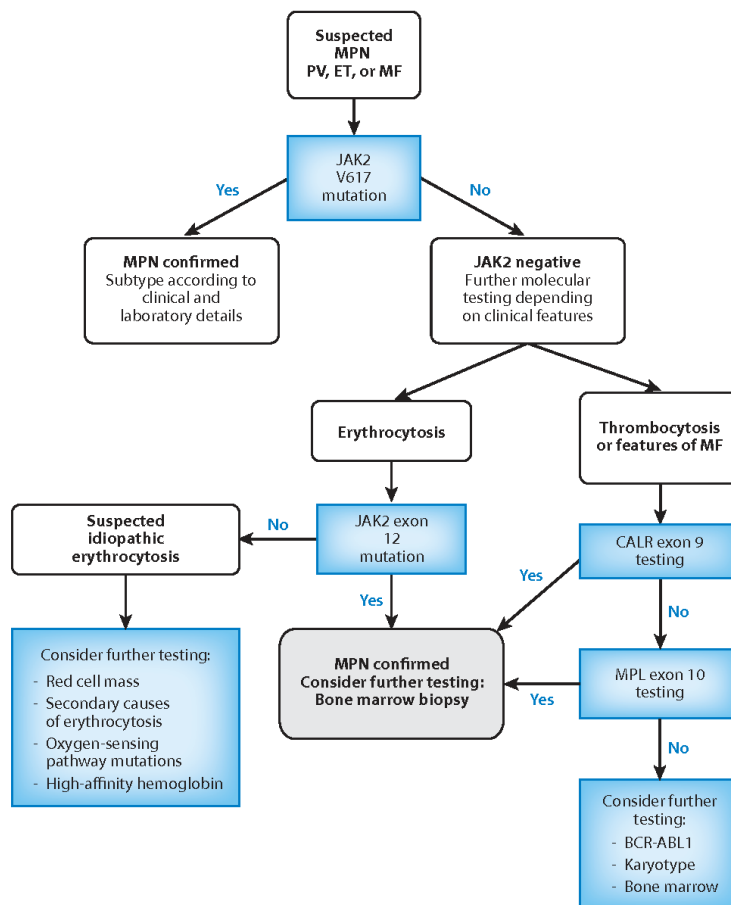


Figure 7

Diagnostic clinical algorithm including molecular testing for MPNs. Abbreviations: ET, essential thrombocythemia; JAK2, janus kinase 2; MF, myelofibrosis; MPN, myeloproliferative neoplasm; PV, polycythemia vera.

Obr. 8 - Algoritmus při diagnostice MPN (převzato a upraveno - <https://www.semanticscholar.org/paper/Pathogenesis-of-Myeloproliferative-Disorders.-Nangalia-Grinfeld/889ffe0563197a3ae35a4e4f6432bb95d0037e4a/figure/5>)

3. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat a zavést vyšetřovací laboratorní postupy pro stanovení mutací v MPL genu na pracovišti molekulární genetiky Krajské nemocnice Liberec, a.s.

4. Metodická část

4.1. Detekce mutace W515L(K) v genu MPL metodou real-time PCR na pracovišti molekulární genetiky v KNL, a.s.

V naší laboratoři provádíme detekci jednobodové mutace W515L(K) v MPL genu metodou PCR za použití specifických primerů a fluorescenčních sond. Fluorescence emitovaná v průběhu real-time PCR reakce je snímána pomocí CCD kamery. Vyhodnocení přítomnosti mutace probíhá hodnocením křivky tání. Pokud je přítomna mutace, neshoda specifické sondy s cílovou DNA způsobuje sníženou stabilitu produktu, což vede k poklesu fluorescence při nižších teplotách. Pokud není přítomna mutace k neshodě mezi sondou a DNA nedojde, a proto má tato dsDNA vyšší stabilitu a tím i teplotu tání.

Vlastní analýzu provádíme z DNA izolované z granulocytů, které separujeme z periferní nesrážlivé krve metodou gradientové centrifugace pomocí gradientu vytvořeného kombinací dvou různých roztoků Histopaque 1077 a Histopaque 1119 (Sigma). DNA ze separovaných granulocytů je izolována pomocí komerčního kitu High Pure PCR Template Kit (Roche). Koncentrace izolované DNA je změřena spektrofotometrem NanoDrop ND-2000 (NanoDrop technologies). PCR provádíme v přístroji LightCycler 2.0 (Roche) pomocí soupravy LC FastStart DNA Master HybProbe (Roche) s použitím směsi primerů a sond LightMix MPL W515L(K), (TIB MOLBIOL Berlín).

