

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOCIÈNCES

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



TESI DOCTORAL

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA

TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL.

RELACIÓ AMB LA POLICITÈMIA VERA

Memòria presentada per

Eulàlia Puigdecamet i Riubugent

per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques

per la Universitat Autònoma de Barcelona

Directors

Dra. Lourdes Florensa i Brichs

Dra. Blanca Espinet i Solà

Bellaterra, 2012

La Dra. Lourdes Florensa i Brichs, cap del Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar i la Dra. Blanca Espinet i Solà, adjunt del Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona.

CERTIFIQUEN:

Que l'Eulàlia Puigdecamet i Riubugent ha realitzat, sota la seva direcció, el treball **“Anàlisi de l'expressió gènica en la trombocitèmia essencial. Relació amb la policitèmia vera”** per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques.

Aquest treball s'ha realitzat en el Laboratori de Citologia Hematològica i en el Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia de l'Hospital del Mar dins el Grup de recerca en neoplàsies hematològiques de l'IMIM-Parc de Salut Mar de Barcelona.

Bellaterra, 2012

Dra. Lourdes Florensa i Brichs

Dra. Blanca Espinet i Solà

Tutora:

Dra. Maria Dolors Coll Sandiumenge

Eulàlia Puigdecamet i Riubugent

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Quan acabes d'escriure la tesi doctoral t'adones que s'acaba una etapa de la teva vida i et passen per davant tots aquells moments i tota la gent que hi han format part. És bonic tenir l'oportunitat de poder agrair a tothom que m'ha ajudat a arribar fins aquí. Intentaré no deixar-me a ningú!

Primer de tot, vull agrair a les meves directores de tesi, la Lourdes Florensa i la Blanca Espinet per tots aquests anys de treball juntes, que m'han fet créixer científicament però també com a persona. Les llargues discussions científiques, i també les que no ho eren tant!, al despatx de la Lourdes, els congressos (el de Nova York no l'oblidaré mai), i tants altres moments, han creat un vincle d'amistat entre nosaltres.

A la Lourdes, gràcies per tots els consells i el suport, sobretot en els moments que més el necessitava. Com tu dius, la noieta que va entrar a fer les pràctiques ara s'ha fet gran! Gràcies per donar-me l'oportunitat de fer aquest projecte amb vosaltres. Ha estat un plaer poder estar al teu costat en aquesta etapa.

A la Blanca per la teva assertivitat i pragmatisme, per ajudar-me sempre, per la teva generositat i per a ser també una amiga amb qui saps que sempre pots comptar.

Vull agrair també a en Kiko, per creure en mi i donar-me l'oportunitat de treballar al Servei d'Anàlisi de Microarrays. Per la teva ajuda i per pensar sempre en nosaltres.

A en Carles Besses, per tota l'ajuda rebuda i per fer possible aquest projecte proporcionant-me les mostres i les dades dels pacients.

A la Dra. Woessner, per la seva saviesa i la seva humilitat. Per ser una persona admirable de qui ha estat un plaer rebre classes magistrals de citologia.

A totes les companyes del Laboratori: A l'Encarna, l'Anna, la Leo i la Sílvia, per totes les sessions citològiques, els treballs que hem fet juntes (i els que farem!) i per tots els congressos i sopars que hem viscut. A la Rosa Mari, per la seva ajuda incondicional, per la seva saviesa. Per ensenyar-me els cultius just entrar al laboratori i per totes les nostres xerrades a la sala de cultius. A la Montse, per ser la meva "mama" a Barcelona, per tan sols amb una mirada entendre'm i ajudar-me. Gràcies per tota la teva estima i per animar-me a seguir endavant. A la Rosa, per la seva energia que dona vida al laboratori. A la Carme, per ensenyar-me les citogenètiques i pels dinars al pati de l'hospital. A la Marta, per tots els moments compartits, sobretot el congrés a Porto! A la Judit, a la Isa, a la Maria i a la Bea, per a processar-me les mostres quan jo no podia fer-ho. A les secres, la Carmen, l'Anna, la Cristina i l'Asun, per a totes les

vegades que he trucat i he demanat..”que hi ha la Lourdes?” A la Tere Jiménez i a la Mar García, per a desenvolupar una part del projecte. A la Tere Baró, per la seva alegria i per la seva ajuda amb les immunohistoquímiques. A la Bea Bellosillo i a la Luz per assessorar-me i per passar-me les dades dels pacients. A la Gemma i a tota la resta de molecular per també ajudar-me i per passar bones estones juntes.

A en Jesús Mari, a la Norma i en Manolo per a acollir-me durant l'estada a Salamanca i iniciar-me en el món de l'anàlisi de dades dels microarrays d'expressió.

A en Lauro i en Juanjo per la seva ajuda en l'anàlisi i en la redacció dels resultats dels microarrays.

A la Júlia, per a fer-me els experiments de Western Blot. Per la seva perseverança i generositat.

A la Fundació IMIM per l'ajuda en l'enquadernació de la tesi.

A les becàries amb qui he compartit tots aquests anys. Primer de tot a l'Olaya, a la Cris i a la Carlota. A l'Olaya per a ensenyar-me tantes coses i per acollir-me en arribar al laboratori. A la Laura, per ser, a part de la meua companya de carrera i de pràctiques, una gran amiga. Per escoltar-me, per ajudar-me i per fer-me saber que sempre la tinc a prop. Per passar-ho tan bé juntes, als congressos, al laboratori... Per les nostres filosofades sobre la vida, per les xerrades sobre els nostres gatets, l'excursió al Montperdut que no oblidaré mai... Gràcies per acompanyar-me durant tants anys i espero que continuem trobant moments per a retrobar-nos! A la Cris, per sempre escoltar-me i donar-me bons consells. Tampoc mai oblidaré el congrés d'Amsterdam ni el de Múrcia (te'n recordes? havíem de preparar la presentació i estàvem mirant “l'encantador de gossos”, quin riure!). A la Roci, per la seva amistat i per les nostres confidències, per ser el meu vincle amb el “castellà”, je,je!. A la Laia, per la seva alegria i espontaneïtat, per acollir-me sempre a casa seva i per comptar amb mi. Espero que, a part del viatge que ens espera, visquem encara moltes coses juntes! A la Sílvia, per formar part de la colla de becàries amb qui hem fet berenars i piscinades i amb qui estem acabant aquesta etapa a la vegada. A la Mar, per tota l'ajuda amb els SNP 6.0, em vas salvar del “vortex and spin man”!. A l'Alma i a l'Anna G, per tots els moments al despatx de becàries i a l'Anna P, a la Vera i a l'Anna C pels nous moments (i whatsapps!) al despatx del costat del PRBB.

Als meus nous companys del Servei d'Anàlisi de Microarrays de l'IMIM. A la Montse Torà per facilitar-me poder acabar la tesi. A la Lara perquè treballar amb tu és genial. Gràcies per la teva energia positiva i el teu bon humor, i per tota l'ajuda sobretot durant aquesta etapa final de la tesi. A en Gabri, per aguantar-me i ajudar-me durant aquests dies més estressants. També a en Juanjo pel seu suport.

A tot el personal de l'IMIM: compres, administració, recerca, comunicació, informàtica i manteniment, per fer-me la vida més fàcil!

Als meus nous companys del PRBB. A l'Anna Rovira i a tot el seu grup (Oriol, Irene, Jetzi, Alba, Isra i Cris) perquè sempre que puc trec el cap al vostre despatx, tot pujant al laboratori, per aprofitar per xerrar amb vosaltres. Jetzi i Alba, ja ho tenim això! A la Neus, que penso que el destí o la sort ens ha fet conèixer. Gràcies per animar-me i pensar en mi. A la Rosa, a qui fa poquet que conec però és un encant, i a tota la resta de becaris que, tot venint a quantificar al Nanodrop, aprofitem per fer una xerradeta. Per últim, no em podia descuidar al grup d'anglès: en Vincent, per ser una persona increïble, a en Sergi, per animar-me amb la tesi i per riure junts sense parar a les classes d'anglès. I a la resta, en Xavier, la Rosa i la Sandra, per fer-me passar bones estones tot xapurrejant l'anglès.

A la colla del tren, perquè som com una petita família. Per guardar-me incondicionalment el racó de la finestra i per aconseguir que el viatge no sigui pesat sinó divertit. A en Quim, en Xevi, en David petit, la Carol, en Roger, la Idoia, la Cristina, en Marc, l'Albert... També en David, per apretar-me amb la tesi, i a la Núria, per cuidar-me tant.

Als meus amics, a la colla de Vic, per sobretot fer-me riure tant i tant i per estar sempre "al peu del canó", i als de Torelló, per tot el que hem compartit i tots els viatges i excursions que ens esperen. A l'Anna, amb qui el destí ja ens va ajuntar just al néixer i sembla que no ens vol separar, i a la colla de la Universitat, amb qui vaig viure una de les millors etapes de la meua vida.

A la meua família, per estar sempre al meu costat i demostrar-me que si et sents estimat ets una persona forta. Als meus sogres, per tot el que ens cuiden i ens han ajudat. Als tiets, cosins i àvies, per ser la millor família del món. A la Maria Santamaria, per formar part de la nostra família. Als meus avis, per tot el què em van ensenyar i estimar, i a la Lourdes, per fer-me d'àvia. A la Maria, a qui tinc sort de tenir-la ben a

prop i per ser una gran persona. Al meu germanet, per cuidar-me i ser el meu psicòleg particular i a la Júlia, per ser una personeta molt especial. A en Mimo, per fer-me companyia ja des de la Selectivitat.

A en Joan i l'Eva, amb qui hagués volgut compartir aquest i tots els moments que ens han robat. En tot allò que fem sempre hi faltareu vosaltres.

A en Jordi, per cuidar-me tant i per estimar-me, i pel seu entusiasme per fer coses que se m'encomana i que em fa sentir capaç de tot.

I per últim als meus pares, per donar-m'ho tot. Per fer-me sentir especial i estimar-me tant i de manera incondicional. Per creure en mi en tot allò que feia i per recolzar-me i empenya'm endavant en la vida.

El treball presentat en aquesta tesi ha estat finançat per les següents ajudes:

- Projecte FIS PI030345 titulat "Estudio de marcadores moleculares de la trombocitemia esencial" (període 2004-2007).
- Projecte FIS PI 07/1009 titulat "Análisis de la expresión génica mediante arrays de baja densidad en trombocitemia esencial. Relación con otros síndromes mieloproliferativos crónicos Ph negativos y con la anemia refractaria sideroblástica con trombocitosis" (període 2008-2010).
- Beca d'investigació 2006 atorgada per la Fundació Espanyola d'Hematologia i Hemoteràpia (FEHH), per desenvolupar el projecte titulat "Análisis de expresión génica en la trombocitemia esencial y en la anemia refractaria con sideroblastos en anillo asociada a trombocitosis mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real" (Període 2007-2008).
- Grup de Recerca Consolidat (Agència de gestió d'ajuts universitaris de recerca) (des de 2005).

Amb la col·laboració del Grup Espanyol de Citologia Hematològica

I s'han generat les següents publicacions:

- **Puigdecanet E**, Espinet B, Villa O, Florensa F, Besses C, Serrano S, Solé F. Absence of cytogenetic abnormalities of PRV-1, TPO and c-MPL genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:39-42 (IF: 1,544).
- Florensa L, Bellosillo B, Besses C, **Puigdecanet E**, Espinet B, Perez-Vila E, Longaron R, Vila RM, Sole F, Serrano S. JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. *Leukemia* 2006;20:1903-1905 (IF: 6,146).

- **Puigdecenet E**, Espinet B, Lozano JJ, Sumoy L, Bellosillo B, Arenillas L, Alvarez-Larrán A, Solé F, Serrano S, Besses C, Florensa L. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008;22:1368-1376 (IF: 8,634).

ÍNDEX

| | |
|--|-----------|
| ÍNDEX | I |
| ABREVIATURES | IX |
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1. NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES | 3 |
| 1.1.1. TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL | 6 |
| 1.1.1.1. Epidemiologia | 6 |
| 1.1.1.2. Característiques clíniques i biològiques | 6 |
| 1.1.1.3. Diagnòstic | 10 |
| 1.1.1.4. Evolució, pronòstic i tractament | 11 |
| 1.1.1.5. Repercussió clínica de la mutació <i>JAK2V617F</i> | 12 |
| 1.1.2. POLICITÈMIA VERA | 13 |
| 1.1.2.1. Epidemiologia | 13 |
| 1.1.2.2. Característiques clíniques i biològiques | 13 |
| 1.1.2.3. Diagnòstic | 16 |
| 1.1.2.4. Evolució, pronòstic i tractament | 17 |
| 1.2. BASES MOLECULARS DE LES NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES | 19 |
| 1.2.1. Etiopatogènia de la trombocitèmia essencial i la policitèmia vera | 19 |
| 1.2.1.1. Clonalitat mieloide | 19 |
| 1.2.1.1.1. Alteracions en les vies de senyalització dels factors de creixement hematopoètics | 20 |
| 1.2.2. Alteracions genètiques en la trombocitèmia essencial i en la policitèmia vera | 23 |
| 1.2.2.1. Alteracions citogenètiques | 23 |
| 1.2.2.2. Detecció de mutacions en les neoplàsies mieloproliferatives | 25 |
| 1.2.2.2.1. Mutacions del gen <i>JAK2</i> | 26 |
| 1.2.2.2.1.1. Mutació <i>JAK2V617F</i> | 27 |
| 1.2.2.2.1.2. Mutacions en l'exó 12 del gen <i>JAK2</i> | 32 |
| 1.2.2.2.2. Mutacions del gen <i>MPL</i> | 32 |
| 1.2.2.2.3. Altres mutacions | 34 |
| 1.2.3. Relació genotip-fenotip | 37 |
| 1.2.4. Evolució clonal en les neoplàsies mieloproliferatives | 38 |
| 1.2.5. Desenvolupament de noves teràpies en les neoplàsies mieloproliferatives | 41 |
| 1.3. ESTUDIS DE MICROARRAYS D'EXPRESSION EN LES NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES | 43 |
| 1.3.1. Microarrays d'expressió | 43 |
| 1.3.1.1. Microarrays d'ADN | 43 |
| 1.3.1.2. Metodologia dels microarrays d'expressió gènica | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.2. Microarrays d'expressió en les neoplàsies mieloproliferatives | 51 |
| 2. HIPÒTESI I OBJECTIUS | 53 |
| 2.1. HIPÒTESI | 55 |
| 2.2. OBJECTIUS | 56 |
| 3. MATERIAL I MÈTODES | 57 |
| 3.1. MATERIAL | 59 |
| 3.1.1. Selecció de pacients i controls pels anàlisis de microarrays d'expressió i de RQ-PCR | 59 |
| 3.1.2. Selecció de mostres de pacients amb TE i controls per a les tècniques d'immunohistoquímica, immunocitoquímica i Western Blot | 60 |
| 3.2. MÈTODES | 61 |
| 3.2.1. Estudis d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial, en trombocitosis reactives i en la policitèmia vera | 61 |
| 3.2.1.1. Extracció i processament de la mostra | 61 |
| 3.2.1.2. Separació dels tipus cel·lulars de la sang perifèrica | 61 |
| 3.2.1.2.1. Tècnica de separació per gradient de densitat | 61 |
| 3.2.1.2.2. Purificació dels granulòcits mitjançant la tècnica de separació per sedimentació amb dextrà 3% | 64 |
| 3.2.1.3. Extracció d'ARN utilitzant el mètode de fenol-cloroform | 66 |
| 3.2.1.4. Quantificació i anàlisi de la qualitat de l'ARN | 70 |
| 3.2.1.4.1. Quantificació de l'ARN | 70 |
| 3.2.1.4.2. Anàlisi de la qualitat de l'ARN | 71 |
| 3.2.1.5. Microarrays d'expressió en la trombocitèmia essencial | 78 |
| 3.2.1.6. RT-PCR quantitativa a temps real en la trombocitèmia essencial, en trombocitosis reactives i en la policitèmia vera | 94 |
| 3.2.1.7. Anàlisi de les dades dels microarrays d'expressió i de les TLDA | 116 |
| 3.2.2. Estudis d'expressió proteica en la trombocitèmia essencial | 121 |
| 3.2.2.1. Obtenció i processament de la mostra | 121 |
| 3.2.2.1.1. Obtenció dels granulòcits | 121 |
| 3.2.2.1.2. Inclusió de les biòpsies de mama i preparació dels talls | 121 |
| 3.2.2.1.3. Cultiu de cèl·lules K562 i estimulació amb TPA | 121 |
| 3.2.2.1.4. Citocentrifugació | 122 |
| 3.2.2.2. Tècniques d'immunologia per a l'estudi d'expressió de la proteïna FOSB | 123 |
| 3.2.2.2.1. Tècnica d'immunohistoquímica | 124 |
| 3.2.2.2.2. Tècnica d'immunocitoquímica | 126 |
| 3.2.2.2.3. Tècnica de Western Blot | 126 |

