



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00867

(22) Data de depozit: 05.09.2011

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• GENETIC CENTER SRL, STR. CRIȘAN
NR. 9, FLOREȘTI, CJ, RO

(72) Inventatori:
• TRIFA ADRIAN PAVEL, STR. METEOR
NR. 8, AP. 2, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POPP RADU ANGHEL, STR. HAȚEG
NR. 4, AP. 28, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(74) Mandatar:
CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL,
STR. MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E,
AP. 2, CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ

(54) **METODĂ DE INVESTIGARE A PREDISPOZIȚIEI GENETICE
PENTRU DEZVOLTAREA NEOPLASMELOR MIELOPROLI-
FERATIVE JAK2 V617F-POZITIVE, BAZATĂ PE STUDIUL
SNP-ULUI JAK2 RS10974944**

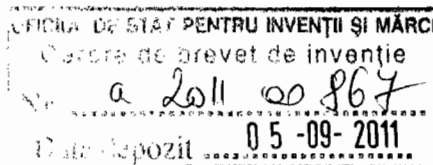
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o metodă de investigare a neoplasmelor mieloproliferative, bazată pe studiul SNP-ului JAK2 rs10974944, pe baza unor analize genetice. Metoda presupune extracția de ADN genomic, selecția primerilor și amplificarea prin PCR a unui fragment genomic din gena JAK2, conținând SNP-ul

rs10974944, urmată de digestia enzimatică a ampiconilor cu enzima de restricție MboI, electroforeza în gel de agaroză și identificarea precisă a genotipurilor, prin analiza polimorfismului fragmentelor de restricție.

Revendicări: 3





Metodă de investigare a predispoziției genetice pentru dezvoltarea neoplasmelor mieloproliferative *JAK2* V617F-pozitive, bazată pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944

Invenția se referă la o metodă de investigare a neoplasmelor mieloproliferative bazată pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, cu aplicații în diagnosticarea unor boli hematologice, pe baza unor analize genetice.

Policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE) și mielofibroza primară (MP) reprezintă cele 3 neoplasme mieloproliferative (NMP) clasice, negative pentru fuziunea *Bcr-Abl*. Din același grup de boli face parte și leucemia mieloidă cronică (LMC), în care elementul determinant pentru stabilirea diagnosticului corect, este reprezentat de către demonstrarea cromosomului Philadelphia și/sau a echivalentului său molecular, respectiv transcriptul hibrid rezultat din fuziunea genelor *Bcr* și *Abl*. Conform ultimei clasificări OMS a NMP, din 2008, din același grup de boli mai fac parte și alți reprezentanți: leucemia cronică cu neutrofile, leucemia cronică cu eosinofile, sindromul hipereosinofilic, mastocitoza sistemică și alte NMP neîncadrabile (Tefferi și Vardiman, 2008). Cu excepția "NMP neîncadrabile", toate aceste entități sunt mult mai rare decât PV, TE, MP și LMC. Se acceptă o incidență de 1/20.000-1/50.000/an pentru PV și TE, în vreme ce incidența MP este mai redusă. Probabil însă că frecvența reală este mai mare, deoarece o parte din pacienți rămân complet asimptomatici, descoperindu-se eventual întâmplător o poliglobulie, trombocitoză sau leucocitoză ușoare, care nu sunt investigate ulterior într-un serviciu de hematologie. Acest lucru este valabil în special pentru TE, și mai rar pentru PV, MP fiind însă întotdeauna simptomatică. Interesantă este distribuția pe sexe a celor 3 boli; PV apare într-un raport de 2/1 în favoarea sexului masculin, în vreme ce distribuția în TE este de 2/1 în favoarea sexului feminin; MP nu cunoaște diferențe în ceea ce privește distribuția în funcție de sex a pacienților. Cât despre vârsta de debut a celor 3 boli, deși există și pacienți tineri, cu vârsta sub 20-30 de ani, majoritatea pacienților au o vârstă de peste 50 de ani în momentul diagnosticului.