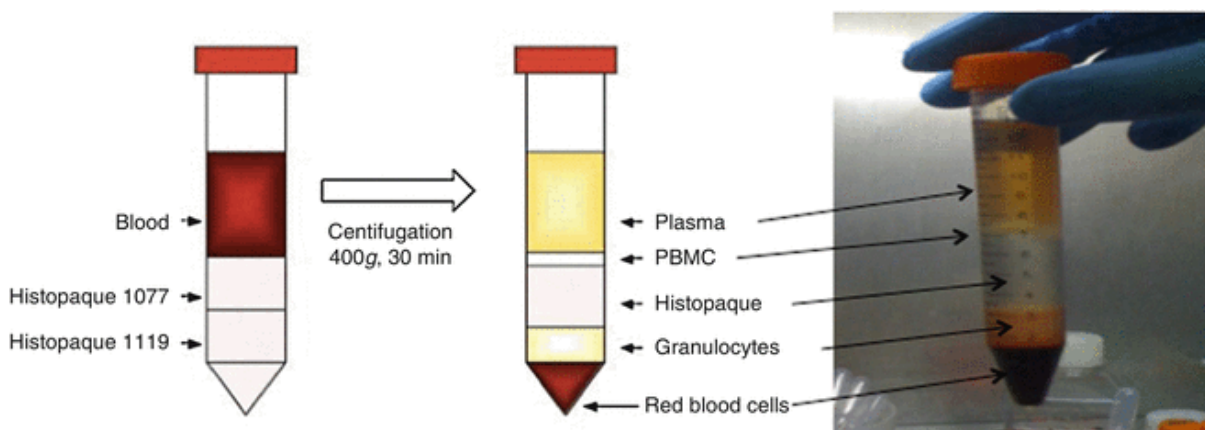
4.2. Biologický materiál

Výchozím materiálem pro vyšetření a diagnostiku MPL mutace je plná periferní nesrážlivá krev odebraná do zkumavky typu Vacutainer s K3EDTA. Akceptovatelná je i plná krev odebraná do zkumavky s citrátovým antikoaguliem. Nesrážlivá periferní krev je stabilní 2 dny při teplotě 4-8 °C a nesmí být vystavena teplu ani mrazu. Při delším skladování dochází k degradaci granulocytů a tím zvýšené pravděpodobnosti falešně negativního výsledku.

4.3. Izolace granulocytů z plné nesrážlivé krve metodou gradientové centrifugace

4.3.1. Princip metody

Separace krevních elementů pomocí gradientové centrifugace je velmi jednoduchá metoda. Spočívá v navrstvení nesrážlivé krve na separační gradient Histopaque s následnou centrifugací. Během centrifugace dojde k typickému rozdělení buněk podle jejich hustoty. V případě použití dvojitého gradientu Histopaque-1077 a Histopaque-1119 se po centrifugaci buňky granulocytární řady nalézají v interfázi 1077/1119, buňky mononukleární a destičky v interfázi plazma/1077 (obr. 9).



Obr. 9 – Výsledek centrifugace pro získání jednotlivých frakcí (převzato a upraveno - https://media.springernature.com/original/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-1-4939-1396-1_9/MediaObjects/300999_1_En_9_Fig2_HTML.gif)

4.3.2. Pracovní postup

1. Do sterilní zkumavky jsem napipetovala 3 ml Histopaque 1119.
2. Opatrně jsem navrstvila 3 ml Histopaque 1077.
3. Opatrně jsem navrstvila 2 ml krve.
4. Zkumavku s navrstvenými roztoky jsem centrifugovala 30 minut (min.) při 700 g při laboratorní teplotě.
5. Odpipetovala jsem horní vrstvu plazmy a vrstvu v interfázi plazma/1077 obsahující mononukleární buňky a trombocyty.

6. Do nové sterilní zkumavky jsem poté odpipetovala vrstvu granulocytů a přidala 10 ml PBS-NaCl pufru. Zkumavku s granulocytami jsem centrifugovala 10 min. při 200 g při laboratorní teplotě.
7. Po centrifugaci jsem odsála supernatant a k peletě přidala znovu 10 ml PBS-NaCl pufru, ve kterém jsem buňky resuspendovala. Tento postup jsem dvakrát opakovala.
8. Po posledním promytí jsem odstranila supernatant a přidala dalších 200 μ l PBS-NaCl pufru, buňky resuspendovala a získané granulocyty pipetovala do nové 1,5 ml PCR zkumavky. Celkový objem resuspendovaných granulocytů se pohyboval v rozmezí 400-500 μ l.

4.4. Kolonková izolace DNA

4.4.1. Princip metody

Pomocí High Pure PCR Template kitu je izolována genomová lidská DNA z plně nesrážlivé krve bez nutnosti separace leukocytů. Tato metoda je vhodná i pro izolaci DNA ze získané granulocytární frakce. Ve výchozím vzorku krve jsou nejprve lyzovány granulocyty a lyzát je poté separován na kolonkách. Genomová DNA je adsorbována na membránu kolonky, několikrát promyta a poté eluována z membrány kolonky do roztoku.