| | |
|--|------------|
| 4. RESULTATS | 139 |
| 4.1. PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I SIGNIFICAT BIOLÒGIC | 142 |
| 4.1.1. Patrons d'expressió gènica | 146 |
| 4.1.1.1. Anàlisi d'agrupació de les dades | 146 |
| 4.1.1.2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats entre les 20 TE i el <i>pool</i> de controls i anàlisi funcional | 147 |
| 4.1.1.3. Validació dels resultats dels microarrays d'expressió | 159 |
| 4.1.2. Patrons d'expressió gènica en relació a <i>JAK2V617F</i> | 162 |
| 4.1.2.1. Anàlisi dels gens diferencialment expressats entre els pacients <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2V617F</i> -negatius estudiats per microarrays d'expressió | 162 |
| 4.1.2.2. Validació dels resultats dels microarrays d'expressió | 164 |
| 4.1.3. Grup de gens predictors de l'estat mutacional de <i>JAK2V617F</i> | 169 |
| 4.1.4. Signatura d'expressió gènica en els pacients <i>JAK2V617F</i> -negatius | 170 |
| 4.2. VALIDACIÓ DELS RESULTATS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I COMPARACIÓ AMB LA POLICITÈMIA VERA | 171 |
| 4.2.1. Anàlisi d'expressió en la trombocitèmia essencial | 177 |
| 4.2.1.1. Confirmació dels patrons d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial | 177 |
| 4.2.1.3. Confirmació dels patrons d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial en relació a <i>JAK2V617F</i> | 179 |
| 4.2.1.4. Confirmació dels gens predictors de l'estat mutacional de <i>JAK2V617F</i> | 185 |
| 4.2.1.5. Confirmació de la signatura d'expressió gènica en els pacients <i>JAK2V617F</i> -negatius | 185 |
| 4.2.1.6. Efecte de la càrrega al·lèlica de <i>JAK2V617F</i> en l'expressió gènica de la trombocitèmia essencial | 185 |
| 4.2.1.7. El <i>FOSB</i> en la trombocitèmia essencial | 188 |
| 4.2.2. Comparació dels patrons d'expressió gènica de la trombocitèmia essencial i les trombocitosis reactives | 190 |
| 4.2.3. Anàlisi d'expressió en la policitèmia vera | 190 |
| 4.2.3.1. Comparació dels patrons d'expressió gènica de la trombocitèmia essencial i la policitèmia vera | 190 |
| 4.2.3.2. Patrons d'expressió gènica en la policitèmia vera en relació a <i>JAK2V617F</i> | 193 |
| 4.2.3.3. Anàlisi comparativa de l'expressió en la trombocitèmia essencial i en la policitèmia vera en relació a les mutacions en el gen <i>JAK2</i> | 194 |
| 4.2.3.4. El <i>FOSB</i> en la policitèmia vera | 198 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.4. Anàlisi de l'expressió proteica del FOSB granulòcits de sang perifèrica de pacients amb trombocitèmia essencial | 198 |
| 4.2.4.1. Estudi del FOSB per immunocitoquímica | 199 |
| 4.2.4.2. Estudi del FOSB per Western Blot | 200 |
| 5. DISCUSSIÓ | 203 |
| 5.1. PATRONS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL | 205 |
| 5.1.1. La trombocitèmia essencial presenta un patró d'expressió caracteritzat per gens implicats en processos proinflamatoris | 205 |
| 5.1.2. Comparació de l'expressió de gens concrets amb els descrits a la literatura | 214 |
| 5.1.3. Detecció de subpatrons d'expressió en la trombocitèmia essencial | 215 |
| 5.2. PATRONS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TE EN RELACIÓ A <i>JAK2V617F</i> | 218 |
| 5.2.1. La trombocitèmia essencial presenta un patró d'expressió dependent de l'estat de la mutació <i>JAK2V617F</i> | 218 |
| 5.2.2. Correlació de la càrrega al·lèlica de <i>JAK2V617F</i> amb l'expressió gènica de la trombocitèmia essencial | 223 |
| 5.2.3. Signatura d'expressió gènica en els pacients <i>JAK2V617F</i> -negatius | 224 |
| 5.2.4. Sobreexpressió del gen FOSB en les TE <i>JAK2V617F</i> negatives | 225 |
| 5.3. COMPARACIÓ DELS PATRONS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I EN LES TROMBOCITOSIS REACTIVES | 229 |
| 5.4. COMPARACIÓ DELS PATRONS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I EN LA POLICITÈMIA VERA | 230 |
| 5.4.1. La trombocitèmia essencial i la policitèmia vera presenten patrons d'expressió diferencials | 230 |
| 5.4.2. Patrons d'expressió gènica en la policitèmia vera en relació a les mutacions en el gen <i>JAK2</i> i comparació amb la trombocitèmia essencial | 231 |
| 5.4.3. Sobreexpressió del <i>FOSB</i> en la policitèmia vera | 232 |
| 6. CONCLUSIONS | 233 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 239 |
| 8. ANNEXOS: Publicacions | 269 |
| 8.1. Puigdecanet E, Espinet B, Villa O, Florensa F, Besses C, Serrano S, Solé F. Absence of cytogenetic abnormalities of PRV-1, TPO and c-MPL genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia. <i>Cancer Genet Cytogenet</i> 2006;167:39-42. | 271 |
| 8.2. Florensa L, Bellosillo B, Besses C, Puigdecanet E, Espinet B, Perez-Vila E, Longaron R, Vila RM, Sole F, Serrano S. <i>JAK2 V617F</i> mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. <i>Leukemia</i> 2006;20:1903-1905. | 275 |

8.3. Puigdecanet E, Espinet B, Lozano JJ, Sumoy L, Bellosillo B, Arenillas L, Alvarez-Larrán A, Solé F, Serrano S, Besses C, Florensa L. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008;22:1368-1376. 279

ABREVIATURES

| | |
|----------|--|
| A | Absorbància |
| aCGH | <i>Comparative genomic hybridization microarrays</i> |
| ADN | Àcid desoxiribonucleic |
| ADNc | ADN complementari |
| ARNc | ARN complementari |
| ANOVA | <i>ANalysis of VAriance</i> |
| ARN | Àcid ribonucleic |
| ARNm | ARN missatger |
| ASXL1 | <i>Additional sex combs-like 1</i> |
| BATF | <i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i> |
| BCR/ABL | <i>Breakpoint cluster region/Abl oncogene</i> |
| C13orf18 | <i>Chromosome 13 open reading frame 18</i> |
| CBL | <i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i> |
| CD44 | <i>CD44 antigen</i> |
| CISH | <i>Cytokine inducible SH2-containing protein</i> |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| CTP | <i>Cytidine tryphosphate</i> |
| eBFU-E | Creixement endogen de colònies eritrocítiques |
| eCFU-MK | Creixement endogen de colònies megacariocítiques |
| EDTA | <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> |
| EPO | Eritropoetina |
| FAG | Fosfatasa alcalina granulocítica |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FISH | <i>Fluorescence in situ hybridization</i> |
| FC | <i>Fold change</i> |
| FDR | <i>False discovery rate</i> |
| FOSB | <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue B</i> |
| FT | Factor de transcripció |

| | |
|---------|---|
| G-CSF | <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> |
| HSC | <i>Hematopoietic stem cell</i> |
| HUMARA | <i>Human androgen receptor</i> |
| IDH | <i>Isocitrate dehydrogenase</i> |
| IKZF1 | <i>IKAROS family zinc finger 1</i> |
| IPA | Programa <i>Ingenuity pathways analysis</i> |
| JAK2 | <i>Janus cinasa 2</i> |
| LAM | Leucèmia aguda mieloide |
| LDH | Lactat deshidrogenasa |
| LMC | Leucèmia mieloide crònica |
| LOH | <i>Loss of heterozygosity</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> |
| miARNs | MicroARNs |
| MO | Medul·la òssia |
| MP | Mielofibrosi primària |
| MPL | <i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i> |
| NFkB | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i> |
| NMP | Neoplàsies mieloproliferatives |
| NMP Ph- | Neoplàsies mieloproliferatives Filadèlfia negatives |
| OMS | Organització mundial de la salut |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PCA | <i>Principal component analysis</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> |
| PIM1 | <i>Pim-1 oncogene</i> |
| PRV-1 | <i>Polycythemia rubra vera 1</i> |
| PV | Policitèmia vera |
| PVSG | <i>Polycythemia Vera Study Group</i> |

| | |
|--------|--|
| RIN | <i>RNA integrity number</i> |
| RQ-PCR | RT-PCR quantitativa a temps real |
| RT | Retrotranscripció |
| SAM | <i>Significance Analysis of Microarrays</i> |
| SMD | Síndromes mielodisplàsiques |
| SNPs | <i>Single nucleotid polymorphisms</i> |
| SOCS2 | <i>Suppressor of cytokine signaling 2</i> |
| SOCS3 | <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i> |
| SP | Sang perifèrica |
| STAT | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| TA | Temperatura ambient (18-23°C) |
| TE | Trombocitèmia essencial |
| TET2 | <i>Ten eleven translocation oncogene family member 2</i> |
| TLDA | <i>Taqman low density arrays</i> |
| TPO | Trombopoetina |
| TR | Trombocitosis reactiva |
| WT | <i>Wild type</i> |

1. INTRODUCCIÓ

1.1. NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES

Les neoplàsies mieloproliferatives (NMP), descrites per Dameshek el 1951, constitueixen una de les cinc categories de malalties mieloides, d'acord amb el sistema de classificació de neoplàsies hematològiques de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (Swerdlow i cols. 2008) (Taula I1).

Taula I1. Classificació de les neoplàsies mieloides (OMS 2008) (Swerdlow i cols. 2008).

-
1. Neoplàsies mieloproliferatives
 2. Neoplàsies mieloides i limfoides amb eosinofília i alteracions de *PDGFRA*, *PDGFRB* i *FGFR1*
 3. Síndromes mielodisplàsiques/ Neoplàsies mieloproliferatives
 4. Síndromes mielodisplàsiques
 5. Leucèmies agudes mieloides
-

Entre les NMP trobem les clàssiques, conjunt que engloba la leucèmia mieloide crònica (LMC), caracteritzada per la t(9;22)(q34;q11.2) que genera el gen de fusió *BCR/ABL* (*Breakpoint cluster region/Abl oncogene*) originant el cromosoma Filadèlfia, i les NMP anomenades Filadèlfia negatives (Ph-). Aquest últim grup inclou la policitèmia vera (PV), la trombocitèmia essencial (TE) i la mielofibrosi primària (MP) (Swerdlow i cols. 2008) (Taula I2). Tal i com el seu nom indica, les NMP Ph- no presenten la t(9;22) i, a la vegada, comparteixen altres característiques clínicobiològiques.

Taula 12. Classificació actual de les neoplàsies mieloproliferatives (OMS 2008) (Swerdlow i cols. 2008).

-
- Leucèmia mieloide crònica, *BCR/ABL* positiva
 - Policitèmia vera
 - Trombocitèmia essencial
 - Mielofibrosi primària
 - Leucèmia neutrofílica crònica
 - Leucèmia eosinofílica crònica
 - Mastocitosi
 - Neoplàsies mieloproliferatives no classificables
-

Des del punt de vista biològic, les NMP Ph- es caracteritzen per l'expansió clonal d'una cèl·lula mare hematopoètica pluripotent, que deriva en un increment de la mielopoesi amb predomini d'una o més línies cel·lulars mieloides (eritrocítica, granulocítica o megacariocítica), amb conservació de la capacitat de diferenciació. Com a resultat es produeix una hipercel·lularitat medul·lar que ocasiona un augment del nombre de granulòcits, eritròcits i/o plaquetes a la sang perifèrica (SP).

Des del punt de vista clínic, les NMP Ph- són malalties d'evolució crònica, que cursen habitualment amb esplenomegàlia, hipercel·lularitat medul·lar i increment dels recomptes hemàtics, freqüent eosinofília i basofília, hematopoesi extramedul·lar, tendència a desenvolupar fibrosi de la MO i complicacions trombòtiques i/o hemorràgiques. Són malalties d'evolució clonal amb potencial de progressar a una mielofibrosi, amb una hematopoesi ineficaç, o de transformació a leucèmia aguda mieloide (LAM). Aquestes manifestacions clíniques sovint es solapen de manera que diagnosticar el tipus de NMP pot resultar difícil. En conseqüència, és important

considerar els símptomes del pacient per tal de preveure'n les possibilitats evolutives i establir una actitud terapèutica, sovint comú.

Amb excepció de la MP, la patogènesi de les NMP es basa en un excés de la proliferació i expansió dels progenitors mieloides a la MO. L'origen d'aquest procés mieloproliferatiu són alteracions genètiques que apareixen en la cèl·lula mare hematopoètica i que sovint afecten l'activitat de tirosina cinases de les vies de senyalització de receptors de factors de creixement. L'activació anòmala d'aquestes vies confereixen a les cèl·lules progenitores la capacitat autònoma de proliferar en absència de factors de creixement.

