

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Sedinić

**FOXP1 gen u kroničnim
mijeloproliferativnim neoplazmama**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS KRATICA

MPN – mijeloproliferativne neoplazme

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

PV – policitemija vera

ET – esencijalna trombocitemija

PMF – primarna mijelofibroza

KML – kronična mijeloična leukemija

KNL – kronična neutrofilna leukemija

KEL – kronična eozinofilna leukemija

Ph-negativan – Philadelphia kromosom negativan

Ph-pozitivan – Philadelphia kromosom pozitivan

JAK2 – tirozin-kinaza, prema engl. janus kinase 2

sMF – sekundarna mijelofibroza

sAML – sekundarna akutna mijeloična leukemija

CALR – drugi glasnik, prema engl. calreticulin

MPL – trombopoetinski receptor, prema engl. myeloproliferative leukemia protein

KKS – kompletna krvna slika

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu, prema engl. real time polymerase chain reaction

TGFb – transformirajući čimbenik rasta beta, prema engl. transforming growth factor beta

bFGF – bazični fibroblastni čimbenik rasta, prema engl. basic fibroblast growth factor

MF – mijelofibroza

LDH – laktat dehidrogenaza

RE – reaktivna eritrocitoza

KOPB – kronična opstruktivna bolest pluća

CO – ugljikov monoksid, prema engl. carbon monoxide

RT – reaktivna trombocitoza

FOXP1 – transkripcijski faktor, prema engl. forkhead box P1

MALT – limfoidni tumor vezan uz sluznicu, prema engl. musoca-associated lymphoid tissue

DLBCL – difuzni B velikostanični limfom, prema engl. diffuse large B-cell lymphoma

MDS – mijelodisplastični sindrom

mRNA – glasnična ribonukleinska kiselina, prema engl. messenger ribonucleic acid

UPD – uniparentna disomija

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina, prema engl. complementary deoxyribonucleid acid

Sadržaj

1.	Sažetak	I
2.	Summary	III
3.	Uvod	1
3.1.	Kronične mijeloproliferativne neoplazme	1
3.1.1.	Definicija i podjela	1
3.1.2.	Policitemija rubra vera	1
3.1.3.	Esencijalna trombocitemija	2
3.1.4.	Primarna mijelofibroza	4
3.2.	Reaktivna koštana srž	5
3.2.1.	Sekundarna (reaktivna) eritrocitoza	5
3.2.2.	Sekundarna (reaktivna) trombocitoza	6
3.3.	Forkhead box P1 (FOXP1) gen	6
3.3.1.	Definicija	6
3.3.2.	Lokacija na kromosomu	6
3.3.3.	Funkcija.....	7
3.3.4.	Poremećaji vezani uz FOXP1 gen	7
3.3.5.	Povezanost FOXP1 gena s mijeloproliferativnim neoplazmama.....	7
4.	Hipoteza	9
5.	Ciljevi rada	10
6.	Ispitanici i metode rada.....	11
7.	Rezultati	14
8.	Rasprava.....	19
9.	Zaključci	21
10.	Zahvale.....	22
11.	Literatura	23
12.	Životopis.....	26

1. Sažetak

FOXP1 GEN U KRONIČNIM MIJELOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZMAMA

Martina Sedinić

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

UVOD: Kronične mijeloproliferativne neoplazme (MPN) poremećaji su koštane srži koji se očituju abnormalnom proliferacijom i nakupljanjem zrelih krvnih stanica. FOXP1 gen transkripcijski je faktor važan za normalan razvoj embrionalnog tkiva, te neurološkog i imunološkog sustava. Moguća je povezanost ekspresije FOXP1 gena s nastankom i progresijom kroničnih MPN-ova.

ISPITANICI I METODE: Istraživanje je provedeno na 35 pacijenata dijagnosticiranih i liječenih u KB Dubrava, u Zagrebu, u razdoblju između 2006. i 2014. godine, te na 4 zdrava donora koštane srži. Pacijenti su podijeljeni u 5 skupina, prema kliničkim entitetima, te su analizirane njihove demografske i kliničke karakteristike. Iz stanica tkiva koštane srži izolirana je ribonukleinska kiselina (RNA), te podvrgnuta reakciji reverzne transkripcije u svrhu dobivanja komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNA), nakon čega je provedeno umnažanje sekvence FOXP1 lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR).

REZULTATI: Uočavamo kako Philadelphia-negativni (Ph-negativni) klinički i hematološki stabilni MPN-ovi pokazuju nižu relativnu ekspresiju FOXP1 gena u usporedbi s kontrolnom koštanom srži, dok istovremeno pokazuju višu relativnu ekspresiju gena u usporedbi s transformiranim entitetima. Statističkom analizom pokazalo se kako rezultat nije statistički značajan. Smanjena ekspresija gena mogla bi biti povezana s agresivnijom biologijom i sklonošću transformaciji. Analizom preživljenja utvrdili smo kako je smrtnost najviša u transformiranim entitetima, približno jednaka u kroničnim stabilnim oblicima MPN-ova, a najmanja kod reaktivnih eritrocitoza (RE) i reaktivnih trombocitoza (RT).

RASPRAVA: Zanimljiva je dvojna funkcija FOXP1 gena, ovisno o vrsti stanica, kao onkogena ili tumor supresorskog gena. Nema mnogo radova o povezanosti FOXP1 gena s MPN-ovima. Usporedno s drugim radovima koji govore u prilog tumor supresorskoj funkciji FOXP1 gena mi nalazimo smanjenu ekspresiju FOXP1 gena kod svih Ph-negativnih MPN-ova, s time da se ekspresija dodatno smanjuje u transformiranim entitetima, što također govori u prilog tumor supresorskoj funkciji gena.

ZAKLJUČAK: Ekspresija FOXP1 gena smanjena je kod svih Ph-negativnih MPN-ova u odnosu na kontrolne skupine. Ekspresija FOXP1 gena smanjena je u transformiranim kliničkim entitetima u odnosu na klinički i hematološki stabilne Ph-negativne MPN-ove. Razina ekspresije FOXP1 gena slična je kod policitemije vere (PV), esencijalne trombocitemije (ET) i primarne mijelofibroze (PMF), dok je minimalna ekspresija gena nađena kod leukemijske transformacije u sekundarnu akutnu mijeloičnu leukemiju (sAML).

Ključne riječi: kronične mijeloproliferativne neoplazme, Ph-negativne mijeloproliferativne neoplazme, FOXP1 gen, sekundarna mijelofibroza, sekundarna akutna mijeloična leukemija, ekspresija gena

2. Summary

FOXP1 GENE IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Martina Sedinić

University of Zagreb
School of Medicine

INTRODUCTION: Chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) are bone marrow disorders, revealed by abnormal proliferation and accumulation of mature blood cells. FOXP1 gene is a transcription factor important for normal development of embryonal tissue and for neurological and immune systems. There is a possible connection of FOXP1 gene expression with the occurrence as well as progression of chronic MPNs.

SUBJECTS AND METHODS: The research included 35 patients diagnosed and treated in Clinical Hospital Dubrava, Zagreb, from 2006 to 2014, as well as 4 healthy bone marrow donors. Patients were divided in 5 groups, according to clinical entities. Their demographic and clinical characteristics were analyzed. From the cells of bone marrow tissue ribonucleid acid (RNA) was isolated and subjected to reverse trascription to obtain complementary deoxyribonucleid acid (cDNA). After that FOXP1 sequence was multiplied with polymerase chain reaction in real time (RT-PCR).

RESULTS: We noticed Philadelphia-negative (Ph-negative) clinical and hematological stable MPNs show lower relative FOXP1 gene expression compared to control bone marrow, while also show higher relative gene expression compared to transformed entities. Statistical analysis showed the result was not statistically significant. It is possible lower gene expression is connected to more aggressive biology and greater possibility of transformation. Survival analysis found mortality is the highest in transformed entities, approximately equal in chronic stable MPNs and the lowest in reactive erythrocytosis (RE) and reactive thrombocytosis (RT).

DISCUSSION: Dual function of FOXP1 gene as oncogene or tumor suppressor gene depending on the cell type is of interest. There is only a handful of papers on connection between FOXP1 gene and MPNs all indicating tumor suppressing function of FOXP1 gene. We found lower FOXP1 gene expression in all Ph-negative MPNs with the expression further reducing in transformed entities, supporting the tumor suppressing function of the gene.