4.4.2. Pracovní postup

1. Do 1,5 ml zkumavky jsem postupně pipetovala 200 μ l suspenze granulocytů, 200 μ l binding bufferu a 40 μ l proteinasy K.
2. Ihned jsem směs promíchala a inkubovala 10 min. při 70 °C.
3. Krátce jsem směs zcentrifugovala v mikrocentrifuze (2 sekundy), poté přidala 100 μ l isopropanolu a důkladně promíchala. Opět jsem centrifugovala v mikrocentrifuze 2 sekundy (s).
4. Vše jsem pipetovala do kolonky vložené do sběrné zkumavky a centrifugovala 1 min. při 8000 g a poté umístila kolonku do nové sběrné kolonky.
5. Do kolonky jsem napipetovala 500 μ l Inhibition Removal bufferu.
6. Centrifugovala jsem 1 min. při 8000 g a poté kolonku umístila do nové sběrné zkumavky.
7. Do kolonky jsem napipetovala 500 μ l wash bufferu.

8. Centrifugovala jsem 1 min. při 8000 g a poté umístila kolonku do nové sběrné zkumavky.
9. Do kolonky jsem napipetovala 500 μ l wash bufferu.
10. Centrifugovala jsem 1 min. při 8000 g, poté vylila filtrát a kolonku nechala v použité sběrné zkumavce.
12. Centrifugovala jsem kolonku dalších 10 sekund při 20 000 g, aby došlo k vysušení membrány kolonky. Kolonku jsem umístila do mikrozukavky (typ Eppendorf), přidala jsem 100 μ l temperovaného elution bufferu a počkala 1 min.
13. Centrifugovala jsem 1 min. při 8000 g a poté v eluátu stanovila koncentraci DNA na spektrofotometru.

Eluovaná DNA je stabilní při teplotě 4-8 °C 7 dní, při teplotě -20 °C (\pm 5 °C) jeden rok a při -80 °C (\pm 5 °C) několik let.

4.5. REAL-TIME PCR

4.5.1. Princip metody

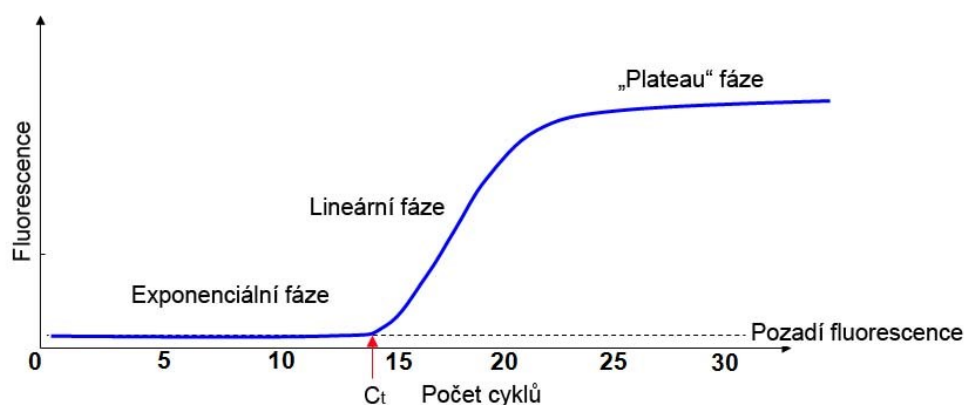
Metoda real-time PCR je založena na klasické PCR a probíhá v termocykleru s přidanou CCD kamerou. Ta v průběhu PCR kontinuálně, tedy během každého cyklu, zaznamenává množství nově vznikajících kopií PCR produktu. U této techniky se do reakční směsi přidávají buď interkalační barvy schopné fluorescence (SYBR Green) nebo fluorescenční sondy (duální hybridizační sondy, molecular beacons, eclipse sondy a jiné), které během PCR hybridizují k řetězcům vznikajících amplikonů. K emisi fluorescenčního záření dochází, pouze pokud je v reakčním prostředí amplifikován PCR produkt. Nárůst fluorescence vykazuje charakter esovité křivky, typické pro PCR. Tvorbu produktů lze sledovat na monitoru v průběhu reakce v reálném čase (obr. 10), (Beránek, 2016).

Termocykler musí obsahovat zdroj záření (LED, xenonová lampa nebo laser) a detektor (CCD kamera nebo fotonásobič), který zaznamená fluorescenci jako počet dopadajících fotonů. Zahřívacím zdrojem je topná spirála nebo halogenová lampa. Chlazení pak probíhá pomocí nasávání vzduchu z okolí (Beránek, 2016).

LightCycler je jeden z nejrychlejších, vzduchem ohříváných termocyklerů se zabudovaným mikroobjemovým fluorimetrem pro detekci i kvantifikaci amplifikovaných produktů a dále k následnému vyhodnocení namnožených PCR produktů analýzou křivky tání.