Les NMP Ph- no presenten cap marcador genètic característic, però el descobriment de la mutació puntual en l'exó 14 del gen *JAK2* (Janus cinasa 2) (*JAK2V617F*) l'any 2005, present en més del 95% de les PV, el 40-50% de les TE i el 50% de les MP (Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a), va canviar el marc diagnòstic d'aquestes malalties, esdevenint un marcador positiu de NMP, tot i que no específic, ja que també es troba en altres neoplàsies mieloides (Renneville i cols. 2006; Atallah i cols. 2008; Schmitt-Graeff i cols. 2008). La mutació en la tirosina cinasa *JAK2* (*JAK2V617F*) ocasiona una activació constitutiva de la via JAK-STAT i permet explicar, com el cas del gen de fusió BCR/ABL, el creixement de les cèl·lules hematopoètiques en absència de factors de creixement. Posteriorment, s'han descrit altres mutacions en el gen *JAK2* (mutacions en l'exó 12) (Pardanani i cols. 2007; Scott i cols. 2007) i en altres gens, com el *MPL* (*Myeloproliferative leukemia virus oncogene*), *TET2* (*Translocation oncogene family member 2*), *ASXL1* (*Additional sex combs-like 1*), i *IDH1 i 2*, (*Isocitrate dehydrogenase*) (Pardanani i cols. 2006; Pikman i cols. 2006; Tefferi i cols. 2010), però cap amb la mateixa freqüència que la *JAK2V617F*. No obstant, les repercussions clíniques d'aquestes mutacions no estan clares i continua existint un grup de pacients, aproximadament el 50% en les TE, en els quals encara es desconeix l'alteració genètica causant de la patogènesi (Sans-Sabrafen i cols. 2006).

En el present treball hem estudiat principalment la TE i també la PV, dues malalties amb trets clínics i biològics comuns però també discrepants.

1.1.1. TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL

La TE és una NMP clonal que afecta principalment a la línia megacariocítica. Es caracteritza per una hiperplàsia megacariocítica medul·lar, un increment persistent de la xifra de plaquetes circulants (amb valors $>450 \times 10^9/L$) i, clínicament, per episodis de trombosi i/o hemorràgia. La malaltia no es va considerar una entitat clínicopatològica fins a les descripcions de Gunz (1960) i Ozer (Ozer i cols. 1960) el 1960.

1.1.1.1. Epidemiologia

Fins fa pocs anys, la TE era considerada la NMP menys freqüent però, amb la incorporació sistemàtica de comptadors hematològics, la seva incidència s'ha incrementat fins a uns valors de 0.6 a 2.5 casos nous cada 100.000 habitants i any (Swerdlow i cols. 2008), essent probablement la més freqüent de totes les NMP. Aquesta malaltia afecta majoritàriament a individus d'edat mitjana-avançada, amb una mitjana d'edat al diagnòstic d'entre 50 i 60 anys i sense predomini de sexes. Tot i així, hi ha un segon pic de freqüència als 30 anys amb predomini del sexe femení (Swerdlow i cols. 2008).

1.1.1.2. Característiques clíniques i biològiques

La TE és una malaltia clínicament heterogènia en la que gairebé la meitat dels casos són asimptomàtics i es descobreixen en una analítica rutinària.

En l'exploració física només es detecta una esplenomegàlia moderada en menys del 20% dels pacients, i per ecografia abdominal es pot evidenciar esplenomegàlia no palpable en el 50% dels pacients (Picardi i cols. 2002).

Les complicacions hemostàtiques són freqüents i són principalment de tres tipus: trombòtiques, hemorràgiques i oclusives microvasculars. Les causes principals de

morbilitat i mortalitat són els episodis trombòtics i/o hemorràgics que apareixen amb freqüència en el curs clínic de la malaltia.

Les complicacions trombòtiques és l'alteració hemostàtica més freqüent amb una incidència d'un 31-83%, variable segons les sèries clíniques (Griesshammer i cols. 1997; Elliott i cols. 2004). La trombosi arterial és més freqüent que la venosa, i afecta principalment al territori cerebrovascular ocasionant fenòmens d'isquèmia vascular cerebral (Arboix i cols. 1997). Les complicacions vasculars oclusives s'associen a un risc incrementat d'abortament espontani i, en menor freqüència, retard en el creixement fetal, mort intrauterina i part prematur. Els factors clínics associats a un major risc de trombosi són l'edat superior a 60 anys, història prèvia de trombosi, tabaquisme, hipertensió arterial i hipercolesterolèmia (Cortelazzo i cols. 1990; Besses i cols. 1999).

Les complicacions hemorràgiques greus són infreqüents i afecten principalment al sistema digestiu. La púrpura equimòtica i els hematomes són les manifestacions cutànies més freqüents (Van Genderen i cols. 1994).

En relació a les complicacions oclusives microvasculars l'eritromelàlgia és l'alteració oclusiva microvascular per excel·lència en la TE. Es caracteritza per una sensació de cremor, dolor intens i envermelliment dels dits de les extremitats o de la planta dels peus. Aquest fenomen trombòtic microvascular és causat per l'activació i agregació de plaquetes en les arterioles distals de les extremitats (Michiels i cols. 1992). Les microoclusions de la circulació cerebral és un altre fenomen freqüent en la TE. Ocasiona diferents símptomes neurològics, com trastorns visuals i cefalees (Jabaily i cols. 1993; Michiels i cols. 1993).

Proves de laboratori

En l'àmbit de les característiques biològiques es realitzen diferents proves de laboratori i es valoren diferents paràmetres per tal de definir la malaltia:

En relació als paràmetres hematològics el més característic en l'inici de la malaltia és una marcada trombocitosi ($>450 \times 10^9/L$), de vegades acompanyada d'una leucocitosi moderada ($<20 \times 10^9/L$) i una basofília també moderada, amb presència ocasional d'alguna cèl·lula mieloide immadura. La concentració d'hemoglobina i l'hematòcrit són normals. L'extensió de SP mostra agregats de plaquetes de morfologia alterada, amb anisocitosi plaquetària, plaquetes gegants, vacuolització i hipogranularitat. Es poden observar fragments de citoplasma o nuclis de megacariòcits circulants (Woessner i cols. 2000). Entre els paràmetres bioquímics que es troben alterats en la TE destaquen la hiperuricèmia i l'increment de la vitamina B12, ambdós en un 15-20% dels casos, i un discret augment de la lactat deshidrogenasa (LDH) i del potassi, aquest últim causant d'una hiperpotassèmia espúria (Iland i cols. 1983).

El mielograma d'un pacient amb TE es caracteritza per una intensa hiperplàsia megacariocítica, amb megacariòcits de mida gran i hiperlobulats, i uns nivells de ferro medul·lar i recompte de sideroblastes normals o disminuïts en la majoria dels casos (Figura I1A).

La biòpsia medul·lar és normocel·lular o discretament hipercel·lular, amb conservació del teixit adipós i un increment de megacariòcits de mida gran i nucli multilobulat, els quals s'agrupen formant agregats. La granulopoesi i eritropoesi es poden trobar augmentades. La trama de reticulina és normal o lleugerament augmentada (Thiele i cols. 2002; Sans-Sabrafen i cols. 2006; Swerdlow i cols. 2008) (Figura I1B).

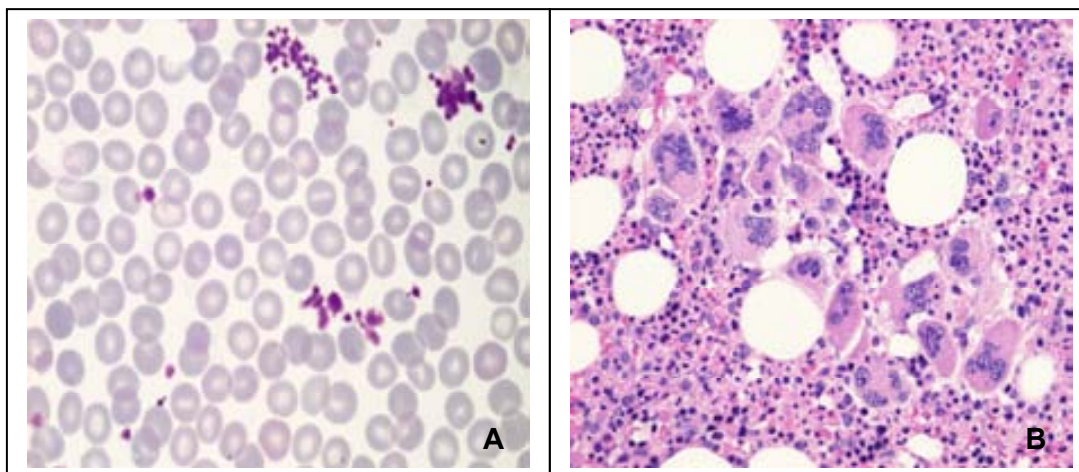


Figura 11. A. Aspirat de medul·la òssia d'un pacient amb trombocitèmia essencial, en el que s'observen megacariòcits de mida gran i hiperlobulats. **B.** Biòpsia de medul·la òssia d'un pacient amb trombocitèmia essencial, en la que s'observen megacariòcits formant agregats.

El creixement de cèl·lules progenitores eritrocítiques i megacariocítiques en absència de factors de creixement, anomenat creixement endogen i detectat mitjançant la tècnica de cultiu *in vitro* de progenitors mieloides, és una característica diagnòstica de les NMP i és present en el 91% dels pacients (Florensa i cols. 1995).

En l'àmbit de l'estudi de les alteracions genètiques o moleculars, el descobriment de la mutació *JAK2V617F* en aproximadament el 50% de les TE (Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a), junt amb la detecció de mutacions en altres gens com el *MPL* (en el 3% dels pacients) (Pardanani i cols. 2006; Pikman i cols. 2006), ha comportat un canvi en la classificació d'aquests pacients, ja que han esdevingut marcadors diagnòstics, tot i que no específics, de TE (Renneville i cols. 2006; Atallah i cols. 2008; Schmitt-Graeff i cols. 2008). Pel què es refereix a la citogenètica, s'observen poques alteracions, en una freqüència d'un 15%, entre les que destaquen les trisomies 8 i 9 i les delecions dels braços llargs dels cromosomes 13 (del(13q)) i 20 (del(20q)) (Third international Workshop 1981; Bench i cols. 1998).

1.1.1.3. Diagnòstic

Malgrat la detecció de la mutació *JAK2V617F* i altres mutacions en pacients amb TE, aquestes no són específiques de la malaltia i només hi són presents en un 50% dels pacients en el cas de la *JAK2V617F* i en un 3% en el gen *MPL*. D'aquesta manera, el diagnòstic de la TE continua essent d'exclusió respecte a altres neoplàsies hematològiques i a trombocitosis reactives (TR). Les neoplàsies hematològiques que poden cursar amb trombocitosi són la resta de NMP, les síndromes mielodisplàsiques (SMD) i les SMD/NMP amb trombocitosi (com l'anèmia refractària amb sideroblasts en anell i la síndrome 5q-). Les TR són conseqüència de la presència de neoplàsies no hematològiques, d'esplenectomia, de ferropènia i de malalties inflamatòries cròniques, entre d'altres. Aquests criteris d'exclusió van ser proposats pel *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) l'any 1997 (Murphy i cols. 1997) i modificats posteriorment per l'OMS el 2001 (Jaffe i cols. 2001), en els que es van incorporar dos criteris diagnòstic positius: 1. Trombocitosi persistent $\geq 600 \times 10^9/L$. 2. Biòpsia medul·lar que mostri una proliferació de la sèrie megacariocítica, amb un increment dels megacariòcits madurs i de mida gran. Actualment, el diagnòstic de la TE es basa en els criteris proposats per la revisió de l'OMS del 2008 (Swerdlow i cols. 2008), els quals incorporen la detecció de mutacions en els gens *JAK2* o *MPL* com a criteri diagnòstic major i modifiquen el valor de recompte plaquetar a $\geq 450 \times 10^9/L$, degut a l'aparició dels marcadors moleculars *JAK2* i *MPL* i a la consideració de la histologia de la medul·la òssia (MO). Aquesta última necessària per a diferenciar de casos reactius i de les MP en estadi pre-fibròtic i de les ARSA amb trombocitosi (Taula I3).

Taula 13. Criteris diagnòstics de la trombocitèmia essencial (OMS 2008) (Swerdlow i cols. 2008).

Criteris majors

1. Recompte persistent de plaquetes $\geq 450 \times 10^9/L$
 2. Proliferació de megacariòcits madurs i de mida gran
Absència o lleuger augment de la granulopoesi o eritropoesi
 3. Exclusió de la resta de neoplàsies mieloides, com LMC, PV, MP i SMD
 4. Detecció de la mutació *JAK2V617F* o altres marcadors clonals o no evidència de trombocitosi reactiva
-

1.1.1.4. Evolució, pronòstic i tractament

La TE és una malaltia amb un curs clínic indolent, en el que només un 1% dels casos evolucionen espontàniament a LAM o bé a una mielofibrosi post-trombocitèmica entre un 5 i un 10% dels pacients (Cervantes i cols. 2002). Conseqüentment, i degut també a que la TE apareix a una edat mitjana-avançada, l'esperança de vida d'aquests pacients no és gaire diferent a la de la població general. Un aspecte a considerar és l'increment del risc de transformació a LAM de forma variable segons el tractament citorreductor que s'apliqui (Sedlacek i cols. 1986). Així, qualsevol decisió respecte al tractament ha de considerar, en primer lloc, que la TE és una NMP que afecta més a la qualitat de vida que a la supervivència del pacient. Existeix controvèrsia en el tractament dels pacients asimptomàtics, però en els pacients que han patit accidents trombòtics o hemorràgics la necessitat de tractament és clara. La finalitat de la teràpia en la TE és prevenir les complicacions trombohemorràgiques i evitar, tant com sigui possible, augmentar el risc d'evolució a LAM associat fonamentalment a la quimioteràpia (Sans-Sabrafen i cols. 2006). Conseqüentment, en els pacients que només pateixen alteració en la microcirculació el fàrmac indicat és l'àcid acetil salicílic

(AAS) a dosis baixes, el qual actua com a antiagregant plaquetari. En canvi, en els pacients considerats d'elevat risc trombòtic se'ls administra teràpia citorredutora. El fàrmac d'elecció és la hidroxiurea, i l'interferó alfa (INF- α) es reserva als pacients joves (menors de 40 anys) o a les embarassades. En els casos resistents o intolerants a la hidroxiurea la segona línia de teràpia és l'anagrelida (Cervantes i cols. 2011). Actualment s'estan desenvolupant nous fàrmacs amb l'objectiu de reduir la toxicitat, com és el cas de l' INF- α pegilat, i per incrementar l'especificitat i sensibilitat, com els inhibidors de *JAK2*. Aquests últims es comenten a l'apartat 1.2.5.