CONCLUSION: FOXP1 gene expression is lower in all Ph-negative MPNs compared to the control group. FOXP1 gene expression is lower in transformed clinical entities

compared to clinical and hematological stable Ph-negative MPNs. Level of expression of FOXP1 gene is similar in polycitemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Minimal gene expression was found in leukemic transformation in secondary acute myeloid leukemia (sAML).

Keywords: chronic myeloproliferative neoplasms, Ph-negative myeloproliferative neoplasms, FOXP1 gene, secondary myelofibrosis, secondary acute myeloid leukemia, gene expression

3. Uvod

3.1. Kronične mijeloproliferativne neoplazme

3.1.1. Definicija i podjela

Kronične mijeloproliferativne neoplazme (MPN) rijetki su poremećaji koštane srži u kojima dolazi do abnormalne proliferacije i nakupljanja zrelih krvnih stanica u krvi, koštanoj srži, jetri i slezeni (1).

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) 2008. godine MPN-ove dijeli, s obzirom na stanice koje dominiraju, u sedam velikih skupina: policitemiju rubru veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET), primarnu mijelofibrozu (PMF), kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML), kroničnu neutrofilnu leukemiju (KNL), kroničnu eozinofilnu leukemiju (KEL) i mastocitozu (2).

U skupinu Philadelphia-negativnih (Ph-negativnih) MPN-ova ubrajamo PV, ET i PMF, dok KML ubrajamo u skupinu Philadelphia-pozitivnih (Ph-pozitivnih) MPN-ova.

3.1.2. Policitemija rubra vera

3.1.2.1. Definicija

Policitemija rubra vera mijeloproliferativna je bolest koju karakterizira abnormalno stvaranje eritrocita (1).

3.1.2.2. Epidemiologija i etiopatogeneza

Bolest se javlja učestalošću od 0,4 do 2,8 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (3). Bolest se javlja u svim dobnim skupinama, iako incidencija raste s dobi (1).

U većine bolesnika (65-97%) radi se o mutaciji JAK2V617F, mutaciji 617. kodona JAK2 gena koja dovodi do zamjene aminokiseline valin s fenilalaninom. Pretpostavlja se kako bolesnici koji nemaju mutiran JAK2 gen imaju neke druge genetske promjene koje dovode do trajne aktivacije istog signalnog puta. Proizvod JAK2 gena je JAK2 protein-kinaza koju aktivira eritropoetin kada se veže za eritropoetinski receptor, te dolazi do aktivacije signalnog puta kojim nastaju zreli eritrociti. U slučaju mutacije JAK2 gena, JAK2 protein trajno je aktivan, bez obzira na status eritropoetinskih receptora. Kao posljedica toga dolazi do abnormalne proliferacije i prekomjernog stvaranja eritrocita (1).

3.1.2.3. Klinička slika

Pacijenti su pletorični, često hipertenzivni, obilno se znoje, subfebrilni su, prisutan je svrbež kože, te katkad splenomegalija i osjećaj nelagode ispod lijevog rebrenog luka. Moguć je razvoj peptičkog ulkusa. Često su prisutni glavobolja, vrtoglavica i otežano disanje (1).

3.1.2.4. Dijagnostika

Prema kriterijima SZO-a iz 2008. godine, za dijagnozu PV-a moraju biti ispunjena oba velika i jedan mali kriterij ili prvi veliki i dva mala kriterija. U velike kriterije ubrajamo hemoglobin >185 g/L u muškaraca, odnosno >165 g/L u žena, te prisutnost JAK2V617F ili druge funkcionalno slične mutacije. U male kriterije ubrajamo hipercelularnost koštane srži, smanjenu koncentraciju eritropoetina i formiranje endogenih eritroidnih kolonija *in vitro* (4).

3.1.2.5. Liječenje

Glavni cilj liječenja je spriječiti pojavu tromboembolijskih komplikacija. Provodi se citoredukcija kako bi se hematokrit smanjio ispod 45% venepunkcijom (1-2 puta tjedno), te kod visokorizičnih pacijenata primjena citostatika, najčešće hidroksiureje. Osim citoredukcijske terapije, primjenjuju se i male doze acetilsalicilne kiseline koja djeluje antiagregacijski (5).

3.1.2.6. Prognoza

Bolest je sporoprogresivna i uz pravilno liječenje pacijenti mogu biti stabilni dugi niz godina. 15-godišnje preživljenje iznosi oko 65% (6). Kroz 15 godina u 6-14% oboljelih od PV-a dođe do transformacije u sekundarnu mijelofibrozu (sMF), a u otprilike 5,5-18,7% oboljelih u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) (7).

3.1.3. Esencijalna trombocitemija

3.1.3.1. Definicija

Esencijalna trombocitemija mijeloproliferativna je bolest koju karakterizira abnormalno stvaranje trombocita (1).

3.1.3.2. Epidemiologija i etiopatogeneza

Bolest se javlja u 0,38 do 1,7 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (3). Bolest se javlja jednako u oba spola, a incidencija raste s dobi. Najčešće se javlja u šestom i sedmom desetljeću života (1).

Etiologija bolesti nije poznata. U otprilike 60% bolesnika može se dokazati mutacija JAK2 gena, u 22% CALR gena, a u 3% MPL gena (5).

3.1.3.3. Klinička slika

Mnogi pacijenti nemaju simptome, a bolest se najčešće dijagnosticira kada se u kompletnoj krvnoj slici (KKS) rađenoj iz drugih razloga nađe značajno povišen broj trombocita. Simptomi su najčešće posljedica formiranja krvnih ugrušaka, ovisno o lokaciji krvnog ugruška, a uključuju glavobolju, vrtoglavicu, slabost, bol u prsima, povremene promjene vida, trnjenje, crvenilo i bol ruku i nogu, splenomegaliju, te simptome cerebrovaskularnog infarkta. Rjeđe, kada je broj trombocita značajno povišen, može se javiti krvarenje, koje će se najčešće očitovati kao epistaksa, krvarenje gingive, te prisutnost krvi u stolici (8).

3.1.3.4. Dijagnostika

Bolest se često otkriva slučajnim nalazom trombocitoze u krvnoj slici. Osim KKS-a, potreban je pregled krvnog razmaza, kako bi se dokazali trombociti različitog oblika i veličine, karakteristični za ET. Lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR) određuje se eventualna JAK2, CALR ili MPL mutacija. Katkada je potrebno aspirirati koštanu srž ili provesti citološku, histološku, citogenetsku i molekularnu analizu bioptata koštane srži (4).

3.1.3.5. Liječenje

Glavni cilj liječenja je spriječiti pojavu tromboembolijskih komplikacija. Kao i kod PV-a, koristi se citoredukcijska i antiagregacijska terapija. Mišljenja su podijeljena oko toga kada se treba početi s citoredukcijskom terapijom, a patološka krvarenja ($Trc > 1000-1500 \times 10^9/L$) su općeprihvaćena indikacija. Druga indikacija je pojava vaskularnih komplikacija, usprkos antiagregacijskoj terapiji. Kao citoredukcijska terapija najčešće se koristi hidroksiureja, rjeđe interferon alfa i anagrelid. Antiagregacijska terapija provodi se uvijek ukoliko nema krvarenja ili kontraindikacija, primjenjuje se acetilsalicilna kiselina (5).

3.1.3.6. Prognoza

Bolest je sporoprogresivna i uz pravilno liječenje pacijenti mogu biti stabilni dugi niz godina. 15-godišnje preživljenje iznosi oko 73% (6).

Kroz 15 godina u 4-11% oboljelih od ET-a dođe do transformacije u PMF, a u otprilike 2,1-5,3% slučajeva u AML (7).

3.1.4. Primarna mijelofibroza

3.1.4.1. Definicija

Primarna mijelofibroza mijeloproliferativna je bolest u kojoj dolazi do progresivne fibroze koštane srži te posljedično ekstramedularne hematopoeze s organomegalijom (1).

3.1.4.2. Epidemiologija i etiopatogeneza

Bolest se javlja učestalošću od 0,1 do 1 slučaj na 100 000 stanovnika godišnje (3). Pretežno se javlja u sedmom desetljeću života, iako je zabilježeno pojavljivanje i u mlađim dobnim skupinama. Incidencija je jednaka kod muškaraca i žena (9).