Amplifikované produkty se hromadí ve skleněných kapilárách a jejich detekce se provádí pomocí fluorescenčního dsDNA vázajícího se barviva nebo fluorescenční sondy. LightCycler umožňuje sledování emise fluorescenčního záření pomocí šestikanálového fotometru při šesti různých vlnových délkách (530 nm, 555 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm a 705 nm). Signály se z jednotlivých detekčních kanálů přenášejí do fotohybridu k závěrečnému vyhodnocení. Objem kapilár je přizpůsoben požadavkům dnešní doby a je tedy možné použít vzorky o objemu od 20 do 100 μ l. Reakční směs se v našem případě pipetuje do skleněných kapilár 10-20 μ l. Obvyklý amplifikační cyklus trvá 30-60 s, takže celý proces trvá méně než 45 minut.

V průběhu amplifikačního cyklu dochází nejdříve za zvýšené teploty k denaturaci DNA, během které se rozdělí dsDNA na ssDNA. Poté dojde k ochlazení a přítomné primery hybridizují s DNA (annealing) a následně dojde k vytvoření nových řetězců DNA (elongace).



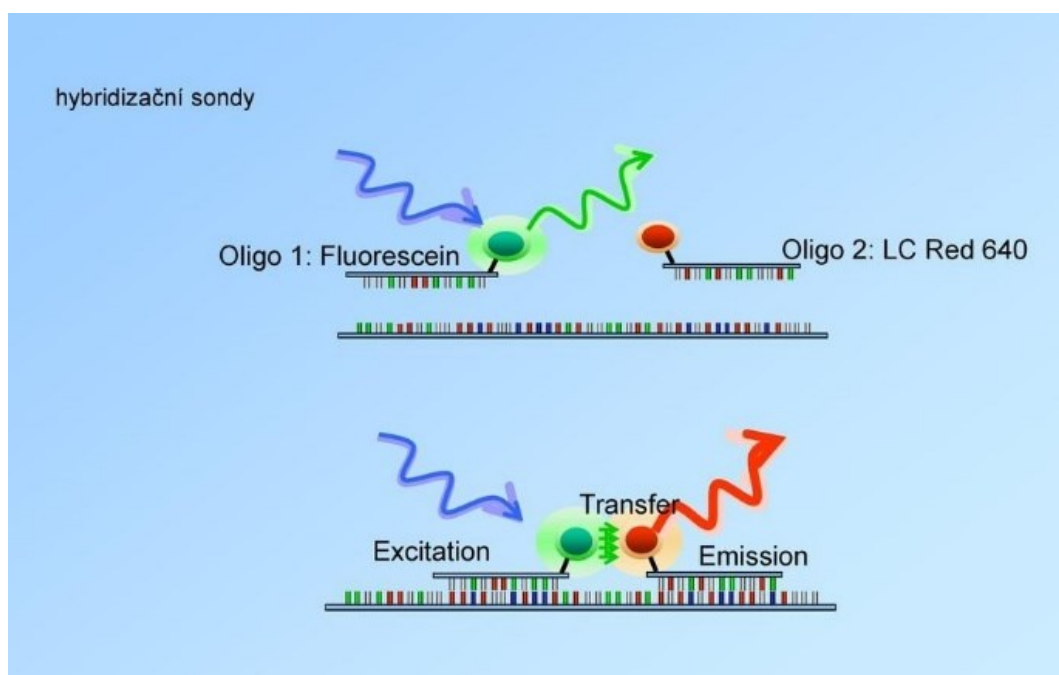
Obr. 10 – Průběh real-time PCR (převzato a upraveno - <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>)

4.5.2. Hybridizační FRET sondy

FRET sondy jsou hybridizační fluorescenční sondy používané vždy ve dvojici. Každá z nich je komplementární k určitému úseku cílové DNA. Tyto úseky jsou blízko sebe, obvykle s mezerou o velikosti dvou nukleotidů. Detekční sonda je na 3'-konci značena fluoresceinem, což je donor záření. Kotvící sonda je na 5'-konci značena specifickým fluoroforem, který je

akceptorem záření. Sondy jsou na 3'-konci fosforylovány, aby nedocházelo k jejich prodlužování během PCR (obr. 11), (roche-diagnostics.cz).

Fluorescence vzniká pomocí FRET principu (rezonanční přenos energie), působícího na velmi krátkou vzdálenost. Pokud jsou sondy v reakčním prostředí bez templátové DNA, k přenosu energie prakticky nedochází. V případě přítomnosti DNA dochází zdrojem záření k excitaci elektronů donoru a energie je zachycena akceptorem. To vede k emisi záření, kterou zaznamená detektor (Beránek, 2016).