1.1.1.5. Repercussió clínica de la mutació *JAK2V617F*

Els pacients amb NMP *JAK2V617F*-positives i negatives presenten un comportament clínic diferent. D'aquesta manera, les NMP *JAK2V617F* positives s'associen, en general, a una edat més avançada en el moment del diagnòstic, a uns nivells més elevats d'hemoglobina, a leucocitosi i a nivells disminuïts de plaquetes (Vannucchi i cols. 2008). La càrrega mutacional de *JAK2V617F* (% d'al·lels *JAK2V617F* detectats en un tipus cel·lular) sembla que també té un efecte en el comportament clínic del pacient. Una càrrega mutacional elevada s'associa amb prurit, nivells més elevats d'hemoglobina, de leucocitosi i d'esplenomegàlia (Kittur i cols. 2007; Tefferi i cols. 2007; Vannucchi i cols. 2007).

No obstant, la majoria d'estudis apunten a que la presència de *JAK2V617F* o una càrrega elevada de la mutació no sembla afectar ni a la supervivència ni al risc de transformació a LAM (Campbell i cols. 2005; Kittur i cols. 2007; Palandri i cols. 2009; Passamonti i cols. 2009).

La relació entre la *JAK2V617F* i la trombosi no està clara (Campbell i cols. 2005; Kittur i cols. 2007; Tefferi i cols. 2007; Vannucchi i cols. 2007; Palandri i cols. 2009), però sí que diferents estudis semblen relacionar una major càrrega mutacional *JAK2V617F* amb marcadors d'activació leucocitaris i plaquetars, que promourien la formació

d'agregats leucòcit-plaqueta presents en els fenòmens trombòtics (Falanga i cols. 2007; Arellano-Rodrigo i cols. 2009).

1.1.2. POLICITÈMIA VERA

La PV és una NMP clonal caracteritzada per una proliferació anormal de la mielopoesi amb predomini de la línia eritrocítica, que deriva en un excés d'eritròcits a la SP. La malaltia consta de dues fases: 1. Fase policitèmica o proliferativa, associada a un increment de la massa eritroide. 2. Fase post-policitèmica, amb una hematopoesi ineficient que ocasiona citopènies.

1.1.2.1. Epidemiologia

La incidència de la PV és de 0.7 a 2.6 casos nous cada 100.000 habitants i any, depenent de l'àrea geogràfica. La mitjana d'edat en el moment del diagnòstic és de 60 anys, amb un predomini lleugerament masculí (relació home/dona 1.2:1) (Swerdlow i cols. 2008). Entre el 15 i 25% es diagnostiquen de forma casual a través d'una anàlisi de rutina i el 0.4% de pacients tenen una història familiar de PV (Sans-Sabrafen i cols. 2006; Swerdlow i cols. 2008).

1.1.2.2. Característiques clíniques i biològiques

La majoria de símptomes de la PV estan relacionats amb la hipertensió o amb les alteracions vasculars derivades de l'increment de la massa eritroide. Els pacients simptomàtics presenten astènia, cefalees, pèrdua de pes, trastorns epigàstrics, prurit i gota. En l'exploració física es detecta un aspecte pletòric del pacient, amb injecció conjuntival, cianosi rogenca de pell i mucoses, esplenomegàlia i hipertensió arterial (Bilgrami i cols. 1995).

Com en la TE, les complicacions hemostàtiques són freqüents, essent el prurit una de les manifestacions més freqüents i les complicacions trombòtiques la causa principal de morbiditat i mortalitat.

Les complicacions trombòtiques tenen una incidència del 14% abans del diagnòstic i del 20% com a primera manifestació de la malaltia (Gruppo Italiano Studio Policitemia 1995). A diferència de la TE, les trombosis arterials són més freqüents que les venoses (relació 3:1), entre les que destaquen l'ictus, l'accident isquèmic transitori i l'infart agut de miocardi. Els principals factors clínics associats a un major risc de trombosi són l'hematòcrit, l'edat superior a 65 anys, una història prèvia de trombosi (Marchioli i cols. 2005) i els requeriments de flebotomies (Barbui i cols. 1997).

Les complicacions hemorràgiques és un fenomen freqüent en la PV ja que apareixen en un 30-40% dels malalts (Schafer i cols. 1994). Les hemorràgies gastrointestinals són les més freqüents. Es creu que la predisposició a l'hemorràgia ve determinada per les alteracions qualitatives de les plaquetes.

Poden també aparèixer complicacions oclusives microvasculars com el prurit, molt freqüent, la eritromelàlgia, la isquèmia digital i la tromboflebitis.

Proves de laboratori

En l'àmbit de les característiques biològiques es realitzen diferents proves de laboratori per tal de definir la malaltia:

Pel què es refereix als paràmetres hematològics el més destacat és l'augment important de la xifra d'hematies, que sovint supera els $6 \times 10^{12}/L$. La PV presenta panmielosi, de manera que la majoria de pacients, a part de cursar amb un hematocrit augmentat, també presenten leucocitosi i trombocitosi, amb una xifra de plaquetes superior a $500 \times 10^9/L$ en el 40-50% dels pacients.

En el mielograma en el moment del diagnòstic s'observa una hiperplàsia de les sèries eritrocítica, granulocítica i megacariocítica, amb predomini de la línia eritrocítica (Woessner i cols. 2000). En el 95% dels pacients en el moment del diagnòstic existeix un fenomen ferropènic degut a l'hiperconsum, detectat amb la tinció de Perls la qual revela una disminució o absència de sideroblasts i una disminució o desaparició de l'hemosiderina dels macròfags medul·lars. En relació als paràmetres bioquímics les

proves bàsiques d'hemostàsia poden estar alterades, com les proves de coagulació degut a l'elevat hematòcrit. Altres alteracions bioquímiques freqüents són hiperuricèmia, increment de la vitamina B₁₂ i de la lactat deshidrogenasa (LDH) i una disminució de la ferritina (Murphy i cols. 1992). Els nivells d'eritropoetina (EPO) es troben disminuïts o dins la normalitat, essent un indicador biològic diferencial de les eritrocitosis secundàries, les quals tenen nivells elevats d'aquesta citocina.

La biòpsia medul·lar és hipercel·lular, amb una hiperproliferació de les tres línies mieloides (panmielosi). Els megacariòcits són de mida gegant o gran, amb nuclis hiperlobulats i poques anomalies maduratives, i formen agregats. La trama de reticulina és normal en el 64% dels pacients (Figura 12) (Sans-Sabrafen i cols. 2006; Swerdlow i cols. 2008).

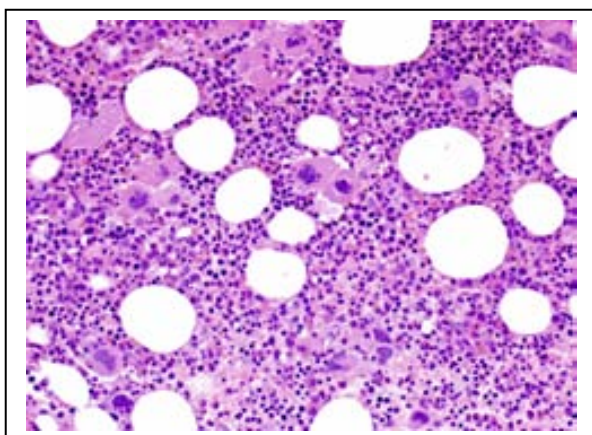


Figura 12. Biòpsia de medul·la òssia d'un pacient amb policitemia vera en la que s'observen megacariòcits formant agregats.

El creixement endogen de colònies eritrocítiques, detectat mitjançant la tècnica de cultiu *in vitro* de progenitors mieloides, es produeix en més del 90% dels pacients, fenomen molt útil sobretot per a diferenciar la PV d'altres eritrocitosis secundàries (Florensa i cols. 1989).

En el camp de les alteracions genètiques o moleculars, el fet que aproximadament el 95% dels pacients amb PV presenten la mutació *JAK2V617F* i que un 3% presenten mutacions en l'exó 12 del mateix gen, restant menys d'un 5% de pacients sense mutacions (Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a; Pardanani i cols. 2007; Scott i cols. 2007), ha implicat que la detecció de

les mutacions al gen *JAK2* sigui essencial pel diagnòstic de la PV. Les alteracions citogenètiques són més freqüents que en la TE, amb una freqüència del 15-20% dels pacients al diagnòstic (Díez-Martín i cols. 1991), essent la majoria comunes amb les trobades en la TE.

1.1.2.3. Diagnòstic

En el diagnòstic de la PV el primer pas consisteix en la valoració de l'eritrocitosi. Aquesta es mesura avaluant l'hemotòcrit, enlloc de l'hemoglobina, ja que existeix una millor correlació entre l'hematòcrit i la massa eritrocitària (citèmia) (Pearson i cols. 1998).

L'any 1975, el PVSG (Berlin i cols. 1975) va establir uns criteris diagnòstics de la PV basats en l'exclusió de causes secundàries d'eritrocitosi i trombocitosi, però no tenia en suficient consideració la histologia de la MO, criteri que es va incloure en la revisió de l'OMS del 2001 (Jaffe i cols. 2001) juntament amb la detecció de creixement endogen de progenitors mieloides com a criteri major de diagnòstic. Posteriorment, la detecció de les mutacions del gen *JAK2* en més del 95% dels pacients amb PV ha canviat radicalment l'algorisme de diagnòstic d'aquesta malaltia, comportant que en la revisió de l'OMS 2008 (Swerdlow i cols. 2008) s'estableixi la presència de la mutació *JAK2V617F* o mutacions en l'exó 12 del gen *JAK2* com a criteri major de diagnòstic (Taula I4).

Taula I4. Criteris diagnòstics de la policitèmia vera (OMS 2008) (Swerdlow i cols. 2008).

Criteris majors

1. Hb > 18.5g/dL (homes) i >16.5 g/dL (dones),
o bé Hb > 17 g/dL (homes) i > 15 g/dL (dones) si es troba associat a:
 - un increment mantingut de ≥ 2 g/dL del valor basal que no es pot atribuir a una correcció de la deficiència de ferro
 - Hb o hematòcrit superior del percentil 99 en funció del valor de referència d'edat, sexe i altitud de residència
 - augment de la citèmia (massa eritroide > 25% de la mitjana normal)
2. Presència de la mutació *JAK2V617F* o altres mutacions amb efecte funcional similar, com les mutacions en l'exó 12 de *JAK2*

Criteris menors

1. Biòpsia de medul·la òssia que mostri augment de les tres línies mieloides (panmielosi)
2. Nivells disminuïts d'EPO en sèrum
3. Creixement endogen de progenitors eritrocítics

Pel diagnòstic de policitèmia vera es requereix la presència d'ambdós criteris majors i un criteri menor, o bé la presència del primer criteri major i de dos criteris menors.

1.1.2.4. Evolució, pronòstic i tractament

La PV pot progressar per diferents estadis que van des de una fase inicial asimptomàtica, seguida per una fase d'eritrocitosi simptomàtica o fase policitèmica que pot evolucionar a una fase postpolicitèmica amb MP, anomenada també fase d'esgotament. Aquesta evolució es dona en el 10% dels pacients als 10-15 anys i en el 50% als 20 anys de malaltia (Najean i cols. 1997). Una altra possibilitat és que es

produeixi una transformació a LAM, fenomen amb una incidència del 20-50% (Murphy i cols. 1992).

Els pacients amb PV sense tractament tenen una mitjana de supervivència de només 18 mesos, mentre que els tractats viuen, generalment, més de 15 anys. En els casos d'evolució a MP la majoria de pacients moren abans dels 3 anys.

Una vegada establert el diagnòstic de PV, el tractament s'ha d'individualitzar segons l'edat del pacient i les manifestacions clíniques al diagnòstic o prèvies i avaluar el risc/benefici del tractament, degut a l'increment de risc de transformació a LAM o a altres neoplàsies derivades del tractament.

Sembla que la presència de la mutació *JAK2V617F* es relaciona amb un comportament clínic diferent, el qual es comenta en l'apartat 1.2.5. Per aquest motiu la detecció de la mutació pot condicionar l'evolució, el pronòstic i el tractament del pacient.

El tractament de primera línia en la PV consisteix en realitzar flebotomies o sagnies, amb l'objectiu de reduir ràpidament el risc trombòtic causat per l'augment de massa eritrocitària. Aquestes es poden realitzar juntament amb l'administració d'AAS a dosis baixes, com a profilaxi antitrombòtica. Una segona opció de tractament és l'ús de fàrmacs citorreductors, com la hidroxiurea, l'INF- α i l'anagrelida, emprats també en la TE (Sans-Sabrafen i cols. 2006). El desenvolupament dels inhibidors de *JAK2* poden tenir especial repercussió en la PV, per l'elevada incidència d'aquesta mutació en aquesta malaltia. Aquests nous fàrmacs es comenten a l'apartat 2.6.

1.2. BASES MOLECULARS DE LES NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES

1.2.1. Etiopatogènia de la trombocitèmia essencial i la policitèmia vera

La TE i la PV són NMP que s'originen a partir d'una proliferació anormal d'una cèl·lula mare hematopoètica pluripotent, que causa l'aparició d'una hematopoesi clonal d'hematies, granulòcits i plaquetes. En la TE predomina la hiperplàsia megacariocítica en la MO amb un increment persistent de la xifra de plaquetes a SP. En la PV la línia més afectada és l'eritrocítica, amb un excés d'hematies a la SP. L'efecte proliferatiu sembla que només afecta a la línia mieloide, sense alteracions en la línia limfoide.

1.2.1.1. Clonalitat mieloide

Les cèl·lules clonals són aquelles genèticament idèntiques i que provenen del mateix precursor, el qual ha adquirit una alteració genètica. En una malaltia l'estudi de clonalitat és indicador de l'estat de la malaltia i ens permet conèixer la cèl·lula d'origen i la jerarquia clonal. La detecció de la clonalitat pot ser genètica, com la detecció d'una mutació o d'una alteració citogenètica, o bé fenotípica, en la qual s'identifica la població clonal segons el patró d'expressió de gens *housekeeping*. Els mètodes més utilitzats per a l'anàlisi de clonalitat fenotípica es basen en el principi d'inactivació del cromosoma X (Chen GL i cols. 2007). Aquest principi consisteix en que durant l'embriogènesi femenina es produeix una inactivació a l'atzar d'un dels dos cromosomes X i la descendència de cada cèl·lula hereta el mateix cromosoma X inactiu. D'aquesta manera en un teixit no neoplàsic trobarem un patró d'inactivació en mosaic (amb una mitjana del 50% d'inactivació de cada cromosoma X), mentre que en un teixit neoplàsic predomina el patró d'inactivació d'un dels cromosomes X. En el primer cas ens trobem davant d'una població policlonal i en el segon cas d'una població clonal.