Elementul-cheie al PV, TE și MP este reprezentat de proliferarea necontrolată a cel puțin unei linii celulare mieloide (eritroidă, megakarioblastică sau granulocitară), cu un exces de celularitate la nivelul populației medulare mieloide; de asemenea, se constată creșterea numărului de elemente sanguine periferice derivate din linia mieloidă hiperplazică. Este de notat faptul că aceste elemente din periferie, crescute numeric, sunt de regulă mature (Jones et al, 2005).

PV se caracterizează în mod primar prin hiperplazia liniei mieloide eritroide, dar frecvent și liniile megakarioblastică și granulocitară sunt mai mult sau mai puțin hiperplazice. Criteriile majore hematologice de diagnostic al PV sunt: hemoglobina > 18.5 g/dl (pentru sexul masculin), respectiv >16.5 g/dl (pentru sexul feminin) sau valori ale hemoglobinei și/sau hematocritului mai mari decât percentila a 99-a corespunzătoare vârstei, sexului și altitudinii, și masa celulară roșie mai mare cu cel puțin 25% față de valorile medii precise corespunzătoare vârstei, sexului și altitudinii. Există și trei criterii minore, și anume: proliferarea medulară a tuturor celor 3 linii mieloide, valori plasmatică scăzute ale eritropoetinei și creșterea coloniilor progenitorilor eritroizi, independent de eritropoetină (Tefferi și Vardiman, 2008).

TE se caracterizează în primul rând prin hiperplazia liniei mieloide megakarioblastice și eventual a celei granulocitare, astfel încât criteriile hematologice majore de diagnostic sunt: valori ale plachetelor sanguine > 450.000/ μ l și hiperplazia medulară megakarioblastică, dar cu morfologie normală sau aproape normală, însoțită eventual de hiperplazie ușoară granulocitară și rar eritroidă (Tefferi și Vardiman, 2008).

MP cunoaște în evoluție 2 stadii: pre-fibrotic și fibrotic; criteriile hematologice și clinice majore de diagnostic sunt: proliferare de megakarioblaste, atipice de data aceasta, plus depozite de colagen și/sau reticulina (faza fibrotică); în faza pre-fibrotică se întâlnește hiperplazie de megakarioblaste atipice și granulocitară, și frecvent hipoplazie eritroidă; în această fază nu se întâlnesc depozite fibrotice. Criteriile minore de diagnostic sunt: tablou de leucoeritroblastoză, anemie, valori plasmatică crescute ale LDH și splenomegalie (Tefferi și Vardiman, 2008).

Frecvent însă diagnosticul diferențial între cele 3 entități este dificil, deoarece unele criterii de diagnostic se suprapun și mulți pacienți prezintă doar o parte din criterii în momentul luării în observație.

Deși William Dameshek, "părintele" clasificării afecțiunilor hematologice mieloide, a observat unele trăsături comune ale celor 3 boli, respectiv PV, TE și MP, în urmă cu mai bine de 50 de ani, fiind primul care le-a inclus în același grup de "sindroame mieloproliferative cronice" (Dameshek, 1951), totuși mecanismele care stau la baza apariției acestora au rămas obscure vreme de decenii. Deși s-a sperat că odată cu dezvoltarea tehnicilor citogenetice, vor putea fi demonstrate anomalii cromosomiale specifice PV, TE și MP, la fel cum s-a întâmplat în LMC, de exemplu, acest lucru nu s-a întâmplat. Deși 30-50% dintre pacienți pot prezenta diverse anomalii cromosomiale structurale și mai rar numerice, acestea nu sunt specifice pentru niciuna dintre

entități și nu par a avea în mod deosebit importanță în prognosticul pacienților (Kralovics et al, 2006).

Utilizarea unor metode de investigare bazate pe analiza genetică pentru studiul unor afecțiuni mieloproliferative a condus la obținerea unor rezultate remarcabile.