PMF povezan je u 90% slučajeva s mutacijama JAK2, CALR ili MPL gena.

Mutacija JAK2 gena čini hematopoetske stanice osjetljivije na faktore rasta (eritropoetin i trombopoetin). MPL gen kodira protein koji djeluje kao receptor za trombopoetin. Mutacija MPL gena (W515 mutacija) vodi do abnormalne proizvodnje megakariocita. Trombociti, megakariociti i monociti, čiji broj je povećan, otpuštaju citokine kao što su transformirajući čimbenik rasta beta (TGFβ) i bazični fibroblastni čimbenik rasta (bFGF) koji stimuliraju fibroblaste na formiranje retikulina i kolagena (10).

Posljedično fibrozi koštane srži dolazi do ekstramedularne hematopoeze, što se očituje hepatosplenomegalijom, te pancitopenijom (posebno anemijom i trombocitopenijom).

Mijelofibroza (MF) se može javiti i kao kasna komplikacija drugih kroničnih MPN-ova, poput PV-a i rjeđe ET-a, te tada govorimo o mnogo češćem sMF-u (9).

3.1.4.3. Klinička slika

Primarna mijelofibroza klinički se može očitovati gubitkom tjelesne težine, umorom, noćnim znojenjem, povišenom tjelesnom temperaturom, krvarenjem, bolovima u kostima, svrbežom, te simptomima anemije. U kliničkom statusu često se nalazi splenomegalija (90%), te hepatomegalija (50%). U slučaju infarkta slezene ili perisplenitisa javlja se bol u području slezene ili lijevog ramena. Zbog povećanog splenoportalnog krvotoka moguć je razvoj portalne hipertenzije s ascitesom,

varikozitetima jednaka, krvarenjem u probavnom sustavu, te portalnom encefalopatijom (10).

3.1.4.4. Dijagnostika

Prema kriterijima SZO-a iz 2008. godine, za dijagnozu PMF-a moraju biti ispunjena tri velika, te dva mala kriterija. U velike kriterije ubrajamo megakariocitnu proliferaciju i atipiju uz fibrozu koštane srži ili pojačanu celularnost i proliferaciju granulocita, klonalne markere (pozitivan JAK2, CALR ili MPL) ili odsustvo reaktivne fibroze, te izostanak kriterija za druga mijeloidna oboljenja (PV, ET, KML, druge MPN-ove). U male kriterije ubrajamo palpabilnu splenomegaliju, neobjašnjenu anemiju, leukoeritroblastozu, te povećanu laktat dehidrogenazu (LDH) (4).

3.1.4.5. Liječenje

Konvencionalni pristup podrazumijeva observaciju kod asimptomatskih pacijenata, te primjenu androgena, rekombinantnog eritropoetina, imunosupresivne terapije, citoredukcijske terapije, splenektomije i radioterapije u simptomatskih. Nedavno su razvijeni JAK inhibitori (ruksolitinib) koji se mogu koristiti i kod JAK2 pozitivnih i kod JAK2 negativnih PMF-ova, a pokazuju dobre rezultate u liječenju splenomegalije i konstitucijskih simptoma. Transplantacija koštane srži ipak ostaje jedina kurativna terapijska metoda (11).

3.1.4.6. Prognoza

Medijan preživljenja za oboljele od PMF-a iznosi između 3,5 i 5,5 godina od trenutka postavljanja dijagnoze. Kroz 10 godina očekuje se preživljenje manje od 20% početno oboljelih.

Glavni uzroci smrti su infekcije, krvarenja, zatajenje srca, tromboze i transformacije u akutnu leukemiju (1).

Najvažniji prognostički čimbenici su stupanj anemije, dob bolesnika, broj leukocita, broj nezrelih stanica na periferiji, te postojanje mutacije V617F JAK2 gena (12).

Kroz 10 godina u 5-30% oboljelih od PMF-a dođe do transformacije u AML (9).

3.2. Reaktivna koštana srž

3.2.1. Sekundarna (reaktivna) eritrocitoza

Eritrocitoza označava povećan broj eritrocita u perifernoj krvi, a sekundarna je ona eritrocitoza koja se javlja kao posljedica nekog poznatog čimbenika (1).

U moguće uzroke reaktivne eritrocitoze (RE) ubrajamo boravak na visokim nadmorskim visinama, kroničnu opstruktivnu bolest pluća (KOPB), alveolarnu

hipoventilaciju, kardiovaskularne bolesti s desno-lijevim shuntovima, hemoglobinopatije, izloženost ugljikovom monoksidu (CO), stanja koja dovode do bubrežne hipoksije i ostalo (13).

Slično kao i kod PV-a, pacijenti su pletorični i često hipertenzivni, mogu imati glavobolje, te biti konfuzni i letargični. Ukoliko je u pozadini bolesti hipoksija, bolesnici mogu biti cijanotični (13).

3.2.2. Sekundarna (reaktivna) trombocitoza

Trombocitoza označava povećan broj trombocita u perifernoj krvi, a sekundarna je ona trombocitoza koja se javlja kao posljedica nekog poznatog čimbenika (1).

U moguće uzroke reaktivne trombocitoze (RT) ubrajamo infekcije i upalne bolesti, stanje nakon splenektomije ili hiposplenizam, maligne bolesti, traume, kronična upalna stanja, obilnija krvarenja, sideropeničnu anemiju i ostalo (14).

Većina pacijenata nema nikakve simptome, a dijagnoza se postavlja nakon rutinske kontrole KKS-a. Mogući su simptomi povezani s uzrokom trombocitoze (14).

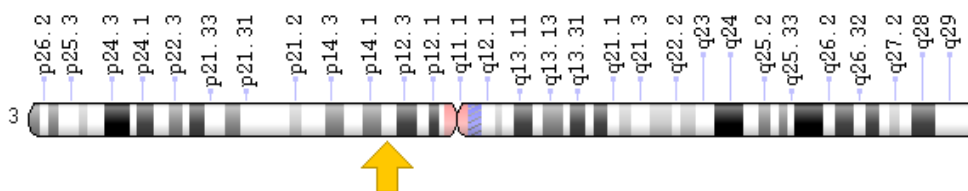
3.3. Forkhead box P1 (FOXP1) gen

3.3.1. Definicija

Forkhead box P1 (FOXP1) gen je gen koji spada u forkhead box (FOX) obitelj transkripcijskih faktora. Odgovoran je za sintezu FOXP1 proteina, važnog za normalan razvoj embrionalnog tkiva prije rođenja, te imunološkog i neurološkog sustava nakon rođenja (15).

3.3.2. Lokacija na kromosomu

Gen se nalazi na kratkom kraku 3. kromosoma na poziciji 14.1 (16).



Slika 1. Citogenetska lokacija FOXP1 gena (17)

3.3.3. Funkcija

Ekspresija gena dokazana je u većini normalnih tkiva, kao i u različitim tumorskim tkivima, gdje pokazuje gubitak ekspresije, prekomjernu ekspresiju ili abnormalnu lokalizaciju (15).

FOXP1 gen ima važnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije i apoptoze. Dokazana je važna uloga u diferenciji plućnog epitela, regulaciji proliferacije srčanih mišićnih stanica, organizaciji spinalnih motornih neurona, nužan je regulator transkripcije u razvoju B limfocita, te regulator diferencijacije pomoćničkih limfocita T (17).

3.3.4. Poremećaji vezani uz FOXP1 gen

FOXP1 gen se na temelju više provedenih istraživanja dovodi u vezu s kognitivnim poremećajima s jezičnim poteškoćama s ili bez autističkih značajki, limfoidnim tumorom vezanim uz sluznicu (MALT limfom), testikularnim limfomom, limfomima središnjeg živčanog sustava, poremećajima govora, B staničnom akutnom limfoblastičnom leukemijom, Burkittovim limfomom, difuznim B velikostaničnim limfomom (DLBCL), hipertenzijom, te limfomima B stanica (18).