Entre els gens del cromosoma X estudiats el més utilitzat ha estat el gen que codifica pel receptor humà d'andrògens (*Human androgen receptor, HUMARA*), el qual

presenta una heterozigositat elevada (>90% en dones caucasianes). Cal tenir en compte les limitacions que presenta l'estudi molecular de clonalitat, ja que només es pot aplicar en dones i, a la vegada, només en les que siguin informatives pel polimorfisme lligat al cromosoma X en estudi.

Els estudis de clonalitat en la TE i PV han detectat poblacions clonals en la línia mieloide (eritròcits, granulòcits i plaquetes), però no en la línia limfoide. (Adamson i cols. 1976; Fialkow i cols. 1981). No obstant, tant la PV com la TE són malalties heterogènies respecte al seu estat clonal, ja que no tots els pacients presenten clonalitat mieloide, malgrat complir amb tots els criteris diagnòstics. En la PV es detecta clonalitat en un 60-80% dels pacients (Champion i cols. 1997; Mitterbauer i cols. 1999) i en la TE el percentatge de clonalitat oscil·la entre el 18,7-68% (El-Kassar i cols. 1995; Champion i cols. 1997; El-Kassar i cols. 1997; Briere i cols. 1998; Harrison i cols. 1999a; Mitterbauer i cols. 1999; Chiusolo i cols. 2001; Shih i cols. 2001; Zamora i cols. 2005). Aquesta variació pot ser deguda a les tècniques emprades per la detecció de clonalitat, a l'estudi de diferents fases evolutives de la malaltia i, fins i tot, a l'existència de subgrups dins la mateixa entitat.

1.2.1.1. Alteracions en les vies de senyalització dels factors de creixement hematopoètics

Els factors de creixement hematopoètics són els responsables de controlar la proliferació i diferenciació de les cèl·lules hematopoètiques a la MO. Entre els factors de creixement hematopoètics trobem l'EPO, la trombopoetina (TPO) i les interleuquines (IL). L'EPO és la principal citocina reguladora de la proliferació dels precursors eritrocítics i la seva diferenciació a eritròcits, i la TPO, junt amb el seu receptor MPL, és el principal regulador de la megacariopoesi (Figura 13).

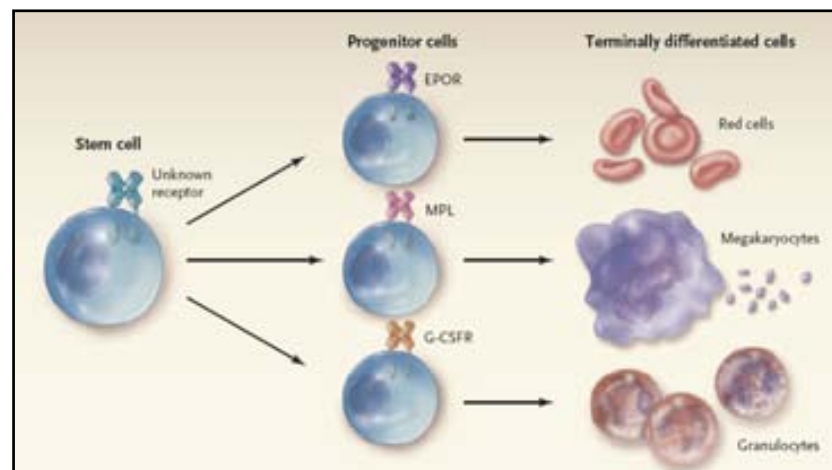


Figura 13. Esquema dels receptors implicats en la diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques (o *stem cell*) a les línies eritrocítica, megacariocítica i granulocítica (Campbell i cols. 2006a).

La proliferació anormal de cèl·lules hematopoètiques que caracteritza la TE i la PV fa pensar en l'existència d'una alteració en les vies de senyalització regulades per l'EPO i la TPO. L'evidència més clara és el creixement de colònies eritrocítiques i/o megacariocítiques en absència de factors de creixement hematopoètics (anomenat creixement endogen) en el cultiu *in vitro* de progenitors hematopoètics de pacients amb TE i PV (Florensa i cols. 1989 i 1995). A la vegada, també s'ha detectat hipersensibilitat dels progenitors hematopoètics a diverses citocines (Dai i cols. 1992; Correa i cols. 1994; Axelrad i cols. 2000).

Es creu que l'origen de la desregulació en les vies de senyalització dels factors de creixement hematopoètics rau en l'adquisició de diverses alteracions genètiques per part de la cèl·lula mare hematopoètica pluripotent. Aquestes afecten l'expressió dels components d'aquestes vies, la qual és diferent segons la malaltia. Un exemple clar és l'alteració dels nivells d'expressió de la TPO en la TE degut a anomalies del seu receptor i, per contra, uns nivells d'expressió d'EPO correctes en la PV.

A continuació s'exposen els canvis dels nivells d'expressió detectats en la TE i la PV:

-Nivells disminuïts d'expressió del receptor MPL: En la TE l'expressió de la TPO a SP és normal o elevada, amb nivells d'expressió semblants a les TR. En canvi, el receptor de la TPO, el MPL, presenta una expressió disminuïda degut a diferents mecanismes. El primer que es va identificar consistia en una glicosilació post-traducciona del receptor que impedeix la seva expressió a la membrana (Moliterno i cols. 1999). Posteriorment, s'han detectat altres alteracions, com la sobreexpressió del microARN (miARN) 28 (miR-28) en les plaquetes del 30% de pacients amb NMP. Aquest miARN és el responsable de la disminució de l'expressió del MPL ja que actua inhibint la seva traducció, així com també la d'altres gens que regulen la diferenciació megacariocítica (Girardot i cols. 2010).

Com a conseqüència d'aquests mecanismes, l'expressió del MPL es troba disminuïda en megacariòcits i plaquetes, (Mesa i cols. 2002; Teofili i cols. 2002a), però el receptor és hipersensible a l'efecte de la TPO (Axelrad i cols. 2000). En la PV, així com també en les TR i en les trombocitèmies hereditàries, també es detecta una menor expressió del MPL en megacariòcits i plaquetes, però es desconeix el mecanisme molecular responsable (Horikawa i cols. 1997; Moliterno i cols. 1998; Harrison i cols. 1999b; Yoon i cols. 2000). Els nivells de TPO a SP vénen controlats per la unió de la TPO amb el seu receptor, MPL, a través de la internalització i catabolisme de la TPO. Aquest sistema de regulació determina que les concentracions de TPO siguin inversament proporcionals a la massa plaquetària i megacariocítica, mantenint-les en equilibri (Fielder i cols. 1997). En la TE i la PV s'hipotetitza que el fet que l'MPL es trobi en quantitats menors a la membrana de les plaquetes i els megacariòcits comporta una desregulació dels nivells de TPO, de manera que existeix un excés de TPO (Pitcher i cols. 1997, Tahara i cols. 1996). Aquest excés de citocina actua sobre els receptors MPL restants que, tot i estar disminuïts, són hipersensibles a l'activació de la TPO, i s'activa així la proliferació megacariocítica.

-Sobreexpressió del gen policitemia rubra vera 1 (PRV-1): La detecció de la sobreexpressió del gen *PRV-1* en granulòcits de pacients amb TE i PV, i no en individus sans, va fer pensar que podia representar un nou marcador diagnòstic d'aquestes malalties (Temerinac i cols. 2000; Klippel i cols. 2004). No obstant, estudis posteriors han descrit resultats contradictoris (Teofili i cols. 2002b; Florensa i cols. 2004), fet que descarta l'estudi de l'expressió d'aquest gen com a marcador diagnòstic de la TE o PV.

-Nivells elevats de la proteïna Bcl-x_L: La Bcl-x_L és una proteïna antiapoptòtica que es sobreexpressa en els pacients amb PV, i podria explicar la supervivència de les colònies eritrocítiques en absència d'EPO (Silva i cols. 1998; Garçon i cols. 2006). En individus sans i en eritrocitosis secundàries, els valors de Bcl-x_L es troben molt disminuïts o absents.

1.2.2. Alteracions genètiques en la trombocitèmia essencial i en la policitèmia vera

1.2.2.1. Alteracions citogenètiques

Alteracions citogenètiques en la trombocitèmia essencial

En la TE les alteracions citogenètiques són poc freqüents, entre les que destaquen, per ordre de freqüència, les trisomies 8 i 9 i les delecions dels braços llargs dels cromosomes 13 (del(13q)) i 20 (del(20q)) (Third international Workshop 1981; Bench i cols. 1998). Aquestes alteracions no són específiques de la TE ja que també es troben en la PV. Mitjançant citogenètica convencional la freqüència de la detecció d'aquestes alteracions, en la MO i en el moment del diagnòstic, és del 5% dels pacients, mentre que amb la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) el nostre grup va demostrar que aquest percentatge s'incrementa fins a un 15% dels casos (Zamora i cols. 2003). Altres autors han descrit freqüències superiors però

corresponien a estudis de pacients que havien rebut tractament quimioterapèutic (Elis i cols. 1996). El nostre grup també va realitzar un estudi de FISH amb sondes de locus específiques no comercials pels gens *PRV-1*, *MPL* i *TPO* sense detectar alteracions en el nombre de còpies ni translocacions d'aquests gens que expliquessin les alteracions descrites dels seus nivells d'expressió (Puigdecanet i cols. 2006).

Posteriorment, amb l'aparició de la tècnica d'hibridació genòmica comparada utilitzant microarrays d'oligonucleòtids (*comparative genomic hybridization microarrays*, aCGH) s'han realitzat diferents estudis de tot el genoma i a una resolució molt superior a la de la citogenètica convencional. La tècnica d'aCGH té el potencial de detectar alteracions genòmiques submicroscòpiques no detectades prèviament per les tècniques anteriors i no requereix, a diferència de la citogenètica convencional, treballar amb cèl·lules en divisió. Tots els estudis genòmics mostren una freqüència molt baixa d'alteracions en la TE, poques de les quals són recurrents. Aquest fet suggereix que les alteracions genòmiques no tenen un paper en el desenvolupament de la malaltia (Borze i cols. 2008; Tefferi i cols. 2009; Stegelmann i cols. 2010).

Alteracions citogenètiques en la policitèmia vera

En la PV la detecció d'alteracions citogenètiques és més elevada que en la TE, amb una freqüència del 15-20% dels pacients al diagnòstic (Díez-Martín i cols. 1991), i la majoria són comunes amb les trobades en la TE. Per ordre de freqüència les alteracions detectades són: guanys a 9p, del(20q), trisomia 8, del(13q) i duplicacions de bandes inespecífiques d'1q i trisomies 1q (Mertens i cols. 1991; Najfeld i cols. 2002). La incidència i els tipus d'alteracions varien considerablement en funció de la fase de la malaltia, i s'incrementa a mesura que aquesta progressa, i en funció de si els pacients reben tractament citorreductor. Així, als 10 anys del diagnòstic, la incidència de les alteracions pot ser superior al 80%, sobretot en els pacients tractats amb quimioteràpia i en els que evolucionen a LAM (Díez-Martín i cols. 1991; Swolin i cols. 1988). Najfeld i cols. (Najfeld i cols. 2003) van estudiar per FISH l'estat del gen

PRV-1, utilitzant una sonda de locus específic no comercial, sense detectar cap alteració numèrica ni estructural que expliqués la sobreexpressió d'aquest gen en els pacients amb PV.

Més recentment, els estudis d'aCGH han confirmat la detecció de les alteracions característiques de la PV ja observades per citogenètica convencional i FISH, en una freqüència d'un 35% (9/26 pacients) en el treball de Tefferi i cols. (Tefferi i cols. 2009) i en un 11% (5/45 pacients) en l'estudi de Stegelmann i cols. (Stegelman i cols. 2010).

En comparació amb la TE, sembla que la PV presenta alteracions genòmiques amb una freqüència més elevada i amb major recurrència, fet que evidencia una relació més clara entre el desequilibri genòmic i la patogènesi de la PV i, molt probablement, amb l'evolució de la malaltia.

1.2.2.2. Detecció de mutacions en les neoplàsies mieloproliferatives

La patogènesi molecular de les NMP era pràcticament desconeguda fins l'any 2005, en que diferents grups van descriure l'existència d'una mutació en el gen *JAK2* (*JAK2V617F*), present en un més del 95% de les PV i en aproximadament un 50% de les TE i MP (Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a). En els dos anys posteriors es van identificar altres mutacions del gen *JAK2* en les PV (Pardanani i cols. 2007; Scott i cols. 2007) i mutacions en el receptor de la *TPO*, el gen *MPL*, en un 10% dels pacients amb MP i en el 3% de les TE (Pardanani i cols. 2006; Pikman i cols. 2006). Més recentment, s'han descobert noves mutacions que afecten a altres gens relacionats amb la fisiopatologia de les NMP.

La detecció d'aquestes mutacions, sobretot la *JAK2V617F*, ha canviat dràsticament el coneixement de la patogènesi de les NMP i el panorama diagnòstic d'aquestes malalties.

1.2.2.2.1. Mutacions del gen JAK2

El gen *JAK2* es localitza al cromosoma 9, en la banda citogenètica 9p24. Està format per 25 exons i la proteïna conté 1132 aminoàcids.

El JAK2 és un dels quatre membres de la família de les Janus tirosina cinases, juntament amb el JAK1, JAK3 i TYK2. Són proteïnes citoplasmàtiques amb activitat tirosina cinasa, les quals s'expressen de manera ubiqüa en les cèl·lules de mamífers, excepte el JAK3 l'expressió del qual es limita a les cèl·lules hematopoètiques. Aquests gens actuen principalment a través de les proteïnes *signal transducer and activator of transcription* (STAT) mitjançant la via de senyalització JAK/STAT. Altres vies amb les que interactuen les JAK són les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) i la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). Aquestes vies intervenen en diferents processos biològics importants per a la proliferació, la supervivència i l'homeostasi de diferents tipus cel·lulars, tals com les cèl·lules hematopoètiques i immunològiques (James i cols. 2005; Baker i cols. 2007; O'Sullivan i cols. 2007). Concretament, el gen *JAK2* juga un paper clau en la regulació de l'hematopoesi mitjançant la regulació de les senyals de receptors hematopoètics en resposta a les citocines o factors de creixement hematopoètics, tals com l'EPO i la TPO (Figura I4). Estudis en ratolins *knock-out* pel gen *JAK2* mostren que aquests moren com a conseqüència d'una eritropoesi ineficient (Parganas i cols. 1998), fet que confirma que aquest gen és indispensable en l'hematopoesi.