Obr. 11 – Princip FRET systému (převzato a upraveno - <https://docplayer.cz/amp/11179948-Metody-studia-genove-exprese.html>)

4.5.3. Pracovní postup

Před samotnou analýzou jsem si podle návodu stanoveného výrobcem připravila mastermix LC FastStart DNA Master HybProbe a LightMix MPL W515L(K).

Sekvence forward primeru (MPL F) je 5'-TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT-3' a sekvence reverse primeru (MPL R) je 5'-ACAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT-3'. Primery a sondy jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Takto musí být uchovány v lednici při teplotě 4-8 °C a po rozpuštění se zamrazí na -20 °C (± 5°C). Je nutné je chránit před světlem. Sekvence detekční sondy (sensor G) je 5'-CTGCCACCTCAGCAGCA--FL-3'. Sekvence kotvící sondy (anchor) je 5'-LC640-AGGCCCAGGACGGCG--PH-3'.

Každá analytická série musí obsahovat pozitivní kontrolu (vzorek s detekovanou mutací) a negativní kontrolu (vzorek bez přidané DNA pro vyloučení případné kontaminace).

Výsledky stanovení vzorků i kontrol musí být jednoznačné a přiřaditelné ke genotypu přirozeného typu (wild-type), heterozygotního nebo mutovaného homozygotního typu. V případě diskrepancí musí být stanovení opakováno a další postup je nutné konzultovat s klinickým bioanalytikem.

1. Do předchlazených adaptérů jsem umístila kapiláry pro každý vzorek a pro pozitivní a negativní kontrolu.
2. Podle pipetovacího protokolu jsem si připravila reakční mix (tab. 1).
3. Připravený mix jsem zcentrifugovala v mikrocentrifuze.
4. Opatrně jsem resuspendovala mix špičkou.
5. Do každé kapiláry jsem napipetovala 7,5 μ l reakčního mixu.
6. Do kapiláry v pozici 1 jsem přidala 2,5 μ l negativní kontroly.
7. Do kapiláry v pozici 2 jsem přidala 2,5 μ l pozitivní kontroly.
8. Do kapiláry v pozici 3 a výše jsem přidala 2,5 μ l izolované DNA.
9. Každou kapiláru jsem zazátkovala.
10. Kapiláry jsem zcentrifugovala v centrifugačních adaptérech.
11. Podle odpovídajících pozic jsem umístila jednotlivé kapiláry do kotouče a přenesla ho do LightCycleru.
12. Vzorky jsem nechala analyzovat podle přednastaveného programu (tab. 2).
Pro analýzu vzorků jsem vyzkoušela více teplotních profilů, ale pouze tento poskytoval relevantní výsledky.

Pracovní roztoky	Objem na reakci
Voda	5,2 μ l
MgCl ₂	0,8 μ l
LightMix MPL	0,5 μ l
MasterMix 1	1 μ l
Celkový objem	7,5 μl

Tab. 1 – Pipetovací protokol pro přípravu reakčního mixu

Fáze	Čas	Teplota	Počet cyklů
Denaturace	10 min	95 °C	1
Amplifikace			45
Denaturace	10 s	95 °C	
Annealing	10 s	60 °C	
Elongace	15 s	72 °C	
Křivka tání			
Denaturace		95 °C	1
	Kontinuální zvedání teploty	40 °C	
		85 °C	
Chlazení		20 °C	