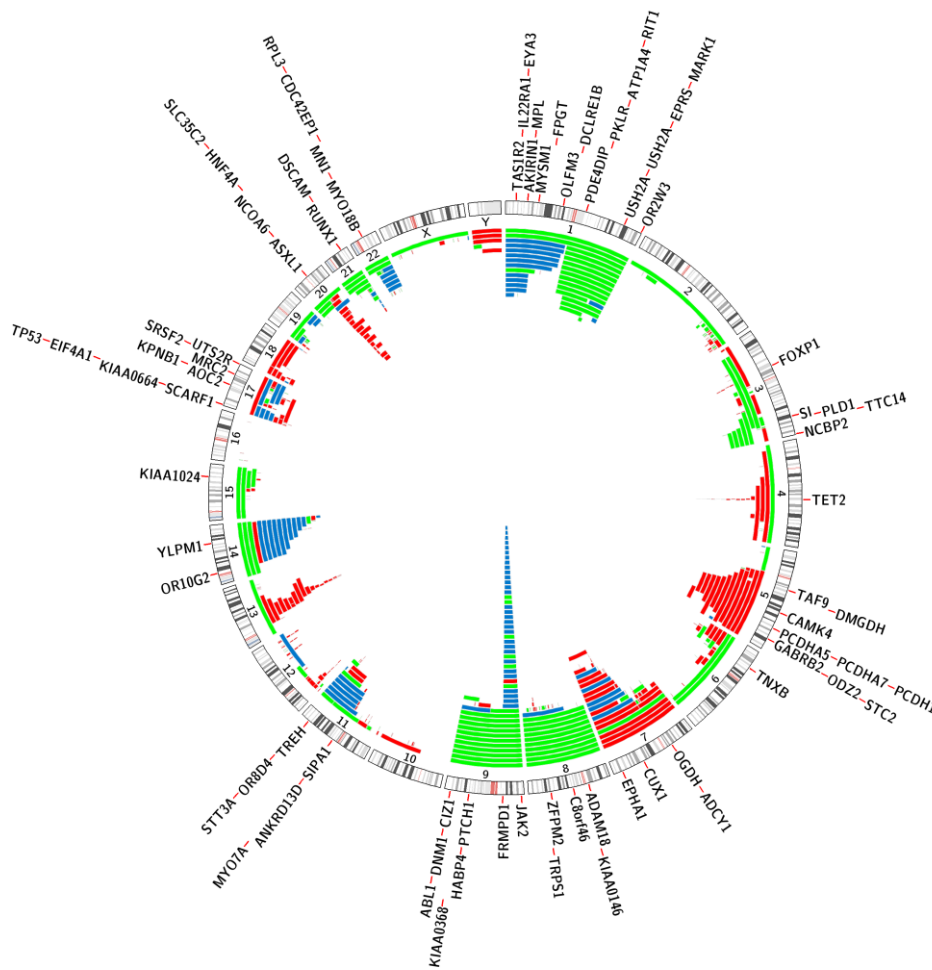
3.3.5. Povezanost FOXP1 gena s kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama

Unazad zadnjih nekoliko desetljeća, zahvaljujući znanstvenim i tehnološkim dostignućima, pomnije se proučavaju genetski uzroci nastanka i progresije kroničnih MPN-ova.

O povezanosti FOXP1 gena s kroničnim MPN-ovima u literaturi nema mnogo podataka, za razliku od brojnih dokaza o povezanosti s limfoproliferativnim bolestima i brojnim drugim tumorskim bolestima.

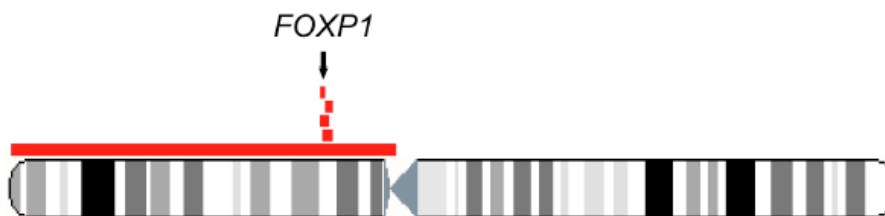
2011. godine Thorsten Klampfl i suradnici (19) prezentiraju kromosomske aberacije pronađene na kohorti od 408 bolesnika s kroničnim MPN-ovima. Identificirali su 25 ponavljajućih mutacija, nađenih u 3 ili više uzoraka. Nađena je značajna povezanost između povećanog broja kromosomskih aberacija, te dobi pacijenta, progresije bolesti i leukemijske transformacije.

U svom radu Thorsten Klampfl i suradnici (19) pokazuju genetsku kompleksnost MPN-ova, ali i ukazuju na nove gene povezane s progresijom bolesti, između ostalih i FOXP1 gen.



Slika 2. Prikaz kromosomskih aberacija (Circos plot); Prezentirano na European Focus on MPN/MDS, Zagreb travanj 2015.; Prikazao Dr. Robert Kralovics, CeMM, Medicinsko Sveučilište u Beču

Crvenom bojom prikazane su kromosomske delecije, zelenom bojom kromosomske amplifikacije, a plavom bojom uniparentalne disomije (UPD).



Slika 3. Delecije FOXP1 gena (19)

Kod 5 pacijenata od njih 408 oboljelih dokazane su delecije FOXP1 gena (19).

4. Hipoteza

Ovaj rad počiva na dvije hipoteze.

Prva hipoteza jest da je razina ekspresije FOXP1 gena u pacijenata s kroničnim MPN-ovima deregulirana.

Druga hipoteza jest da postoji povezanost između progresije kroničnih MPN-ova i razine ekspresije FOXP1 gena.

5. Ciljevi rada

Opći cilj rada bio je analizirati ekspresiju FOXP1 gena kod oboljelih od kroničnih MPN-ova dijagnosticiranih u KB Dubrava i utvrditi povezanost veličine ekspresije gena s progresijom bolesti.

Specifični ciljevi rada bili su:

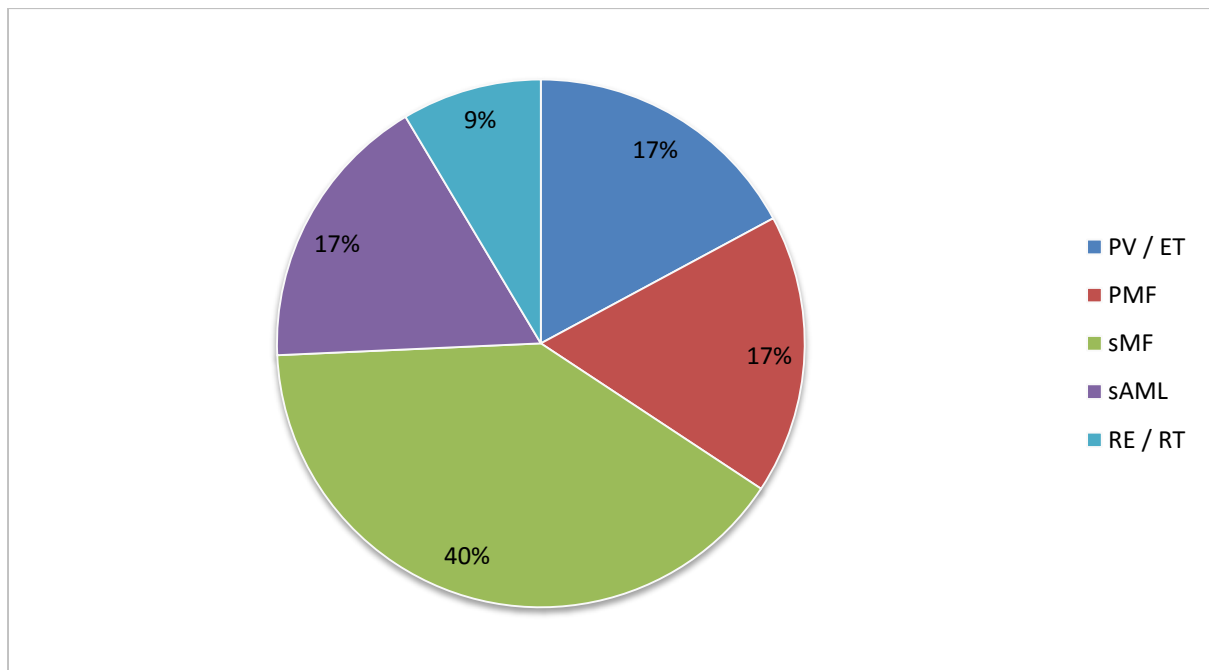
- uspostaviti kvantitativnu PCR metodu u realnom vremenu za umnažanje mRNA FOXP1,
- analizirati kliničke i hematološke parametre bolesnika,
- te analizirati preživljenje pacijenata po skupinama prema kliničkim entitetima.