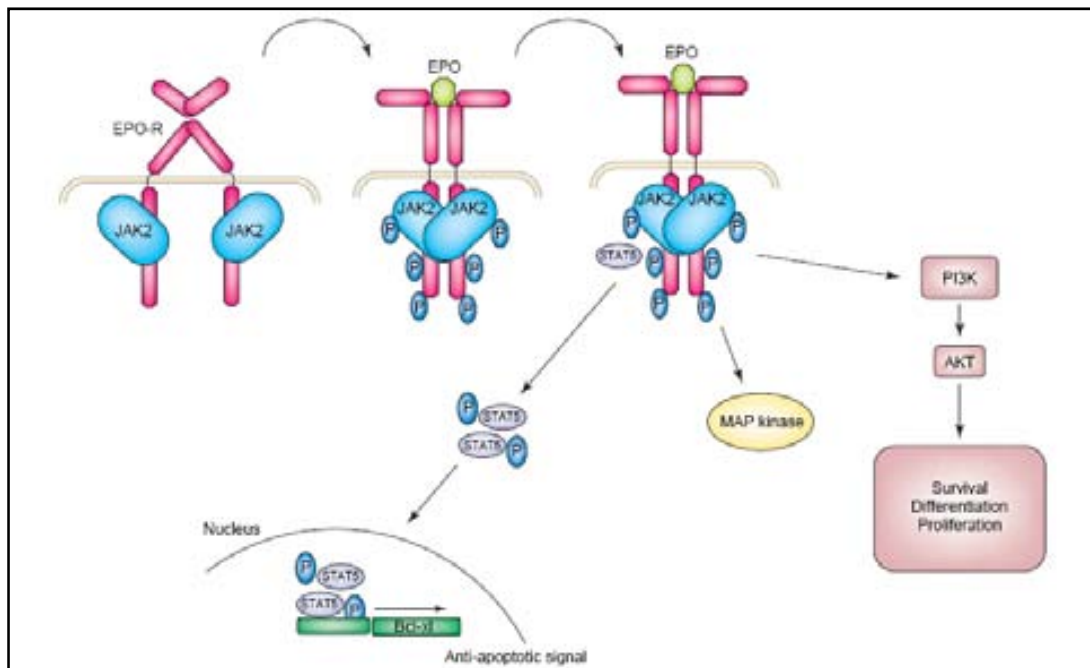


Figura 14. Esquema de la via de senyalització JAK-STAT amb el receptor de l'eritropoetina (EPO-R) (James i cols. 2005).

1.2.2.1.1. Mutació JAK2V617F

Descobriments de la mutació

Les pèrdues d'heterozigositat (*loss of heterozygosity*, LOH) són processos en els que majoritàriament per recombinació mitòtica apareixen regions d'homozigosi, en les que els al·lels d'ambdós cromosomes són idèntics. Les regions de LOH solen identificar fragments genòmics on es localitzen gens relacionats amb la carcinogènesi, ja que s'hi troben gens amb alteracions genètiques les quals en estat d'homozigosi confereixen un avantatge proliferatiu.

L'any 2002, Kralovics i cols (Kralovics i cols. 2002) van identificar una LOH en la regió 9p de pacients amb PV. Aquesta alteració es va trobar en un 33% dels pacients, essent l'alteració genòmica més freqüent en PV descrita fins aleshores. Es van seleccionar gens candidats presents en aquesta regió, entre els quals s'hi trobava el gen *JAK2*. Es van realitzar anàlisis de seqüenciació dels gens candidats i diferents grups al mateix temps van identificar la mutació *JAK2V617F* en pacients amb NMP

(Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a)
(Figura I5).

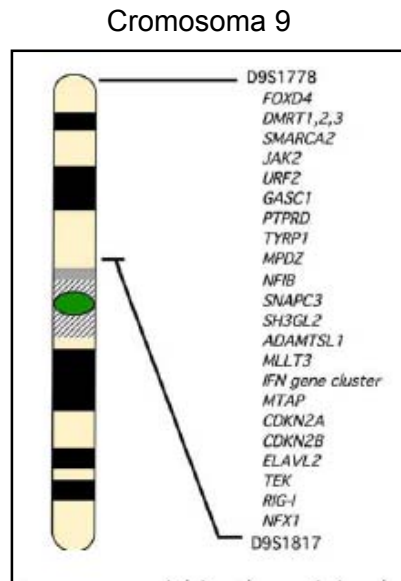


Figura I5. Llista dels gens candidats en la regió de LOH a 9p (Kralovics i cols. 2005b)

La mutació *JAK2V617F* es pot trobar en un heterozigosi, en el que només un dels dos al·lels és portador de la mutació, o bé en homozigosi, quan els dos al·lels estan mutats. És en aquest estat d'homozigosi quan es detecta una LOH en la regió 9p, on es localitza el gen (Figura I6).

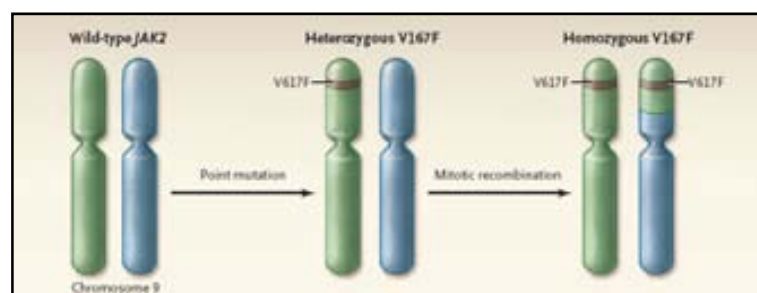


Figura I6. Esquema del diferents estats de la mutació *JAK2V617F* i dels mecanismes responsables (Campbell i cols. 2006a).

Estudis més actuals, en els que s'ha utilitzat la tècnica de microarrays que contenen sondes per la detecció de polimorfismes d'un sol nucleòtid (*single nucleotide*

polimorphisms, SNPs), anomenats SNP arrays, i que permeten l'estudi de regions d'homozigosi, han corroborat la presència de regions amb LOH a 9p en tots aquells pacients amb la mutació *JAK2V617F* en homozigosi (Gondek i cols. 2007; Stegelmann i cols. 2010).

Un altre mecanisme pel qual ens podem trobar en una situació d'homozigosi de la mutació *JAK2V617F* seria en els pacients amb trisomia del cromosoma 9, alteració citogenètica freqüent en la PV i en la TE, en les que s'hagi produït una duplicació del cromosoma 9 que contenia la mutació. En aquest cas ens trobaríem davant d'una situació de LOH però amb variació en el nombre de còpies.

Descripció de la mutació

El gen *JAK2* conté set dominis homòlegs dins la família JAK, denominats JH1-JH7. El gen té una estructura bipartita, amb la regió N-terminal (JH5-JH7) necessària per a la unió al receptor, i la regió C-terminal (JH1 i JH2) amb activitat cinasa.

La mutació consisteix en un canvi puntual d'un nucleòtid, d'una guanina (G) per una timina (T), en l'exó 14 del gen, que comporta un canvi d'una valina per una fenilalanina en l'aminoàcid número 617 (V617F). La mutació es localitza en el domini pseudocinasa (JH2) del gen *JAK2*, el qual exerceix una funció inhibidòria del domini amb activitat cinasa (JH1) (Figura I7).

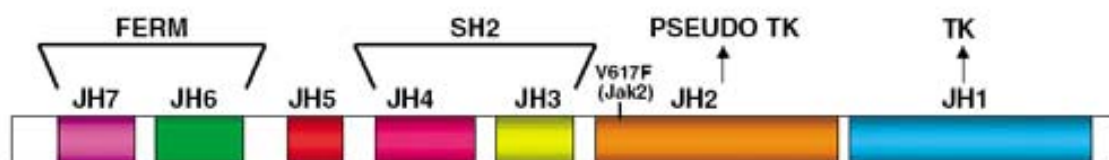


Figura I7. Estructura del gen *JAK2* (Baker i cols. 2007).

Com a conseqüència de la mutació es produeix una pèrdua de la capacitat inhibidora i una conseqüent activació constitutiva de les vies de senyalització regulades per aquest

gen, com són la via JAK/STAT, PI3K/AKT i la Ras/MAPK. Aquesta activació constitutiva indueix una hipersensibilitat i/o una independència dels progenitors mieloides a les citocines o factors de creixement hematopoètics, i permet explicar doncs el creixement endogen i la sobreproducció de cèl·lules mieloides madures, característiques de les NMP. Així, la *JAK2V617F* és la primera alteració genètica que s'associa directament amb la patogènesi de les NMP Ph- (Baxter i cols. 2005; Campbell i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a). Es desconeix el per què de l'elevada prevalença d'aquesta mutació, ja que existeixen altres mutacions en altres posicions del gen *JAK2* que també tenen un efecte activador de la tirosina cinasa (Kota i cols. 2008).

Respecte a l'activació de la via JAK-STAT Lu i cols. (2005) van demostrar que, malgrat l'activació constitutiva del gen *JAK2* provocada per la mutació, quan l'expressió del gen *JAK2V617F* és baixa es requereix la coexpressió dels receptors de citocines tipus I homodimèrics (tals com el receptor de l'EPO, de la TPO i del *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF)) i que aquests es trobin formant dímers, com succeeix en l'estat fisiològic. No obstant, quan els nivells d'expressió de *JAK2V617F* són més elevats l'activació constitutiva del gen és independent dels receptors de citocines tipus I, però utilitza receptors endògens (Lu i cols. 2008) (Figura I8). Així, es pot afirmar que el *JAK2V617F* requereix sempre l'unió a un receptor de citocina per tal d'activar les vies de senyalització *downstream*.

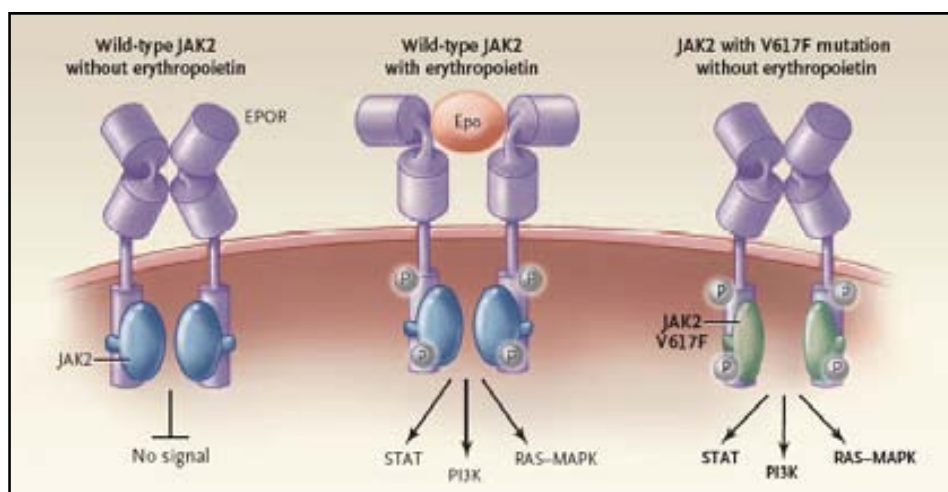


Figura 18. Esquema de la transducció de senyals de *JAK2* wild type i de *JAK2V617F* mitjançant el receptor de l'eritropoetina (EPOR) (Campbell i cols. 2006b). En la transducció de senyals del gen *JAK2* wild type es requereix la unió de citocines o factors de creixement hematopoètics (com l'EPO) als receptors de citocines tipus I (com l'EPOR) i la dimerització d'aquests receptors. En el cas de la mutació *JAK2V617F* l'activació de la via és independent de la unió de citocines o factors de creixement als receptors de citocines tipus I però sí que es requereix la dimerització dels receptors, excepte quan els nivells d'expressió de *JAK2V617F* són molt elevats.

Incidència de la mutació

La mutació *JAK2V617F* és present en el més del 95% de les PV, entre el 40 i 50% de les TE i en el 50% de les MP. També s'ha detectat la mutació en altres malalties mieloides, com en SMD/NMP (com l'anèmia refractària amb sideroblasts en anell i trombocitosi) (Renneville i cols. 2006; Atallah i cols. 2008; Raya i cols 2008; Schmitt-Graeff i cols. 2008; Broseus i cols. 2012) i més rarament en leucèmies agudes mieloides, SMD o LMC (Steensma 2005 i 2006; Hussein i cols. 2008; Inami i cols. 2008). És una alteració específica de la línia mioide (Florensa i cols. 2006), ja que no s'ha trobat en les malalties limfoides (Levine i cols. 2005b; Melzner i cols. 2006), i perquè afecta a les cèl·lules que presenten receptors de citocines tipus I, els quals només els trobem en aquesta línia hematopoètica (Lu i cols. 2005). A més, es pot

afirmar que és una mutació associada a processos neoplàsics ja que no es detecta en eritrocitosis i TR ni en individus sans (Tefferi i cols. 2005; Passamonti i cols. 2007).

1.2.2.2.1.2. Mutacions en l'exó 12 del gen *JAK2*

Estudis posteriors de seqüenciació del gen *JAK2* van identificar mutacions en l'exó 12 (Scott i cols. 2007). A diferència de la *JAK2V617F*, les mutacions detectades en l'exó 12 del gen *JAK2* són diverses, fins el moment més de 10, i sembla que són específiques dels pacients amb PV que no presenten la mutació *JAK2V617F* (Martinez-Avilés i cols. 2007; Pardanani i cols. 2007; Scott i cols. 2007; Butcher i cols. 2008; Pietra i cols. 2008). La freqüència d'aquestes mutacions és aproximadament del 3% (Pardanani i cols. 2007), entre les quals la N542-E543del és la més freqüent, i comporten, com la *JAK2V617F*, un guany de funció del gen. En els pacients amb TE i amb MP rarament s'han trobat mutacions en el gen *JAK2*, que no siguin la *JAK2V617F* (Scott i cols. 2011). Sembla doncs que són mutacions vinculades a l'eritrocitosis, i la detecció d'aquestes només en colònies eritrocítiques amb creixement endogen, i no en megacariòcits ni granulòcits, ho confirma (Passamonti i cols. 2011).

1.2.2.2.2. Mutacions del gen *MPL*

El gen *MPL*, receptor de la TPO, es localitza en el braç curt del cromosoma 1, a la banda citogenètica 1p34, i conté 12 exons que codifiquen per a una proteïna de 635-680 aminoàcids.

L'any 2006 dos grups van identificar mutacions en aquest gen, que es troben en el 10% dels pacients amb MP i en el 3% dels pacients amb TE, majoritàriament en els *JAK2V617F*-negatius però també en algun *JAK2V617F*-positiu, i no es detecten en la PV (Pardanani i cols. 2006; Pikman i cols. 2006).

Les dues mutacions més freqüents afecten l'aminoàcid 515 i són la *MPLW515L* i la *MPLW515K*. Les mutacions del gen *MPL* es poden trobar en homozigosi degut a fenòmens de LOH, com en el cas de la *JAK2V617F* (Szpurka i cols. 2009).

Les mutacions *MPLW515L/K* es localitzen en la regió codificant pel domini juxtamembrana del receptor i ocasionen una activació constitutiva de la via de senyalització JAK/STAT estimulada per la TPO, amb un efecte similar al de *JAK2V617F* i que explicaria la proliferació megacariocítica característica de la TE (Figura I9). No obstant, les mutacions no provoquen canvis en l'expressió del receptor, així que no permeten explicar la disminució d'expressió de receptors MPL observada en les NMP (Moliterno i cols. 1998). Per tant, existeixen mecanismes patogènics independents que alteren la funcionalitat o l'expressió del MPL en les NMP.