Tab. 2 - Rozpis zvolených teplot, časů a cyklů pro PCR

5. Výsledky

5.1. Detekce a interpretace

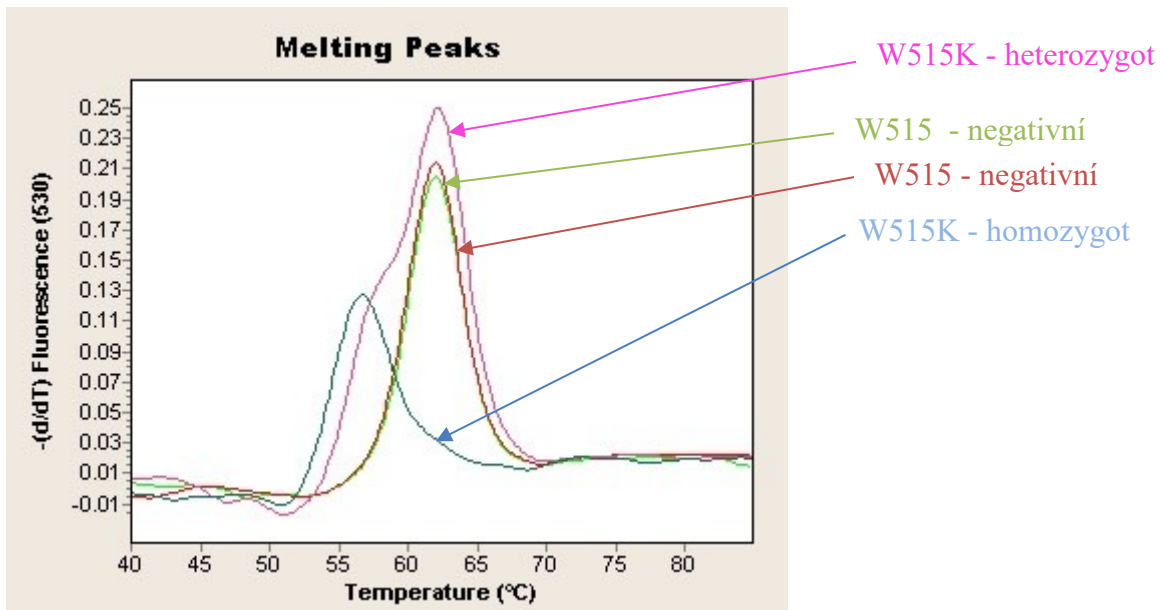
Po amplifikaci v LightCycleru jsem u všech vzorků provedla analýzu křivky tání pomocí analyzačního softwaru (obr. 12, 13, 14). Analýza křivky jednotlivých vzorků musí odpovídat konkrétním případům, uvedeným v tabulce 3. Výsledek vyšetření se vydává jako slovní hodnocení se závěrem přítomnosti či nepřítomnosti mutace, samozřejmě s konkretizací, zda se jedná o přítomnost homozygotní nebo heterozygotní formy. Hodnota cut-off pro přítomnost mutace je 5 % granulocytů s mutací W515L(K) v heterozygotní konstituci.

MPL W515L(K)	Počet vrcholů tání	T _m vrcholu tání	
NEGATIVNÍ 515W	1	62 °C	Pouze signál pro wild type alelu
HRANIČNÍ (šedá zóna) W515L	2	66 °C a 62 °C	Intenzita signálu při 66 °C nepřesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku cut-off
POZITIVNÍ W515L, heterozygotní forma	2	66 °C a 62 °C	Intenzita signálu při 66 °C přesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku cut-off
POZITIVNÍ W515L, homozygotní forma	1 nebo 2	66 °C nebo 62 °C a 66 °C	Intenzita signálu při 66 °C přesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku heterozygot
HRANIČNÍ (šedá zóna) W515K	2	58 °C a 62°C	Intenzita signálu při 58 °C nepřesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku cut-off
POZITIVNÍ W515L, heterozygotní forma	2	58 °C a 62°C	Intenzita signálu při 58°C přesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku cut-off
POZITIVNÍ W515L, homozygotní forma	1 nebo 2	58 °C nebo 58 °C a 66°C	Intenzita signálu při 58 °C přesahuje intenzitu signálu kontrolního vzorku heterozygot

Tab. 3 – Systém vyhodnocování jednotlivých vzorků

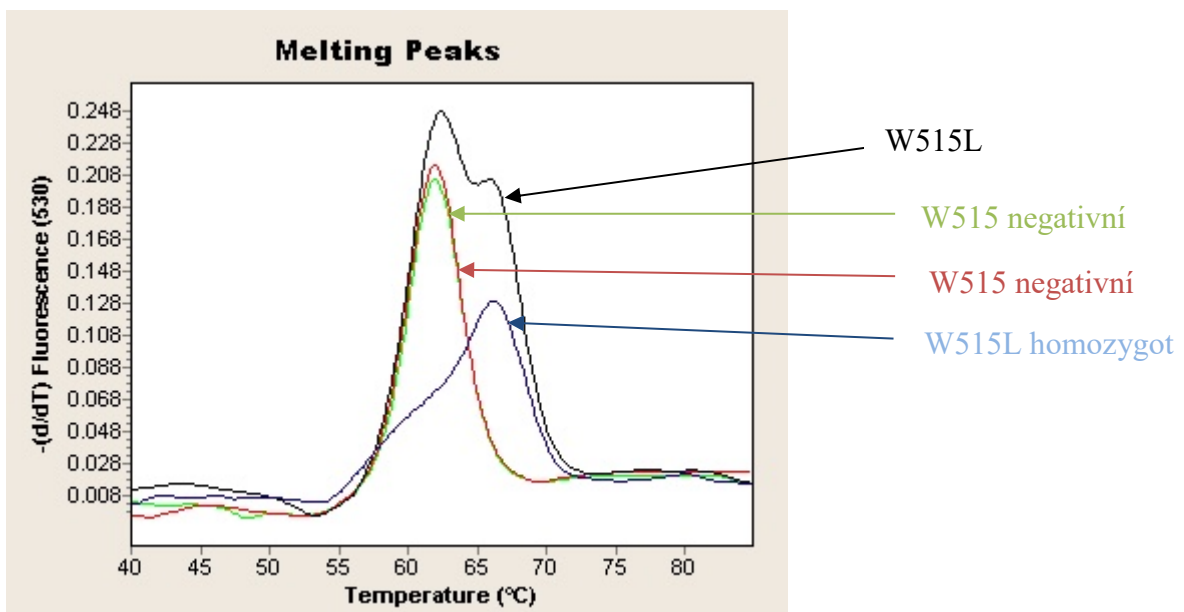
Vyhodnocení – T_m calling, při 530 nm (tab. 3 a obr. 12, 13, 14). Následující obrázky konkrétně ukazují, jak probíhá detekce jednotlivých mutací. Z obrázků je patrné, že dochází k jasnému odlišení jednotlivých variant, a to jak pro homozygotní, tak i pro heterozygotní formy. Při zavádění metody jsem testovala kontrolní vzorky, vzorky od pacientů, které by nesly