6. Ispitanici i metode rada

U ovo istraživanje bila je uključena kohorta od 35 ispitanika liječenih na Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, u razdoblju od 2006.-2014. godine, te 4 zdrava donora koštane srži.

Njih 6 (17,1%) imalo je dijagnozu PV-a ili ET-a, njih 6 (17,1%) imalo je dijagnozu PMF-a, njih 14 (40%) imalo je dijagnozu post-PV MF-a ili post-ET MF-a, odnosno sMF-a, kod njih 6 (17,1%) utvrđena je transformacija MPN-a u sAML, a kod njih 3 (8,6%) utvrđen je RE ili RT, te su također imali ulogu kontrole.

57% ispitanika bilo je muškog, a 43% ženskog spola. Medijan dobi pri dijagnozi iznosio je 70 godina.



Slika 4. Zastupljenost kliničkih entiteta među ispitanicima

Tablica 1. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

Karakteristike	Svi pacijenti (N = 35)	PV / ET (n = 6)	PMF (n = 6)	sMF (n = 14)	sAML (n = 6)	RE / RT (n = 3)
Dob (godine)	66 ± 12	66 ± 15	64 ± 16	71 ± 8	65 ± 8	49 ± 12
Spol (ženski)	17	2	4	5	3	1
Spol (muški)	22	4	2	9	3	2
Eritrociti (10 ¹² /L)	4,3 ± 1,2	5,4 ± 1,0	3,7 ± 1,0	4,1 ± 1,1	3,5 ± 0,9	5,2 ± 1,0
Hemoglobin (g/L)	114 ± 31	138 ± 32	101 ± 25	110 ± 25	97 ± 28	129 ± 47
Hematokrit (%)	36,7 ± 9,5	43,7 ± 7,9	31,2 ± 6,6	37,3 ± 9,1	31,0 ± 7,8	40,3 ± 12,2
Leukociti (10 ⁹ /L)	17,8 ± 20,9	10,7 ± 3,3	10,8 ± 4,0	18,8 ± 19,7	31,4 ± 41,0	14,3 ± 6,6
Neutrofilni granulociti (%)	68,0 ± 18,0	75,5 ± 5,9	66,6 ± 11,8	72,0 ± 16,1	61,2 ± 8,4	73,5 ± 9,4
Trombociti (10 ⁹ /L)	408 ± 298	528 ± 258	413 ± 370	374 ± 256	325 ± 345	492 ± 437
LDH (U/L)	740 ± 1100	217 ± 54	581 ± 322	507 ± 219	2331 ± 2080	228 ± 101
Hepatomegalija (cm)	1,0 ± 1,9	0	0	1,7 ± 2,5	2,2 ± 2,2	0
Splenomegalija (cm)	3,2 ± 4,2	2,3 ± 4,1	6,0 ± 5,0	3 ± 4,8	4,4 ± 3,0	0
JAK2 V617F mutacija (+)	14	6	1	6	1	0
JAK2 V617F mutacija (-)	9	0	2	3	1	3

Vrijednosti unesene u tablicu aritmetička su sredina sa standardnom devijacijom demografskih i kliničkih karakteristika ispitanika, raspoređenih u skupine prema kliničkom entitetu, u vrijeme postavljanja dijagnoze.

Uzorci za istraživanje bile su stanice tkiva koštane srži pacijenata s PV-om, ET-om, PMF-om, sMF-om, sAML-om, RE-om i RT-om, te zdravih donora. Po odvajanju adekvatnog dijela citološkom punkcijom dobivenog uzorka za morfološke dijagnostičke analize, ostatak punktata (oko 100-200 μ l) preuzet je za izolaciju RNA za analizu ekspresije FOXP1 gena.

Nativni uzorak stanica koštane srži razrijeđen je u omjeru 1:10 s fiziološkom otopinom. Takav uzorak stavljen je u postupak izolacije RNA reagenskim setom Qiagen - QIAamp RNA Blood Mini Kit.

Po izolaciji spektrofotometrijski je izmjerena koncentracija i čistoća dobivene RNA te je 1 μ g podvrgnut reakciji reverzne transkripcije, odnosno konstrukciji cDNA reakcijom enzima reverzne transkriptaze. Za FOXP1 PCR korišteno je 2 μ l cDNA po reakciji. Uzorci su mjereni u triplicatu. Za specifičnu sekvencu gena FOXP1 korišten je TaqMan gene expression esej, broj Hs00908900_m1, tvrtke ThermoFisher.



Slika 5. Položaj PCR početnica i probe prema sekvenci FOXP1 (označeni zelenom zvjezdicom)

Real time PCR umnažanje sekvence FOXP1 rađeno je u uređaju Applied Biosystems 7300.

Koristili smo $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu za izražavanje relativne ekspresije FOXP1 gena u odnosu na GAPDH.

7. Rezultati

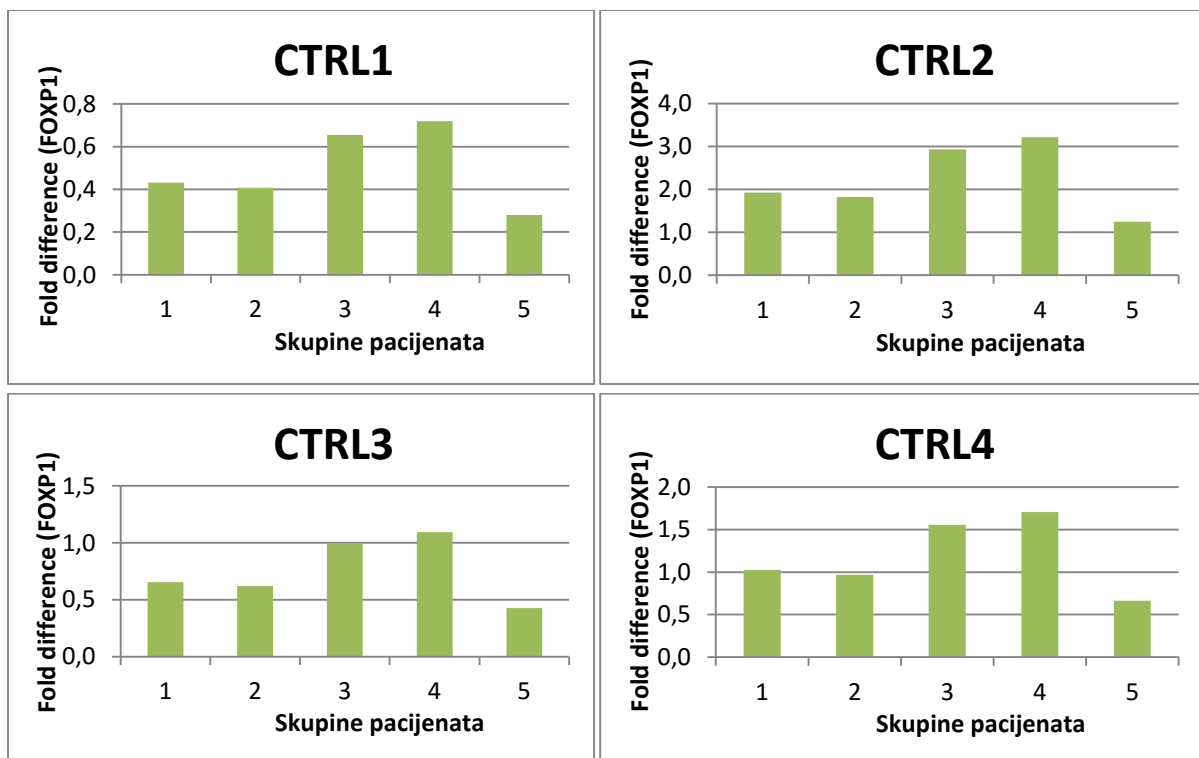
Tablica 2. Prikupljeni podaci za izračun relativne ekspresije FOXP1