Un adevărat moment crucial în înțelegerea fiziopatologiei acestor boli este anul 2005, când mai multe echipe independente de cercetători au descoperit o mutație somatică punctiformă, la nivelul genei *JAK2*, care codifică Janus kinaza 2, respectiv g.2343G>T, mutație care prezice substituția unei valine cu o fenilalanină la nivelul rezidului aminoacil 617 al moleculei de *JAK2*, în domeniul său pseudo-kinazic (Kralovics et al, 2005; James C et al, 2005; Baxter et al, 2005; Levine et al, 2005). Gena *JAK2* se află la nivelul brațului scurt al cromosomului 9, regiune care se bănuia că are o anumită contribuție la apariția acestor boli. Echipele de cercetători au descoperit mutația *JAK2* V617F utilizând modele experimentale diferite; probabil cea mai elegantă metodă a fost folosită de echipa lui Kralovics; acesta a constatat că mulți pacienți cu PV, mai puțin frecvent cei cu MP și cel mai puțin frecvent cei cu TE, prezintă disomie uniparentală pentru cromosomul 9p, la nivelul celulelor progenitoare mieloide. În acel moment, fiind deja cunoscut faptul că gena ce codifică *JAK2* se află exact la nivelul 9p, echipa lui Kralovics a secvențat gena *JAK2* la pacienții respectivi, descoperind în acest fel că toți pacienții cu disomie uniparentală prezintă mutația *JAK2* V617F (Kralovics et al, 2005). Explicația disomiei uniparentale în aceste cazuri a fost logică: una dintre cele 2 alele *JAK2* dobândește spontan, aleator la nivelul unor progenitori mieloizi, mutația V617F; ulterior, prin fenomene de recombinare mitotică, și celălalt cromosom 9 va purta aceeași alelă mutantă, celulele respective fiind homozigote pentru mutația V617F. Alteori, una din cele 2 alele *JAK2* dobândește mutația V617F, iar brațul scurt al celuilalt cromozom suferă o deleție parțială sau totală, probabil pentru conferirea unui avantaj selectiv pe care îl are alela mutantă față de cea sălbatică. Aceste celule vor fi hemizigote pentru mutația *JAK2* V617F. Efectul este același în ambele cazuri. Însă, după cum a fost demonstrat ulterior, nu sunt necesare aceste fenomene pentru validarea proliferării liniei (liniilor) mieloide la nivelul căreia (căroră) a apărut mutația *JAK2* V617F; o singură copie mutantă este suficientă pentru inițierea proliferării necontrolate a liniilor mieloide, așadar mutația se manifestă și în stare heterozigotă, având un efect dominant asupra alelei sălbatice (Kralovics et al, 2005).

Nu este deloc surprinzător faptul că o mutație activatoare a genei *JAK2* duce la apariția fenotipului NMP. Janus-kinazele (au fost identificate 4 până în prezent la om – *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* și *Tyk1*) joacă numeroase roluri în supraviețuirea și proliferarea celulară și într-o mulțime de alte procese metabolice celulare, fiind prezente în majoritatea liniilor celulare. *JAK2* se exprimă din abundență la nivelul celulelor stem multipotente și progenitoare eritroide, megakarioblastice și granulocitare. Proliferarea normală a acestor celule depinde de buna funcționare a axei *JAK2*-*STAT* (Signal Transducers and Activators of Transcription); *JAK2* este legătura dintre receptorii factorilor de creștere specifici liniilor mieloidă (eritropoetina pentru precursorii eritroizi, trombopoetina pentru precursorii megakarioblastici și *GM-CSF* pentru precursorii granulocitari) și proteinele *STAT*. Doar când acești factori de creștere se leagă de receptorii lor, *JAK2* își schimbă conformația și fosforilează proteinele *STAT*, care vor pătrunde în nucleu, odată activate, unde se vor lega și vor activa promotorii genelor implicate în diviziunea și diferențierea precursorilor mieloidi. Mutația *JAK2* V617F duce la schimbarea permanentă a conformației moleculei de *JAK2*, care va activa continuu proteinele *STAT*, ceea ce duce în final la proliferarea necontrolată a liniilor mieloidă (Kralovics et al, 2005; James C et al, 2005; Baxter et al, 2005; Levine et al, 2005).