En casos aïllats de TE esporàdica (Beer i cols. 2008) o familiar (Ding i cols. 2004) s'han descrit mutacions en el domini transmembrana (MPLS505N i MPLS505A, respectivament), també activadores de la funció del receptor.

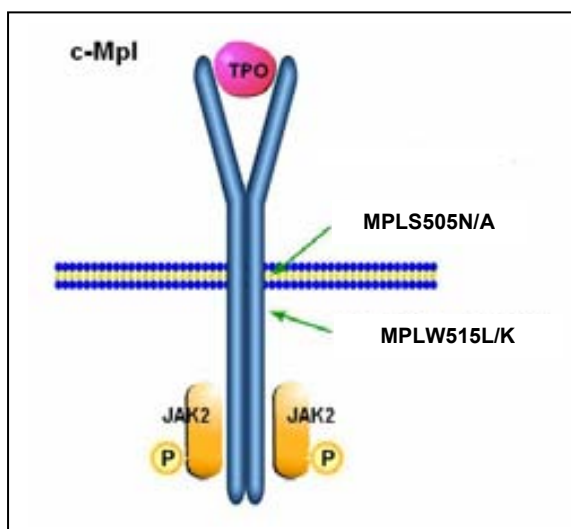


Figura I9. Esquema de la localització de les mutacions en el receptor MPL (Adaptat de Bennett i cols. 2006)

1.2.2.2.3. Altres mutacions

En els últims 5 anys s'han descobert noves mutacions en les NMP que amplien el ventall d'alteracions genètiques que defineixen aquest grup de malalties. No obstant, no representen marcadors específics de les NMP ja que també es troben en altres neoplàsies mieloides. Aproximadament un 15% dels pacients amb NMP comparteixen aquestes mutacions amb pacients amb SMD i amb LAM.

La incidència de les mutacions varia segons la neoplàsia i la fase de la malaltia. Així, en les NMP les mutacions més comuns són les detectades en el gens reguladors dels mecanismes epigenètics *ten eleven translocation oncogene family member 2 (TET2)* (Delhommeau i cols. 2009; Tefferi i cols. 2009; Martínez-Avilés i cols. 2011) i el gen *additional sex combs-like 1 (ASXL1)* (Carbuccia i cols. 2009; Abdel-Wahab i cols. 2010; Martínez-Avilés i cols. 2011). En els pacients NMP que evolucionen a LAM es troben mutacions en els gens *isocitrate dehydrogenase (IDH1 i IDH2)*, *ASXL1* i *IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1)*. En la taula I5 es descriuen les mutacions detectades en la TE, PV, MP i NMP en transformació blàstica.

Taula 15. Mutacions en la TE, PV, MP i NMP en transformació blàstica. Taula modificada de Cross i cols. (2011).

| Gen | Mutació o altres alteracions | Localització cromosòmica | Freqüència mutació en NMP, % dels casos | | | | Rellevància patològica |
|---|--------------------------------|--------------------------|---|-------|-------|------------------------|--|
| | | | TE | PV | MP | Transformació blàstica | |
| JAK2 (<i>Janus Kinase 2</i>) | JAK2V617F (Exó 14) | 9p24 | 60 | 95-97 | 60 | 50 | Contribueix a la mieloproliferació i a la hipersensibilitat dels progenitors als factors de creixement |
| JAK2 (<i>Janus Kinase 2</i>) | Exó 12 | 9p24 | Rar | 1-2 | Rar | nc | Contribueix a la mieloproliferació primària de la línia eritroide |
| MPL (<i>Myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>) | Exó 10 | 1p34 | 3-5 | Rar | 5-10 | nc | Contribueix a la mieloproliferació primària de la línia megacariocítica |
| CBL (<i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>) | Exó 8 i 9 | 11q23 | Rar | Rar | 5-10 | nc | Altera la funció reguladora de la senyalització de cinases, per una ubiquitilació ineficient d'oncoproteïnes |
| SH2B3 (<i>SH2B adaptor protein 3</i>) | Majoria Exó 2 | 12q24 | 3-6 | 1 | 3-6 | 10 | La proteïna (LNK) <i>wild type</i> és un inhibidor de la via de JAK2 |
| TET2 (<i>TET oncogene family member 2</i>) | Tots els exons | 4q24 | 5 | 10-20 | 10-20 | 20 | Pot contribuir a la desregulació epigenètica |
| IDH1/2 (<i>Isocitrate dehydrogenase</i>) | Exó 4. (IDH1-R132 o IDH2-R140) | 2q34/15q26 | Rar | Rar | 6 | 20-36 | Indueix l'acumulació de 2-hidroxi-glutarat, una possible oncoproteïna |
| ASXL1 (<i>Additional sex combs-like 1</i>) | Exó 12 | 20q11 | 2-5 | 2-5 | 13-20 | 20 | Gen necessari per a una hematopoesi normal i pot estar implicat en la repressió transcripcional |
| EZH2 (<i>enhancer of zeste homolog 2</i>) | Exons 10, 18 i 20 | 7q36 | 1 | 1-3 | 5-10 | nc | Altera l'activitat supressora tumoral de la proteïna <i>wild type</i> |
| DNMT3a (<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha</i>) | Mutacions i delecions | 2p23 | 1-5 | 5-10 | 5-10 | 20 | Pot contribuir a la desregulació epigenètica |
| IKZF1 (<i>IKAROS family zinc finger 1</i>) | Delecions | 7p12 | Rar | Rar | Rar | 20 | Altera l'activitat supressora tumoral de la proteïna <i>wild type</i> |

nc: no conegut; TE: trombocitèmia essencial; PV: policitèmia vera; MP: mielofibrosi primària

Les conseqüències funcionals de les mutacions descrites recentment són l'afectació de diferents funcions i vies de senyalització que tenen un paper en la patogènesi i evolució de les NMP (Figura I10). Tot i així, els resultats són molt recents i encara falten dades per a conèixer com aquestes mutacions contribueixen a l'inici, evolució i transformació blàstica de la malaltia.

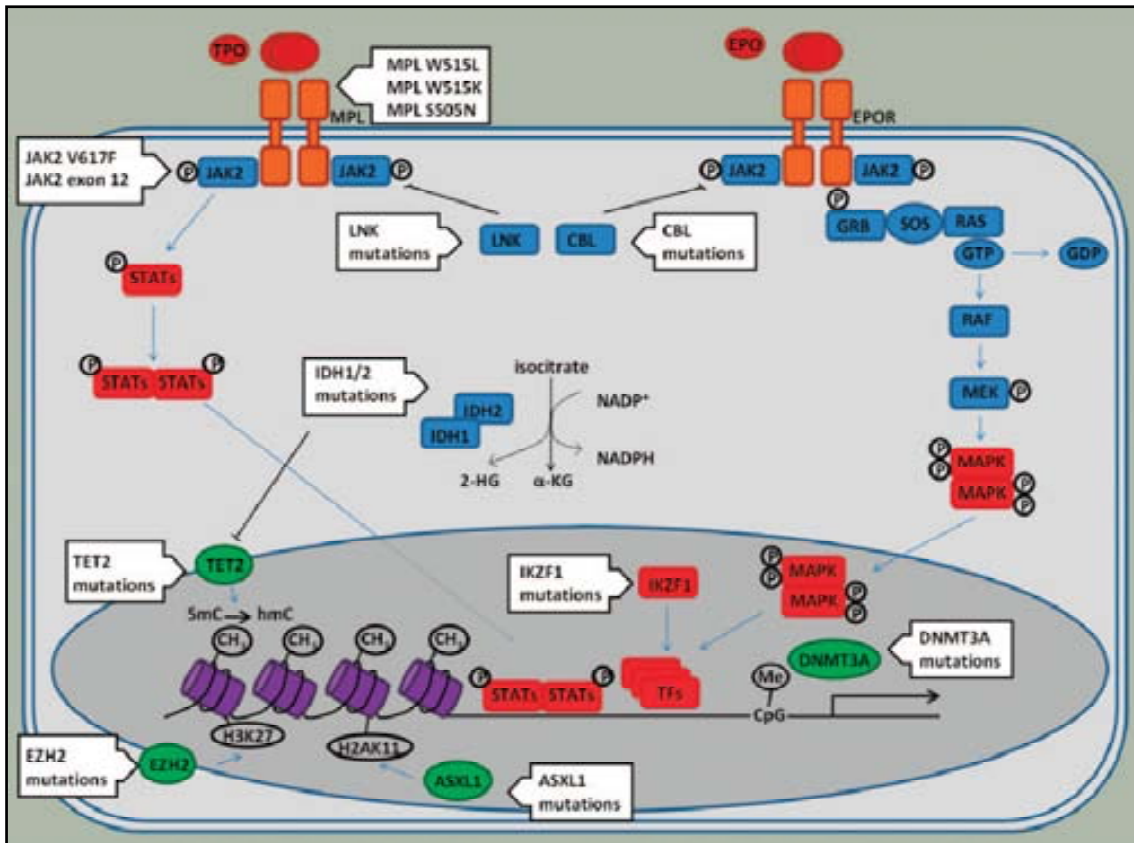


Figura I10. Resum de les alteracions adquirides en les neoplàsies mieloproliferatives i detallades a la taula I5 (Cross i cols. 2011).

Malgrat el progrés en els coneixements moleculars de les NMP d'aquests últims anys, les alteracions genètiques causants d'aproximadament el 50% dels pacients en TE i MP, i una petita part dels pacients amb PV, encara són desconegudes. Els estudis prospectius es centren en la recerca de noves mutacions somàtiques en les regions en les que les alteracions citogenètiques en NMP són freqüents, com la regió 20q i en les regions de LOH definides per la tècnica d'alta resolució d'SNP arrays, o bé realitzant

seqüenciació global del genoma o exoma utilitzant la tècnica de seqüenciació de nova generació (Hou i cols. 2012). Altres camps d'estudi són tots aquells que inclouen la regulació del transcriptoma dels NMP, tals com l'estudi dels miRNAs i dels mecanismes epigenètics, com la metilació i l'acetilació d'histones.

1.2.3. Relació genotip-fenotip

La correlació entre les diferents mutacions detectades en les NMP i el fenotip de la malaltia que originen no sempre és clara.

La correlació és consistent entre la presència de les mutacions en l'exó 12 del gen *JAK2* i un fenotip de PV, i entre les mutacions del gen *MPL* i el fenotip de TE i MP. En el cas del *MPL*, l'afectació específica de la línia megacariocítica s'explica pel paper que exerceix aquest gen en la megacariopoèsi. L'afectació restringida a la línia eritrocítica de les mutacions de l'exó 12 del gen *JAK2* és més difícil d'explicar, ja que tant la *JAK2V617F* com les mutacions en l'exó 12 actuen a través del mateix domini tirosina cinasa. La mutació *JAK2V617F*, en canvi, en la PV ocasiona una proliferació de les tres línies mieloides, i en alguns casos un fenotip de TE o MP.

Respecte les TE portadores de la *JAK2V617F*, inicialment es pensava que representaven un estadi previ a la PV (Campbell i cols. 2006b), però dades posteriors evidencien que la TE i la PV *JAK2V617F*-positives són subgrups molecularment diferents. La mutació apareix inicialment en un estat heterozigot i, per recombinació mitòtica, pot passar a un estat homozigot. Aquest fenomen és rar en les TE *JAK2V617F*, en les quals la mutació es troba en estat homozigot en només un 2% dels pacients, però és freqüent en les PV, en les que es detecta en un 25% dels malalts (Levine i cols. 2005a; Li i cols. 2008).

Les noves mutacions detectades, com en el gen *TET2* o el *Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene (CBL)*, no estan relacionades amb un fenotip específic però sí que sembla que influencien en l'evolució de la malaltia.

Com una mateixa mutació (JAK2V617F) pot originar fenotips diferents?

S'han postulat diferents hipòtesis per a intentar explicar com una mateixa mutació adquirida, la *JAK2V617F*, pot induir a tres malalties diferents. La més acceptada és la basada en que la dosificació gènica determina el fenotip. Els estudis que s'han realitzat en models murins apunten que un dels factors que determina el fenotip és la ratio entre l'expressió de l'al·lel *JAK2V617F* i l'al·lel *JAK2* no mutat o *wild type* (wt), de manera que una ratio de 0,5 entre l'al·lel mutat i wt ocasiona un fenotip de TE i una ratio al voltant de 1,0 o major de PV (Tiedt i cols. 2008). En la càrrega al·lèlica dels pacients amb TE i PV trobem una situació semblant al model murí, on la *JAK2V617F* es presenta en heterozigosi en la TE i amb una càrrega superior en la PV. No obstant, en altres models murins no s'observa realment aquesta progressió esperable de TE, PV i MP, ja que normalment apareix un fenotip d'eritrocitosi seguit eventualment per MP (Tiedt i cols. 2008; Xing i cols. 2008; Marty i cols. 2010; Li i cols. 2010).

Així, les manifestacions clíniques dels pacients amb TE, PV i MP vénen en part determinades per l'adquisició de la mutació *JAK2V617F*, en estadis i en una proporció de població cel·lular afectada diferents, però també per altres alteracions genètiques adquirides durant l'evolució de la malaltia així com del rerefons genètic del pacient.

1.2.4. Evolució clonal en les neoplàsies mieloproliferatives

El paradigma del càncer és l'adquisició seqüencial de mutacions en una mateixa clona, com succeeix en la clona *BCR/ABL* positiva en la LMC. No obstant, sembla que en les NMP Ph- predomina la coexistència de diferents clones, les quals deriven de cèl·lules mare hematopoètiques (*hematopoietic stem cell*, HSC) independents que han adquirit alteracions genètiques diferents. Les HSC portadores de les alteracions i les genèticament normals coexisteixen a la MO (James i cols. 2008; Stein i cols. 2011) en un equilibri que es pot veure trencat per l'expansió d'una de les clones i derivar en un estatus de dominància clonal. És llavors quan, mitjançant estudis de detecció de clonalitat, es detecten pacients amb un patró clonal. En el cas que no existeixi cap clona dominant no es detectarà un patró clonal en aquell pacient.

Les alteracions genètiques en les NMP es poden adquirir en diferents subtipus de HSC (Dykstra i cols. 2007) i poden influenciar en el fenotip que originen i en la latència de la malaltia.

Els estudis de creixement de progenitors hematopoètics partint de colònies individuals, cadascuna de les quals prové d'un únic progenitor, han permès detectar la presència de diferents clones en un mateix pacient. Aquestes divergeixen en la presència o absència d'alteracions genètiques, en el tipus d'alteracions que presenten i, en les colònies *JAK2V617F*-positives, en l'estat de la mutació (homozigosi o heterozigosi) (Scott i cols. 2006). A la vegada, l'estudi de les noves mutacions detectades, junt amb altres alteracions moleculars com la del(20q), han permès establir un patró d'evolució clonal en aquests pacients, en que algunes alteracions genètiques coexisteixen dins una mateixa clona i s'adquireixen de manera seqüencial. No obstant, els resultats són discrepants i demostren que no existeix un patró estandaritzat d'adquisició d'alteracions (Li i cols. 2008; Schaub i cols. 2009; Beer i cols. 2009).