Šifra bolesnika	Šifra grupe bolesti	Broj cDNA	AvgCtFOXP1/ AvgCtGAPDH	FOXP1 AvgCt	FOXP1 Avg dCt	FOXP1 dCt std err
1	5	478/11	13.800	25.551	6.986	0,05
2	1	273/11	1,47	23.321	7.416	0,102
3	3	284/11	12.100	28.436	4.944	0,109
4	3	302/11	12.400	28.487	5.517	0,029
5	1	336/11	14.400	23.977	7.280	0,075
6	3	96/11	12.300	27.675	5.138	0,076
7	1	66/11	13.500	26.410	6.889	0,046
8	5	683/10	14.500	25.587	7.943	0,106
9	1	430/10	14.400	25.679	7.925	0,038
10	1	584/10	12.900	29.011	6.514	0,053
11	4	415/09	13.600	26.842	7.132	0,095
12	4	653/10	13.200	27.143	6.567	0,055
13	3	670/10	12.300	29.832	5.629	0,106
14	2	585/10	13.600	25.756	6.817	0,038
15	4	74/10	15.300	24.457	8.504	0,097
16	5	779/10	13.900	26.198	7.306	0,044
17	3	723/08	1.294	28.348	6.454	0,094
18	2	135/09	1.369	26.987	7.284	0,023
19	2	29/07	1.337	27.865	7.018	0,076
20	3	123/07	1.316	27.682	6.643	0,109
21	3	129/07	1.284	28.697	6.343	0,276
22	3	472/07	1.259	27.628	5.686	0,173
23	3	413/07	1.289	29.418	6.596	0,081
24	2	184R/07	1.406	26.913	7.451	0,461
25	2	34/07	1.303	27.194	6.326	0,108
26	3	22/08	1.529	25.355	8.776	0,123
27	3	24R/08	1.481	30.586	9.943	0,073
28	3	165/08	1.329	27.631	6.846	0,134
29	3	196/08	1.367	26.656	7.166	0,066
30	4	236/08	1.250	29.822	5.974	0,179
31	1	140/08	1.228	30.147	5.606	0,045
32	2	268/09	1.304	27.307	6.732	0,093
33	4	99/10	1.206	27.068	4.634	0,055
34	3	380/06	1.189	28.387	4.530	0,038
35	4	490/11	1.250	29.169	5.850	0,055
36	0	85R/08	1.254	27.277	5.522	0,055
37	0	88R/08	1.419	26.018	7.683	0,456
38	0	189R/08	1.293	26.990	6.125	0,187
39	0	94R/08	1.354	25.857	6.770	0,042

Tablica 3. Prikupljeni podaci za izračun relativne ekspresije FOXP1

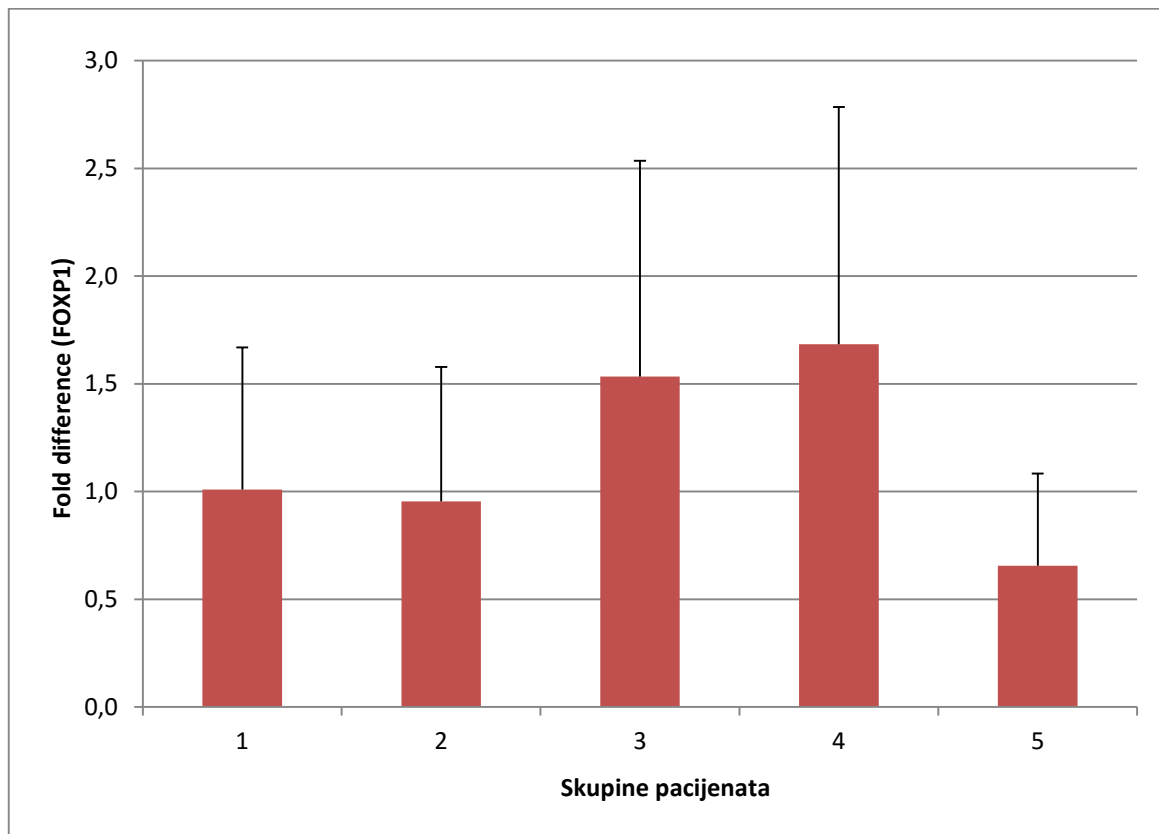
Šifra bolesnika	FOXP1 ddCt	FOXP1 RQ	FOXP1 RQ min	FOXP1 RQ max	GAPDH AvgCt	FOXP1 AvgCt	GAPDH AvgCt
1	2.597	0,165	0,149	0,184	18.565	25551,000	18565,000
2	0	1.000	0,738	1.354	15.905	23321,000	15905,000
3	-2.472	5.548	4.358	7.062	23.492	28436,000	23492,000
4	-1.900	3.731	3.500	3.977	22.970	28487,000	22970,000
5	2.890	0,135	0,114	0,159	16.698	23977,000	16698,000
6	0,749	0,595	0,503	0,704	22.537	27675,000	22537,000
7	2.500	0,177	0,16	0,195	19.520	26410,000	19520,000
8	0,018	0,987	0,782	1.247	17.644	25587,000	17644,000
9	0	1.000	0,92	1.087	17.754	25679,000	17754,000
10	-1.411	2.660	2.368	2.987	22.497	29011,000	22497,000
11	2.742	0,149	0,121	0,148	19.710	26842,000	19710,000
12	-1.357	2.562	2.268	2.895	20.575	27143,000	20575,000
13	-2.296	4.910	3.887	6.201	24.203	29832,000	24203,000
14	-1.108	2.155	1.981	2.345	18.939	25756,000	18939,000
15	0,579	0,669	0,541	0,828	15.953	24457,000	15953,000
16	-0,619	1.536	1.395	1.691	18.892	26198,000	18892,000
17	-0,189	1.140	0,926	1.403	21.894	28348,000	21894,000
18	0,641	0,641	0,609	0,674	19.703	26987,000	19703,000
19	0,376	0,771	0,652	0,912	20.847	27865,000	20847,000
20	0	1.000	0,787	1.271	21.039	27682,000	21039,000
21	-0,299	1.231	0,669	2.264	22.353	28697,000	22353,000
22	-0,957	1.941	1.324	2.845	21.942	27628,000	21942,000
23	-0,046	1.033	0,863	1.236	22.821	29418,000	22821,000
24	0,808	0,571	0,206	1.579	19.462	26913,000	19462,000
25	-0,316	1.245	0,981	1.581	20.867	27194,000	20867,000
26	2.134	0,228	0,174	0,299	16.578	25355,000	16578,000
27	3.300	0,102	0,086	0,119	20.643	30586,000	20643,000
28	0,204	0,868	0,646	1.168	20.785	27631,000	20785,000
29	0,523	0,696	0,601	0,805	19.490	26656,000	19490,000
30	-0,151	1.110	0,748	1.648	23.848	29822,000	23848,000
31	-0,52	1.434	1.300	1.582	24.541	30147,000	24541,000
32	0,247	0,843	0,687	1.034	20.934	27307,000	20934,000
33	-1.491	2.811	2.488	3.175	22.434	27068,000	22434,000
34	-1.596	3.023	2.781	3.285	23.857	28387,000	23857,000
35	-0,275	1.210	1.071	1.367	23.319	29169,000	23319,000
36	-1.121	2.174	1.927	2.453	21.755	27277,000	21755,000
37	1.041	0,486	0,178	1.329	18.335	26018,000	18335,000
38	0	1.000	0,663	1.509	20.865	26990,000	20865,000
39	0,644	0,64	0,583	0,701	19.088	25857,000	19088,000