Studiile ulterioare au confirmat largă răspândire a mutației *JAK2* V617F în rândul pacienților cu NMP: ea poate fi găsită la peste 90% dintre pacienții cu PV, aproximativ 50% dintre pacienții cu TE și aproximativ 60% dintre pacienții cu NMP (Beer et al, 2008). Din această distribuție, se poate concluziona că mutația este cel mai frecvent întâlnită în PV. Practic, datorită faptului că pacienții cu PV, negativi pentru mutația *JAK2* V617F, s-au dovedit a avea alte mutații somatice în gena *JAK2*, la nivelul exonului 12, se poate concluziona că un pacient suspect de PV, fără mutații somatice *JAK2*, probabil are alt NMP (Beer et al, 2008). De fapt, mutația *JAK2* V617F este atât de specifică NMP, încât a devenit criteriu major de diagnostic pentru toate cele 3 NMP, conform ultimei clasificări OMS a acestor boli (Tefferi și Vardiman, 2008).

A devenit clar faptul că toți pacienții cu PV prezintă mutații somatice *JAK2*, însă aproximativ jumătate dintre pacienții cu TE și MP nu prezintă asemenea mutații. La o parte dintre acești pacienți au fost puse în evidență începând cu anul 2006 mutații somatice ale genei *c-MPL*, care codifică receptorul de trombopoetină (Pikman et al, 2006; Beer et al, 2008). Prin comparație cu mutația *JAK2* V617F, mutațiile somatice *c-MPL* sunt relativ rare și caracterizează aproximativ 5-10% dintre pacienții cu TE și MP, negativi pentru mutațiile somatice *JAK2*. Mutațiile *c-MPL*

afectează o secvență canonică a genei; cele 3 mutații *c-MPL* identificate cel mai adesea sunt: W515L, W515K și S505N. În prezența acestor mutații, efectul este în principiu același ca și în cazul lui *JAK2 V617F*, doar că în acest caz va fi afectată în primul rând linia mieloidă megakarioblastică. Totuși, pacienții cu mutații *c-MPL* tind să aibă parametri hematologici mai mult modificați și o evoluție mai gravă a bolii, față de pacienții cu mutații *JAK2* (Beer et al, 2008).

În ultimii 2-3 ani cercetările s-au îndreptat mai degrabă asupra factorilor pre-*JAK2*. Chiar dacă descoperirea mutației *JAK2 V617F* a produs o revoluție în comunitatea cercetătorilor care studiază NMP, au rămas multe semne de întrebare, privind mecanismele care stau la baza achiziției acestei mutații somatice (și a altora, cu consecințe similare, cum sunt mutațiile *c-MPL*). Au fost descoperite o serie de mutații somatice, cum sunt cele ale genelor *CBL*, *ASXL* și *TET2*, despre care s-a presupus că ar fi mecanisme pre-*JAK2*. Speranțele cele mai mari s-au pus în mutațiile genei *TET2* (Ten-Eleven Translocator), ca mecanisme pre-*JAK2*; însă, s-a demonstrat că doar la unii pacienți, apariția clonei mutante *TET2* precede apariția clonei mutante *JAK2* (Schaub et al, 2010). Parțial, anul 2009 a adus lămuriri în această direcție, a evenimentelor pre-*JAK2*. Trei echipe independente de cercetători au demonstrat că mutația *JAK2 V617F* apare mult mai frecvent pe fondul unui haplotip constituțional al genei *JAK2*, denumit 46/1, care ar predispuce la unii indivizi la apariția unui mediu hipermutagen în gena *JAK2* (Jones et al, 2009; Olcaydu et al, 2009; Kilpivaara et al, 2009). Kilpivaara și colegii au identificat SNP-ul *JAK2* rs10974944 (marker al haplotipului 46/1) printr-o strategie "genome wide SNP array scan", după care au utilizat o tehnică TaqMan. Această tehnică, deși permite genotiparea unui număr mare de probe, necesită un echipament real-time PCR.

Exista mai multe metode pentru genotiparea SNP-urilor. Printre cele mai des utilizate se numără tehnica real-time PCR, utilizând probe TaqMan, pentru care există și kit-uri pentru un număr mare de SNP-uri și mutații genetice. Deși este o tehnică rapidă și modernă, tehnica real-time PCR nu este accesibilă tuturor laboratoarelor de genetică, datorită costurilor relativ mari de achiziție a aparatului real-time PCR și a kit-urilor aferente. Un alt dezavantaj al tehnicii real-time PCR este imposibilitatea genotipării unor probe, datorită unor mutații/polimorfisme necunoscute, care pot fi prezente la nivelul regiunilor de legare ale probelor TaqMan, ceea ce împiedică hibridizarea acestora.