mutace, nebyly k dispozici. Testování jsem prováděla i u ředící řady vzorků, tak abych si byla jistá citlivostí detekce.



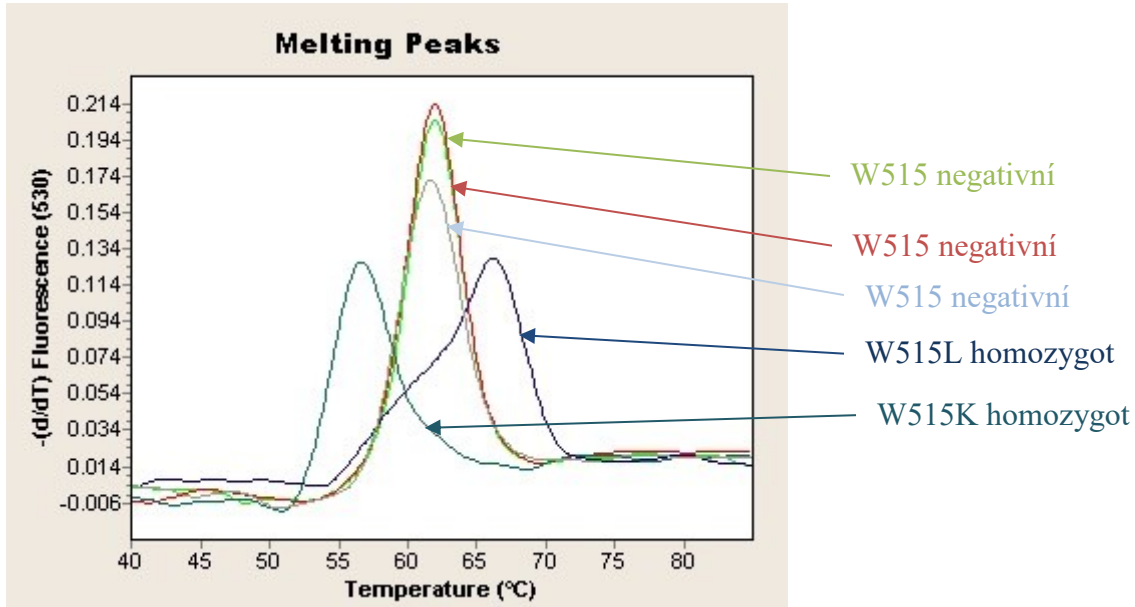
Obr. 12 - Detekce mutace W515K

Obrázek 12 zobrazuje detekci mutace W515K. Obě homozygotní formy jsou velice zřetelně rozlišitelné, heterozygotní forma má též svůj typický tvar křivky.



Obr. 13 – Detekce mutace W515L

Obrázek 13 zobrazuje detekci mutace W515L. Stejně jako v předchozím případě mají obě homozygotní formy zřetelně rozlišitelné průběhy. I heterozygotní forma má typický tvar křivky.



Obr. 14 – Detekce homozygotů pro jednotlivé varianty

Obrázek 14 zobrazuje pouze homozygotní formy všech tří možných detekcí. Je zde velmi pěkně vidět jasné odlišení jednotlivých variant.

Z klinické praxe testování jiných somatických mutací (např. V617F v genu JAK2) víme, že léčba může ovlivnit kvalitu získané DNA a testování je v některých případech nutné opakovat. Výsledky se vydávají pouze v případě jasného průběhu, a tedy jasného vyhodnocení přítomnosti mutace.

6. Závěr

Myeloproliferativní onemocnění jsou vzácná, ale závažná onemocnění. Jejich včasná a přesná diagnostika je důležitou součástí pro zahájení potřebné léčby. I když existuje mezinárodní klasifikace pro rozčlenění těchto chorob, ne vždy se dají jednoznačně rozlišit a mohou se vzájemně překrývat.