U tablicama 2 i 3, pacijentima koji se nalaze pod odgovarajućim šiframa, pridružili smo dobivene podatke. Podatke iz tablica analizirali smo pomoću $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ metode. Pri korištenju te metode računamo razliku između GAPDH avg i FOXP1 avg za svakog pojedinog pacijenta. Nakon što smo vrijednosti razvrstali po skupinama, računali smo razliku ekspresije između svakog pacijenta u skupini bolesti i svakog pacijenta u kontrolnoj skupini koja se sastoji od četiri zdrava donora koštane srži. Dobiveni rezultat smo podigli u negativni eksponent baze dva, te nam konačni rezultat prikazuje relativnu ekspresiju između pojedinog pacijenta u promatranoj skupini i pojedinog subjekta u kontrolnoj skupini. Pri tome veća vrijednost dobivenog rezultata pokazuje nižu relativnu ekspresiju i obratno, niža vrijednost pokazuje veću relativnu ekspresiju. Određivanje prosječnog rezultata po skupinama radili smo u dva koraka, prvotno smo odredili prosječnu relativnu ekspresiju gena svakog pacijenta iz pojedine skupine u usporedbi s pojedinim subjektom u kontrolnoj skupini, te na taj način dobili četiri rezultata (slika 6). Zatim smo iz dobivena četiri rezultata odredili prosječnu vrijednost i standardnu pogrešku relativne ekspresije gena po pojedinoj skupini. Postupak smo ponovili za svaku skupinu (slika 7). Statistička analiza pokazuje da konačni rezultat ne možemo uzeti kao statistički značajan.



Slika 6. Prosječne vrijednosti relativne ekspresije FOXP1 gena svih pacijenata, raspoređenih po skupinama prema kliničkim entitetima, u odnosu na pojedini subjekt iz kontrolne skupine

Prvu skupinu predstavljaju pacijenti oboljeli od PV-a ili ET-a (17,1% ukupnog broja ispitanika), drugu skupinu predstavljaju pacijenti s dijagnozom PMF-a (17,1% ukupnog broja ispitanika), treću skupinu predstavljaju pacijenti s transformacijom u sMF (40% ukupnog broja ispitanika), četvrtu skupinu predstavljaju pacijenti s dijagnozom sAML-a (17,1% ukupnog broja ispitanika), a petu skupinu predstavljaju pacijenti s RE-om ili RT-om (8,6% ukupnog broja ispitanika).

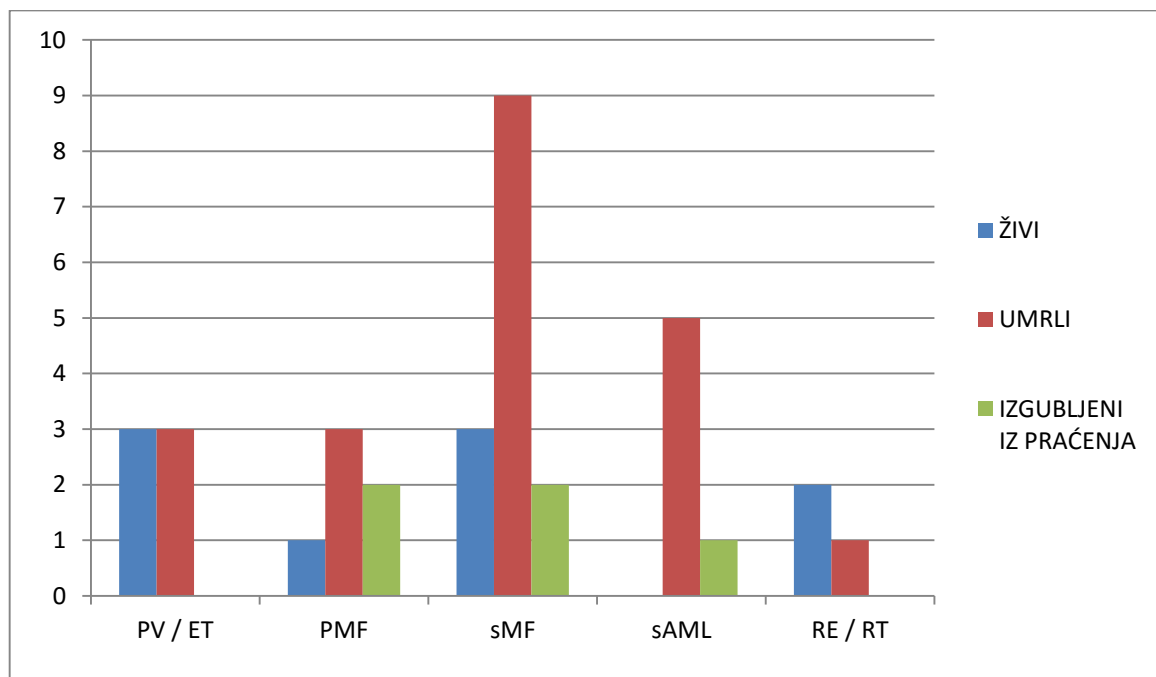


Slika 7. Prosječna vrijednost relativne ekspresije FOXP1 gena kod svih pacijenata pojedine skupine u odnosu na sve subjekte kontrolne skupine

Uočili smo da Ph-negativni MPN-ovi pokazuju višu relativnu ekspresiju FOXP1 gena u usporedbi s transformiranim entitetima, a nižu u odnosu na kontrolne koštane srži, međutim rezultat nije statistički značajan.

Smanjena ekspresija FOXP1 gena mogla bi biti karakteristika Ph-negativnih MPN-ova, a daljnji gubitak ekspresije mogao bi rezultirati agresivnijom biologijom i sklonošću transformaciji.

Analizom preživljenja po skupinama bolesnika ustanovili smo kako je od 6 pacijenata oboljelih od PV-a i ET-a, do trenutka pisanja ovog rada, njih 3 (50%) umrlo. Od 6 pacijenata oboljelih od PMF-a, do trenutka pisanja ovog rada, umrlo ih je također 3 (50%), dok ih je 2 (33,3%) izgubljeno iz praćenja. Od 14 pacijenata kod kojih je došlo do transformacije u sMF, do trenutka pisanja ovog rada, umrlo je njih 9 (64,3%), a njih 2 (14,3%) izgubljeno je iz praćenja. Od 6 pacijenata kod kojih je došlo do transformacije u sAML, do trenutka pisanja rada, umrlo je njih 5 (83,3%), a 1 (16,7%) pacijentica izgubljena je iz praćenja. Od njih 3 s dijagnozom RE-a i RT-a, do trenutka pisanja rada, umrla je 1 pacijentica (33,3%).



Slika 8. Grafički prikaz preživljenja pacijenata po skupinama prema kliničkim entitetima

8. Rasprava

Gotovo pa i nema studija koje proučavaju ulogu FOXP1 gena u kroničnim MPN-ovima, dok je njegova uloga kao tumor supresorskog gena i onkogen u brojnim drugim tumorskim bolestima, uključujući i limfoidne neoplazme, mnogo detaljnije istražena.

FOXP1 transkripcijski čimbenik može imati funkciju i onkogen i tumor supresorskog gena, ovisno o vrsti stanica. Upravo ta saznanja motiv su za daljnja istraživanja funkcije FOXP1 gena i u drugim tumorskim i hiperproliferativnim bolestima.

Prekomjerna ekspresija FOXP1 gena povezana je s lošijom prognozom u brojnim limfomima (DLBCL, MALT limfom, ostali), što sugerira njegovu onkogenu funkciju. S druge strane, gubitak ekspresije FOXP1 gena kod pacijenata oboljelih od različitih epitelnih tumora (gastrointestinalni karcinomi, karcinom pluća, karcinom glave i vrata, karcinom endometrija, karcinom prostate, karcinom bubrega, karcinom dojke) također se povezuje s lošijom prognozom, što sugerira tumor supresorsku funkciju gena (20).