O altă metodă utilizată pentru genotiparea SNP-urilor este dHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*). Dezavantajul major al acestei metode este legat de costul foarte ridicat al echipamentelor necesare, ceea ce face ca această metodă să fie accesibilă în puține laboratoare.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă este de a realiza o metodă simplă și eficientă de identificare a SNP-ului *JAK2* rs10974944, marker informativ al haplotipului *JAK2* 46/1, în scopul evaluării predispoziției genetice spre dezvoltarea neoplasmelor mieloproliferative, care să permită genotiparea rapidă și sigură a unui număr mare de pacienți, inclusiv în centrele care nu au acces la echipamente de tip real-time PCR sau dHPLC.

Metoda de investigare a neoplasmelor mieloproliferative bazată pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, conform invenției, se bazează pe dezvoltarea și implementarea unei tehnici PCR-RFLP (Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism), care presupune extracția de ADN genomic, selecția primerilor și amplificarea prin PCR a unui fragment genomic din gena *JAK2*, conținând SNP-ul rs10974944, urmată de digestia enzimatică a ampliconilor cu enzima de restricție MboI, electroforeza în gel de agaroză și identificarea precisă a genotipurilor, prin analiza polimorfismului fragmentelor de restricție.

Metoda de investigare a neoplasmelor mieloproliferative bazată pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, constă în realizarea următoarelor etape:

1. Extracția ADN genomic
2. Selecția primerilor pentru amplificarea regiunii genomice din interiorul genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944
3. Amplificarea regiunii genomice din interiorul genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944
4. Digestia ampliconilor cu enzima de restricție MboI, electroforeza în gel de agaroză și analiza RFLP
5. Interpretarea rezultatelor

1. Extracția ADN genomic

Extracția ADN genomic a fost efectuată din leucocite din sângele periferic, pornind de la un volum de 300 μ l de sânge integral. În acest scop, se recoltează pe EDTA 3-5 ml de sânge, prin puncție venoasă periferică. Pentru extracția ADN genomic, se utilizează kit-ul comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, MA, USA).

Fazele extracției ADN, utilizând acest kit, sunt următoarele:

1. Liza membranelor celulare. La 300 μ l sânge integral se adaugă 900 μ l soluție de liză celulară și se lasă la incubare la temperatura camerei timp de 10 min, după care are loc centrifugarea probelor la 14.000 rpm, timp de 30 s. Supernatantul se elimină aproape integral (mai puțin aproximativ 10 μ l), după care are loc resuspendarea sedimentului (format din nucleii leucocitelor) în cei aproximativ 10 μ l de supernatant, prin vortexare puternică timp de 15-20 s.
2. Liza membranelor nucleare și degradarea moleculelor ARN. La suspensia obținută în faza 1 se adaugă 300 μ l soluție de liză nucleară și 1.5 μ l ribonuclează, prin incubare la 37°C, timp de 15 min.
3. Precipitarea proteinelor. La amestecul obținut în faza 2 se adaugă 100 μ l soluție de precipitare a proteinelor, separarea proteinelor realizându-se prin vortexare puternică timp de 15-20 s, urmată de centrifugarea probelor 3 min la 14.000 rpm.
4. Precipitarea ADN-ului cu isopropanol. La 400 μ l de supernatant obținut în faza anterioară se adaugă 300 μ l isopropanol, după care are loc centrifugarea probelor timp de 1 min la 14.000 rpm.
5. Spălarea sedimentului ADN cu 200 μ l de soluție etanol 70%, urmată de centrifugarea probelor 1 min la 14.000 rpm; ulterior, supernatantul se elimină, iar sedimentul este lăsat la uscat 15 min la 37°C.
6. Rehidratarea ADN-ului presupune adăugarea a 100 μ l de soluție de rehidratare, peste sedimentul obținut în etapa a 5-a. Rehidratarea ADN-ului are loc peste noapte, la 4°C.
Concentrația ADN a probelor este evaluată utilizând un spectrofotometru Eppendorf, dedicat măsurării concentrației acizilor nucleici.