MPL gen kóduje receptor pro trombopoetin, který je nedílnou součástí pro správnou funkci krevního systému. Pokud je tedy postižen případnou mutací, odrazí se to i na funkci příslušných krevních buněk. MPL mutace se vyskytují zejména u esenciální trombocytémie a primární myelofibrózy.

Molekulárně genetická diagnostika je jednou z hlavních technik, jak dosáhnout přesné diagnózy a začlenit pacienta do správné skupiny onemocnění.

Na našem pracovišti molekulární genetiky Krajské nemocnice v Liberci, a.s. jsem tedy zavedla metodu, díky které jsme nyní schopni vyšetřovat mutaci v MPL genu výše popsanými laboratorními technikami.

7. Seznam použité literatury

7.1. Literární zdroje a prameny

1. STRACHAN, T. a Andrew P. READ. *Human molecular genetics 3*. 3rd ed. New York: Garland Press, c2004. ISBN 08-153-4184-9.
2. BOYD, Elaine M., Anthony J. BENCH, Andrea GODAY-FERNÁNDEZ, et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *British Journal of Haematology*. 2010, 149(2), 250-257.
3. AKPINAR, Timur Selçuk, Veysel Sabri HANÇER, Meliha NALÇACI, et al. MPL W515L/K Mutations in Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Turkish Journal of Hematology*. 2013, 30(1), 8-12.
4. GONG, Jerald Z., James R. COOK, Timothy C. GREINER, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013, 15(6), 733-744.
5. NG, A. P., M. KAUPPI, D. METCALF, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(16), 5884-5889.
6. FURTADO, Larissa V., Helmut C. WEIGELIN, Kojo S. J. ELENITOBA-JOHNSON, et al. Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013, 15(6), 810-818.
7. VAINCHENKER, W., F. DELHOMMEAU, S. N. CONSTANTINESCU, et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Blood*. 2011, 118(7), 1723-1735.
8. RAWLINGS, J. S., Viktor FERUS, S. N. CONSTANTINESCU, et al. The JAK/STAT signaling pathway: katalóg expozície otvorenej pri príležitosti 700. výročia udelenia mestských privilégii Ondrejom III. : [Bratislava, 1991. *Journal of Cell Science*. 2004, 1991, 117(8), 1281-1283.
9. DRACHMAN, Jonathan G., James D. GRIFFIN a Kenneth KAUSHANSKY. The c-Mpl Ligand (Thrombopoietin) Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Jak2,

- Shc, and c-Mpl. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, 270(10), 4979-4982 [cit. 2020-05-04].
10. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
 11. TEFFERI, Ayalew, Juergen THIELE a James W. VARDIMAN. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer* [online]. 2009, 115(17), 3842-3847 [cit. 2020-05-14]. ISSN 0008543X.
 12. SKODA, Radek C. Thrombocytosis. *American society of hematology*. 2009, 159-167.
 13. GERMESHAUSEN, Manuela, Matthias BALLMAIER a Karl WELTE. MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Human Mutation* [online]. 2006, 27(3), 296-296 [cit. 2020-05-13]. ISSN 1059-7794.
 14. PARDANANI, A, T L LASHO, C FINKE, C A HANSON a A TEFFERI. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* [online]. 2007, 21(9), 1960-1963 [cit. 2020-05-14]. ISSN 0887-6924.

7.2. Internetové zdroje a prameny

1. www.linkos.cz
2. www.labguide.cz
3. www.roche-diagnostics.cz

8. Seznam použitých zkratek

AMK - aminokyselina

AML – akutní myeloidní leukémie

CALR - kalretikulín

CAMT – kongenitální amegakaryocytární trombocytopenie

CCD – charge-coupled device, CCD kamera

CD 110 – cluster of differentiation, CD znak

CEL-NOS – chronická eozinofilní leukémie - nespecifikována jinak

CML – chronická myeloidní leukémie

CNL – chronická neutrofilní leukémie

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – double-stranded DNA, dvouvláková DNA

ET – esenciální trombocytémie

FRET – fluorescence resonance energy transfer, rezonanční přenos energie

G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor, růstový faktor pro granulocyty

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, růstový faktor pro granulocyty a makrofágy

HSC – hematopoietic stem cells, hematopoetické kmenové buňky

IL3 – interleukin 3

JAK2 – Janusova kináza 2

K3EDTA – tridraselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové

LED – light-emitting diode, světelná dioda

MDS – myelodysplastický syndrom

MPLV – myeloproliferative leukemia virus, virus myeloproliferativní leukémie

MPN – myeloproliferativní neoplázie

MPO – myeloproliferativní onemocnění

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PMF – primární myelofibróza

PV – polycythaemia vera, pravá polycytémie

STAT – signal transducers and activators of transcription, přenašeče signálů a transkripční faktory

STAT3, STAT5 – proteiny za skupiny STAT

TPO - trombopoetin

WHO – world health organization, světová zdravotnická organizace