Thorsten Klampfl i suradnici prvi povezuju FOXP1 gen s kroničnim MPN-ovima dokazivanjem delecije gena kod 5 od 408 pacijenata s MPN-om, što ukazuje i na rijetkost same delecije, čija je učestalost tada tek 1,2% u populaciji oboljelih od MPN-a (19).

Mi smo određivali razinu ekspresije gena kod oboljelih od Ph-negativnih MPN-ova stabilnog hematološkog i kliničkog statusa, te transformiranih entiteta, bez saznanja postoji li kod nekoga od njih delecija gena. Usporedili smo ih sa zdravim donorima koštane srži i pacijentima s ustanovljenom eritrocitozom ili trombocitozom, kod kojih su se eritrocitoza ili trombocitoza javile kao posljedica nekih drugih zbivanja.

Zanimljiv je naš nalaz smanjene ekspresije gena kod pacijenata oboljelih od klinički i hematološki stabilnih Ph-negativnih MPN-ova, te daljnje smanjenje ekspresije s progresijom bolesti, u usporedbi s limfoidnim neoplazmama koje odlikuje pojačana ekspresija FOXP1 gena.

Istraživanje koje su proveli Thorsten Klampfl i suradnici (19) govori u prilog tome da se FOXP1 gen u slučaju MPN-ova nalazi u funkciji tumor supresorskog gena. Poznato je kako tumor supresorski geni sudjeluju u kontroli staničnog rasta inhibirajući staničnu proliferaciju i nastanak tumora. Kao i kod većine gena, dva alela kodiraju svaki tumor supresorski gen. U slučaju delecije jednog gena, koja može biti nasljedna ili stečena, preostaje samo jedan djelatni alel. Ukoliko dođe do mutacije tog drugog alela, gubi se kontrola na staničnom proliferacijom i dolazi do nekontroliranog bujanja tkiva (21).

Eva Lovrić i suradnice (22) analizirale su ekspresiju FOXP1 gena kod pacijenata s MDS-om i pacijenata s MPN-ovima. Kod 22 od ukupno 25 pacijenata s dijagnozom MDS-a dokazale su ekspresiju gena, dok ekspresija nije bila imunohistokemijski detektabilna ni kod jednog od ukupno 35 pacijenata s dijagnozom MPN-a. Ti rezultati u skladu su s našim nalazima, gdje je ekspresija FOXP1 gena kod oboljelih od MPN-

a smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih davatelja koštane srži, ali i skupinu s dijagnozom RE-a, odnosno RT-a.

Ista skupina (22) otvara mogućnost kako bi FOXP1 gen mogao imati ulogu u tumorima nastalim u ranijim stadijima mijeloidnog sazrijevanja, na temelju ekspresije gena u uzorcima pacijenata s dijagnozom MDS-a.

Akutna leukemija iz MDS-a nikako nije isto što i akutna leukemija iz MPN-a, čime možemo objasniti nalaz smanjenja ekspresije gena s transformacijom bolesti, dobiven našom analizom.

9. Zaključci

1. Nalaz smanjene ekspresije FOXP1 gena u svim Ph-negativnim MPN-ovima (PV, ET, PMF) u odnosu na kontrolne skupine.
2. Nalaz smanjene ekspresije FOXP1 gena u transformiranim entitetima (sMF, sAML) u odnosu na klinički i hematološki stabilne Ph-negativne MPN-ove.
3. Ph-negativni MPN-ovi međusobno pokazuju sličnu razinu ekspresije FOXP1 gena.
4. Ekspresija FOXP1 gena najniža je u slučaju leukemijske transformacije u sAML, što odgovara i najlošijoj prognozi.

10. Zahvale

Hvala mom mentoru prof. dr. sc. Rajku Kušecu, dr. med. na višegodišnjem podučavanju, otvorenosti, spremnosti da uvijek pomogne, te me s puno strpljenja upozna s osnovnim molekularno biološkim metodama i genetikom. Zahvalna sam što je moj prvi susret s klinikom rezultirao takvim mentorom.

Veliko hvala Marku Lucijaniću, dr. med. na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada i vremenu koje je u to uložio.

Također, veliko hvala i Krešimiru Vurneku na pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada u kasnim noćnim satima.

Zahvaljujem i članovima komisije za ocjenu diplomskog rada, prof. dr. sc. Nikoli Đakoviću, dr. med. i prof. dr. sc. Vlatku Pejši, dr. med.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na pomoći, strpljenju i podršci tijekom cijeloga studija.

Hvala Dori na uveseljavanju.

11. Literatura

1. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Četvrto promijenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–51.
3. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014;92(4):289-297.
4. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: Recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;110:1092–1097.
5. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2015;90(2):162-173.
6. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004;117(10):755-61.
7. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J*. 2015;5:e366.
8. Briere JB. Essential Thrombocythemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:3.
9. Ahmed A, Chang J. Chronic Idiopathic Myelofibrosis: Clinicopathologic Features, Pathogenesis, and Prognosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:1133-1143.

10. Tefferi, A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2014;89(9):915–925.
11. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(17):2635-2642.
12. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999;61(1):10-5.
13. Medscape [Internet]. 1994-2016 by WebMD LLC. Secondary Polycythemia; [Pristupljeno: 28.5.2016.] Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/205039-overview>.
14. Medscape [Internet]. 1994-2016 by WebMD LLC. Secondary Thrombocytosis; [Pristupljeno: 28.5.2016.] Dostupno na <http://emedicine.medscape.com/article/206811-overview>.
15. Banham AH, Beasley N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, Jones M, Mason DY, Prime JE, Trougouboff P, Wood K, Cordell JL. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res*. 2001;61(24):8820-9.
16. GeneCards. Human gene database [Internet]. Weizmann Institute of Science, 1996-2016. FOXP1 Gene (Protein Coding); [Pristupljeno: 26.5.2016.]. Dostupno na: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXP1>.
17. Genetics Home Reference [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services. FOXP1; [Pristupljeno: 26.5.2016.]. Dostupno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FOXP1>.
18. Bacon C, Rappold GA. The distinct and overlapping phenotypic spectra of FOXP1 and FOXP2 in cognitive disorders. *Hum Genet*. 2012;131(11):1687-98.
19. Thorsten Klampfl, Ashot Harutyunyan, Tiina Berg, Bettina Gisslinger, Martin Schalling, Klaudia Bagienski, Damla Olcaydu, Francesco Passamonti, Elisa Rumi, Daniela Pietra, Roland Jäger, Lisa Pieri, Paola Guglielmelli, Ilaria Iacobucci, Giovanni Martinelli, Mario Cazzola, Alessandro M. Vannucchi, Heinz Gisslinger, Robert Kralovics. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):167-76.
20. Koon HB, Ippolito GC, Banham AH, Tucker PW. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Jul;11(7):955-65.

21. Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
22. Lovrić E, Pavlov KH, Korać P, Dominis M. FOXP1 Expression in Normal and Neoplastic Erythroid and Myeloid Cells. Coll Antropol. 2015 Sep;39(3):755-9.

12. Životopis

Rođena sam 15.3.1991. godine u Zagrebu, gdje sam 2009. završila II. opću gimnaziju s odličnim uspjehom. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2009. godine. Jednu akademsku godinu radila sam kao demonstratorica iz Histologije i embriologije na Zavodu za histologiju i embriologiju, dvije akademske godine radila sam kao demonstratorica iz Kliničke propedeutike na Klinici za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, Kliničke bolnice Dubrava, te sam jednu akademsku godinu radila kao demonstratorica iz Pedijatrije na Klinici za pedijatriju, Zavod za gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Od 2009. godine volontiram u Specijalnoj bolnici za kronične bolesti dječje dobi u Gornjoj Bistri. Aktivan sam član studentske organizacije CroMSIC od 2010. godine, u sklopu koje sam sudjelovala u brojnim volonterskim akcijama, te provodila edukacije o spolno prenosivim bolestima i transplantaciji organa u srednjim školama. U sklopu studentske razmjene radila sam mjesec dana na Klinici za unutarnje bolesti, Hospital Regional de Temuco, u Čileu. U sklopu studija sudjelovala sam na više studentskih i biomedicinskih kongresa (CROSS, Zagreb 2013.-2016., Štamparovi dani, Požega 2015.). Od stranih jezika koristim se engleskim (razina C1) i njemačkim (razina B2) jezikom.