Puritatea soluțiilor ADN se evaluează prin raportul A260/A280, calculat automat de spectrofotometrul Eppendorf. În mod normal, acesta este între 1.6 și 2, optim 1.8. Deviații ale valorilor acestui raport indică impuritatea probei, de obicei prin exces de proteine.

Până la prelucrarea ulterioară, probele ADN se păstrează la -20°C.

2. Selecția primerilor pentru amplificarea regiunii genomice din interiorul genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944

Secvența genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944, de la nivelul intronului 12, se obține din baza de date GenBank, unde gena *JAK2* are codul de acces NT_008413. Perechea

optimă de primeri este aleasă utilizând programul on-line Primer3, versiunea 0.4.0. Primerii care se folosesc pentru amplificarea fragmentului genomic conținând SNP-ul rs10974944 au secvențele următoare:

Forward (sens): 5'-CAAGGGTCAACTGTAGTACATAA-3'

Reverse (anti-sens): 5'-CTGCTTGCTAGTGGGTGAAT-3'

3. Amplificarea regiunii genomice din interiorul genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944

Reacția PCR de amplificare a regiunii conținând SNP-ul rs10974944 se realizează într-un volum standard de reacție de 25 μ l. Componentele mixului de reacție sunt următoarele:

- 12.5 μ l de 2xPCR MasterMix (Fermentas MBI, Vilnius, Lituania), conținând 0.05 U/ μ l de Taq-polimeraza recombinantă, MgCl₂ 4 mM și deoxinucleotide trifosforilate în concentrație de 0.4 mM fiecare
- 10 picomoli din fiecare primer, forward, respectiv reverse
- 1 μ l de albumină serică bovină, în concentrație de 2 mg/ml
- 75-100 ng ADN genomic
- apă liberă de nucleaze până la volumul final de 25 μ l.

Programul de amplificare se desfășoară într-un termocycler MasterCycler cu gradient (MasterCycler Gradient, Eppendorf, Germania). Condițiile de amplificare sunt următoarele:

- denaturare inițială 7 min la 95°C
- 35 de cicluri, fiecare presupunând denaturare 40 s la 95°C, annealing 45 s la 57°C și elongare 40 s la 72°C
- elongare finală 5 min la 72°C.

4. Digestia ampliconilor cu enzima de restricție MboI, electroforeza în gel de agaroză și analiza RFLP

Digestia ampliconilor astfel obținuți, în vederea obținerii genotipurilor SNP-ului rs10974944, se efectuează folosind enzima de restricție MboI. Aceasta are următorul situs de recunoaștere:

5'...GATC...-3'

3'...CTAG...-5'

J

Din volumul de 25 µl de produşi de amplificare obţinuţi prin PCR, 10 µl se incubează timp de 12 ore la 37°C, cu 5U de enzima de restricţie MboI (Fermentas MBI, Vilnius, Lituania).

Electroforeza fragmentelor ADN rezultate în urma digestiei cu enzima MboI se efectuează în gel de agaroză de înaltă rezoluţie MetaPhor 3% (Lonza, Rockland, Me., USA), colorat cu bromura de etidiu. Migrarea electroforetică a fragmentelor durează 1 ora, cu următorii parametri ai migrării: tensiune 100 V şi intensitate 45 mA.

Alela majora a SNP-ului rs10974944 conţine o citozina (C). În acest caz, ampliconul de 243 pb conţine 3 situsuri de restricţie pentru endonucleaza MboI, în urma digestiei enzimatică rezultând 4 fragmente ADN, de 176, 37, 23 şi respectiv 7 pb. Alela minoră (variante) a SNP-ului rs10974944 conţine o guanină (G). În prezenţa acestui nucleotid, situsul de recunoaştere al enzimei MboI este alterat, enzima pierzând acest situs de recunoaştere. Astfel, în prezenta alelei G, ampliconul de 243 pb conţine doar 2 situsuri de restricţie pentru endonucleaza MboI, în urma digestiei enzimatică rezultând 3 fragmente ADN, de 213, 23 şi 7 pb. Astfel, genotipurile SNP-ului JAK2 rs10974944 se caracterizează prin următoarele combinaţii de fragmente ADN:

- Genotipul CC: 4 fragmente ADN: 176, 37, 23 şi 7 pb
- Genotipul CG: 5 fragmente ADN: 213, 176, 37, 23 şi 7 pb
- Genotipul GG: 3 fragmente ADN: 213, 23 şi 7 pb

Din cauza dimensiunilor reduse, fragmentul de 7 pb şi uneori cel de 23 pb nu sunt vizibile pe gelul de agaroză, însă discriminarea exactă a genotipurilor se face pe baza fragmentelor de 213 şi 176 pb.

Tehnica PCR-RFLP dezvoltată permite genotiparea cu acurateţe a SNP-ului *JAK2* rs10974944, marker al haplotipului *JAK2* 46/1. Tehnica se pretează pentru testarea unui număr mare de pacienţi cu neoplasme mieloproliferative, pentru stabilirea relaţiei între acest SNP şi mutaţiile somatice *JAK2* în primul rând, dar şi alte mutaţii somatice, cum ar fi c-MPL, TET2, ASXL, CBL, care caracterizează aceşti pacienţi.

Haplotipul *JAK2* 46/1 cuprinde şi alte SNP-uri, cum ar fi rs12343867 sau rs1159782; şi acestea sunt pretabile pentru dezvoltarea unor tehnici PCR-RFLP robuste, care să permită genotiparea unui număr mare de pacienţi, la costuri rezonabile, chiar şi în acele centre care nu au acces la echipamente mai sofisticate şi mai elegante, dar şi mai costisitoare. Înainte de a fi aplicată pe scară largă însă, orice tehnică PCR-RFLP nouă necesită a fi validată prin secvenţare.

4. Interpretarea rezultatelor

Interpretarea rezultatelor se bazează pe polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție, obținute în urma digestiei ampliconilor cu enzima de restricție MboI. Exista 3 combinații posibile de asemenea fragmente de restricție, corespunzătoare celor 3 genotipuri posibile pentru SNP-ul rs10974944. Acestea sunt următoarele:

- Genotipul CC: 4 fragmente ADN: 176, 37, 23 și 7 pb
- Genotipul CG: 5 fragmente ADN: 213, 176, 37, 23 și 7 pb
- Genotipul GG: 3 fragmente ADN: 213, 23 și 7 pb

Din cauza dimensiunilor reduse, fragmentul de 7 pb și uneori cel de 23 pb nu sunt vizibile pe gelul de agaroză, însă discriminarea exactă a genotipurilor se face pe baza fragmentelor de 213 și 176 pb.

Alela G a SNP-ului rs10974944 face parte din haplotipul *JAK2* 46/1 și predispune la un mediu hipermutabil la nivelul genei *JAK2* și probabil și a altor gene, ceea ce predispune la achiziția mutației somatice *JAK2* V617F și probabil și a altor mutații somatice, ceea ce se validează în final prin apariția tabloului clinic și paraclinic de neoplasm mieloproliferativ. Heterozigoții CG și în special homozigoții GG sunt predispuși la achiziția mutației somatice *JAK2* V617F și implicit la apariția neoplasmelor mieloproliferative.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- Metoda propusă este eficientă, robustă și sigură, având o sensibilitate și o specificitate de peste 99%; primerii folosiți în amplificarea prin PCR a regiunii genomice mărginind SNP-ul rs10974944 se bazează pe complementaritatea de 100% cu catenele ADN-ului genomic de amplificat; enzima de restricție MboI recunoaște cu o precizie de 100% secvența 5'-...GATC...-3', din care face parte și alela C a SNP-ului rs10974944;
- Metoda propusă este relativ ieftină, presupunând dotări minime ale unui laborator de genetică moleculară; de asemenea, costurile de achiziționare ale reactivilor necesari genotipării pentru SNP-ul rs10974944 prin tehnica PCR-RFLP sunt relativ scăzute;
- Metoda propusă permite genotiparea relativ rapidă a unui număr mare de pacienți per unitate de timp;
- Toate acestea fac din metoda pe care o propunem un instrument ideal de genotipare pentru SNP-ul rs10974944 a unor loturi mari de pacienți cu neoplasme mieloproliferative, inclusiv în laboratoare care nu au acces la echipamente scumpe.

Referințe bibliografice:

Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22:14–22.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*.1951;6:372–375.

Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*.2006;108:1377–1380.

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;106:2162-2168.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, PasswegJR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*.2005; 352:1779–1790.

James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*.2005;434:1144–1148.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutations of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*.2005;365:1054–1061.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*.2005;7:387–397.

Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):141-9.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270.

Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, Skoda RC. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):2003-7.

Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*.2009;41(4):446-449.

Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*.2009;41(4):450-454.

Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*.2009;41(4):455-459.

REVENDICĂRI

1. Metoda de investigare a predispoziției genetice pentru dezvoltarea neoplasmelor mieloproliferative *JAK2* V617F-pozitive, bazata pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, prin dezvoltarea și implementarea unei noi tehnici PCR-RFLP pentru analiza SNP-ului rs10974944, **caracterizată prin aceea că**, presupune efectuarea următoarelor etape:
 - a. recoltarea de sânge integral de la pacienții cu neoplasme mieloproliferative;
 - b. extracția ADN genomic din sângele integral;
 - c. amplificarea unui fragment ADN, de 243 pb, de la nivelul genei *JAK2*, conținând și SNP-ul rs10974944;
 - d. digestia ampliconilor obținuți prin reacția PCR, cu enzima de restricție MboI;
 - e. electroforeza fragmentelor de restricție în gel de agaroză;
 - f. analizarea gelurilor de agaroză și stabilirea genotipurilor pentru SNP-ul rs10974944, în baza combinației unice de fragmente rezultate în urma digestiei cu enzima de restricție MboI.

2. Metoda de investigare a predispoziției genetice pentru dezvoltarea neoplasmelor mieloproliferative *JAK2* V617F-pozitive, bazata pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, amplificarea regiunii genomice din interiorul genei *JAK2* care conține SNP-ul rs10974944, se realizează printr-o reacție PCR utilizând un volum standard de reacție de 25 μl, componentele mixului de reacție fiind următoarele:
 - 12.5 μl de 2xPCR MasterMix (Fermentas MBI, Vilnius, Lituania), conținând 0.05 U/μl de Taq-polimeraza recombinată, MgCl₂ 4 mM și deoxinucleotide trifosforilate în concentrație de 0.4 mM fiecare
 - 10 picomoli din fiecare primer, forward, respectiv reverse, având secvențele următoare:

Forward (sens): 5'-CAAGGGTCAACTGTAGTACATAA-3'

Reverse (anti-sens): 5'-CTGCTTGCTAGTGGGTGAAT-3'

- 1 µl de albumină serică bovină, în concentrație de 2 mg/ml
 - 75-100 ng ADN genomic
 - apă liberă de nucleaze până la volumul final de 25 µl.
3. Metoda de investigare a predispoziției genetice pentru dezvoltarea neoplasmelor mieloproliferative *JAK2* V617F-pozitive, bazată pe studiul SNP-ului *JAK2* rs10974944, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, interpretarea rezultatelor se face în funcție de combinația unică de fragmente ADN, obținută în urma digestiei ampliconilor de 243 pb cu enzima de restricție MboI; alela majoră a SNP-ului rs10974944 conține o citozină (C), caz în care ampliconul de 243 pb conține 3 situsuri de restricție pentru endonucleaza MboI, în urma digestiei enzimatice rezultând 4 fragmente ADN, de 176, 37, 23 și respectiv 7 pb; alela minoră (varianta) a SNP-ului rs10974944 conține o guanină (G), iar în prezența acestui nucleotid, situsul de recunoaștere al enzimei MboI este alterat, enzima pierzând acest situs de recunoaștere, astfel, în prezența alelei G, ampliconul de 243 pb conține doar 2 situsuri de restricție pentru endonucleaza MboI, în urma digestiei enzimatice rezultând 3 fragmente ADN, de 213, 23 și 7 pb; astfel, genotipurile SNP-ului *JAK2* rs10974944 se caracterizează prin următoarele combinații de fragmente ADN:
- Genotipul CC: 4 fragmente ADN: 176, 37, 23 și 7 pb
 - Genotipul CG: 5 fragmente ADN: 213, 176, 37, 23 și 7 pb
 - Genotipul GG: 3 fragmente ADN: 213, 23 și 7 pb.