Inicialment es creia que el fenomen iniciador de les NMP era l'adquisició de les mutacions en el gen *JAK2* o en el *MPL*, però diferents evidències permeten hipotetitzar que existeixen esdeveniments genètics pre-*JAK2*:

A. En estudis de clonalitat es detecten, tot i que en una baixa proporció, pacients amb clonalitat però no portadors de la mutació *JAK2V617F*.

B. En estudis citogenètics en pacients que presenten la del(20q) aquesta és present en totes les metafases mentre que la *JAK2V617F* només es troba en algunes de les cèl·lules portadores de la deleció (Kralovics i cols. 2006)

C. S'observa creixement endogen de progenitors mieloides en colònies NMP *JAK2V617F*-negatives.

D. Les mutacions en *TET2* és una de les mutacions en les que s'ha pogut demostrar que s'adquireixen prèviament a *JAK2V617F*. En la majoria dels pacients amb NMP, la *JAK2V617F* ve precedida per mutacions en *TET2* (Delhommeau i cols. 2009), tot i que

també s'ha observat posteriorment (Saint-Martin i cols. 2009), i, fins i tot, també en clones independents a *JAK2V617F* (Schaub i cols. 2010).

Aproximadament un 5-8% dels pacients amb TE i PV evolucionen a LAM (Najean i cols. 1997; Mesa i cols. 2005) i es creu que aquesta transformació està afavorida per la presència de la *JAK2V617F*. No obstant, en més del 50% dels pacients amb NMP *JAK2V617F*-positius que es transformen a LAM els blastes no són portadors de la mutació (Campbell i cols. 2006b, Theocharides i cols. 2007). Aquest fet suggereix que existeix un ancestre comú que ja presenta alteracions genètiques que predisposen al desenvolupament d'ambdues malalties o bé que existeix una predisposició germinal (Campbell i cols. 2006b; Theocharides i cols. 2007; Beer i cols. 2010). En aquest context, Hernández-Boluda i cols. (2012) han descrit una associació entre un polimorfisme en el gen *XPB* i un major risc de desenvolupament de LAM o de neoplàsies no mieloides en pacients amb TE i PV.

L'elevada freqüència de la presència de diferents clones en les NMP i de cèl·lules *JAK2V617F*-negatives en les LAM post NMP *JAK2V617F*-positius fa pensar que els pacients amb NMP presenten una predisposició genètica en l'adquisició d'alteracions, prèvia a l'adquisició de *JAK2V617F*. Estudis recents han identificat l'haplotip anomenat "GGCC" o 46/1 en un 30% de la població general que determina un risc de 3 a 4 vegades superior a adquirir la mutació *JAK2V617F* (Jones i cols. 2009; Kilpivaara i cols. 2009; Olcaydu i cols. 2009a), i en menor grau les mutacions en l'exó 12 (Olcaydu i cols. 2009b). Aquests resultats han demostrat una predisposició heretada a adquirir la mutació *JAK2V617F*, i en NMP poden existir altres alteracions a la línia germinal, probablement en menor freqüència, que predisposin a l'adquisició de les altres alteracions detectades en NMP.

A part d'existir una predisposició genètica a l'adquisició de les mutacions en el gen *JAK2* també s'ha descrit que la *JAK2V617F*, un cop establerta, confereix inestabilitat genòmica i potencia l'adquisició de noves alteracions genètiques en els pacients

portadors de la *JAK2V617F* (Plo i cols. 2008). Treballs posteriors, com el de Tefferi i cols. (Tefferi i cols. 2008) en el que utilitzen la tècnica d'aCGH, demostren un major nombre d'alteracions en els pacients amb TE, PV i MP portadors de *JAK2V617F*.

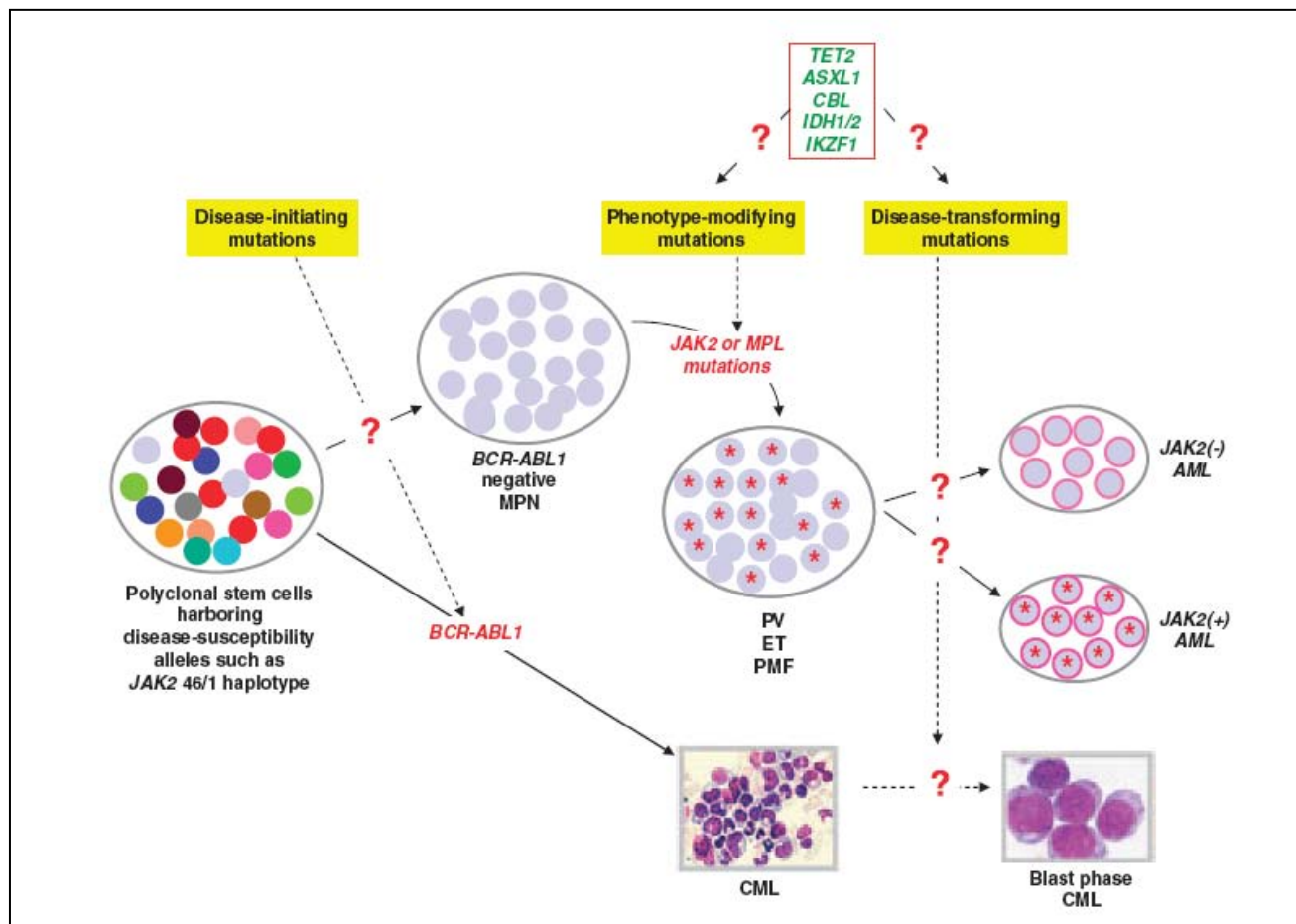


Figura I11. Origen clonal i evolució de les neoplàsies mieloproliferatives (Tefferi i cols. 2010)

1.2.5. Desenvolupament de noves teràpies en les neoplàsies mieloproliferatives

La detecció de les mutacions en el gen *JAK2* (*JAK2V617F* i mutacions en l'exó 12 del gen) en una gran proporció dels pacients amb NMP ha establert la inhibició de l'activació de la tirosina cinasa *JAK2* com una diana terapèutica en aquests pacients.

Així, les noves teràpies en els pacients en NMP es centren en el desenvolupament de fàrmacs inhibidors de la tirosina cinasa *JAK2*.

Diferents empreses farmacèutiques han desenvolupat inhibidors de *JAK2* i actualment s'estan realitzant els assaigs clínics per a ser aprovats per la FDA (*Food and Drug*

Administration). Els resultats són preliminars però sembla que aquest nou grup de fàrmacs presenten bona tolerància i una resposta elevada en els pacients. Els fàrmacs disminueixen la càrrega al·lèlica de mutacions en *JAK2* i normalitzen els paràmetres hematològics alterats en NMP (com la leucocitosi i la trombocitosi) i l'esplenomegàlia. Per altra banda, també aconsegueixen reduir els símptomes constitucionals.

Entre els inhibidors de *JAK2*, els fàrmacs que obtenen una major resposta clínica són l'INCB018424 (ruxolitinib) (inhibidor de *JAK1* i *JAK2*) i el TG101348 (inhibidor *JAK2*) (Verstovsek i cols. 2009 i 2010). També s'estan desenvolupant fàrmacs que actuen en altre vies oncogèniques, com els inhibidors de cinases no específics de *JAK2*, com el CEP-701 (lestaurtinib), i els inhibidors de la deacetilació d'histones, com l'ITF2357 (givinostat) (Santos i cols. 2011).

De tot el ventall de noves teràpies en NMP sembla que seran més efectives aquelles específiques de *JAK2*, però encara calen més assaigs clínics per a demostrar-ho. Independentment de quins siguin els fàrmacs d'elecció, tot apunta a una millora en la teràpia dels pacients amb NMP, i conseqüentment en el seu pronòstic.

1.3. ESTUDIS DE MICROARRAYS D'EXPRESSIONI EN LES NEOPLÀSIES MIELOPROLIFERATIVES

1.3.1. Microarrays d'expressió

El desenvolupament de la tecnologia de microarrays, la qual va aparèixer l'any 1995 (Schena i cols. 1995), junt amb el desxiframent de la seqüència completa del genoma humà, l'any 2003, han revolucionat el coneixement dels processos cel·lulars. Tot i que en totes les cèl·lules del nostre cos l'ADN genòmic és idèntic, cada cèl·lula expressa diferents gens, en forma d'ARN missatger (ARNm), els quals li confereixen les característiques del tipus cel·lular al que pertany i del procés biològic en el que està implicat. La tecnologia de microarrays permet l'anàlisi simultani de l'expressió de milers de gens i permet conèixer el perfil molecular i les xarxes genètiques que defineixen un tipus cel·lular o condició. Aquesta capacitat d'anàlisi és molt potent per a desxifrar malalties complexes com el càncer.

1.3.1.1. Microarrays d'ADN

Els microarrays d'ADN consisteixen en un suport sòlid (membrana de niló, vidre o plàstic) en el qual s'hi troben fixades diferents seqüències d'ADN de cadena única (ssDNA, *single strand DNA*) anomenades sondes. La disposició de les sondes sobre el suport és en forma de matriu, en files i columnes, i es coneix la localització de cada sonda en el microarray (*spot*) (Figura 112). El contingut dels microarray pot ser variable però generalment conté sondes que cobreixen tots els gens, per tal de realitzar una anàlisi d'expressió completa. El microarray s'exposa a les seqüències d'ARNm procedents d'una mostra biològica o *target* i, per complementarietat, s'hibriden a les sondes específiques que hi ha fixades. Les seqüències *target* es marquen amb fluorescència, de manera que es pot detectar i quantificar la hibridació de cada *spot*. El principi d'anàlisi rau en que la intensitat de fluorescència és relativa a la quantitat d'ARNm present en la mostra biològica estudiada. Una vegada s'obtenen les dades

d'intensitat de cada *spot* aquestes s'analitzen bioinformàticament. Es requereixen eines estadístiques i bioinformàtiques molt potents degut a la gran quantitat de dades que es generen.

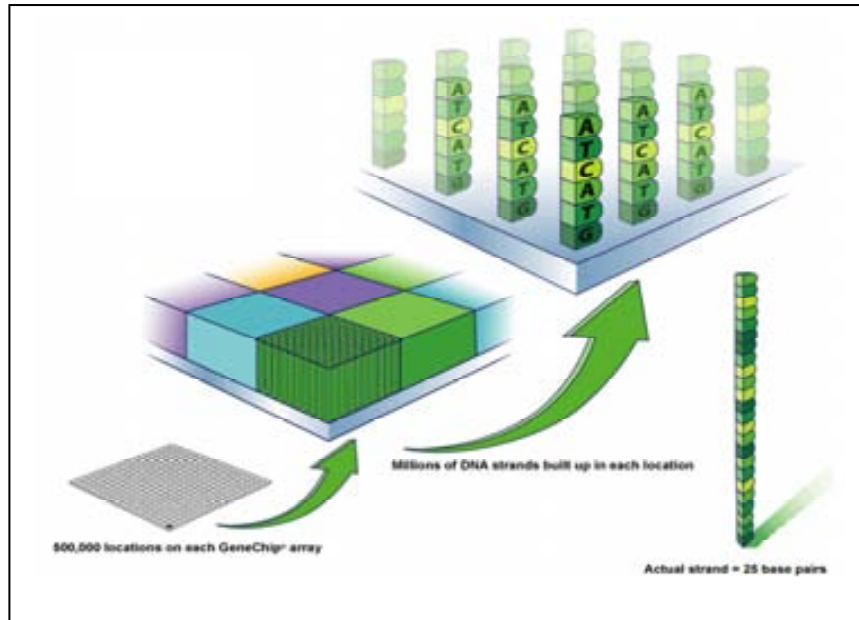


Figura I12. Esquema de la disposició de les sondes d'oligonucleotids en cada *spot* del microarray.

Existeixen dos tipus principals de microarrays d'ADN, que es diferencien pel mètode de fabricació i de mesura de l'expressió gènica (Figura I13):

A. Microarrays d'ADN complementari

Les sondes dels microarrays d'ADN complementari (ADNc) són els productes d'amplificació, obtinguts per PCR (*Polymerase chain reaction*), de biblioteques d'ADNc. Aquests productes són ADNc de doble cadena i s'imprimeixen (o *spotegen*) al microarray utilitzant robots. La mida d'aquestes sondes és bastant gran (des de 100 a 1.000 nucleòtids), fet que limita la densitat de sondes del microarray. No obstant, el sistema de fabricació d'aquest tipus de microarray fa que sigui una plataforma molt flexible i més econòmica. Típicament, s'utilitza la tècnica de doble marcatge de fluorescència, en la que s'hibriden conjuntament dues mostres d'ARNm, una marcada

amb el fluorocrom Cy5 (vermell) i l'altra amb el fluorocrom Cy3 (verd). Aquest tipus d'hibridació s'anomena hibridació competitiva, ja que cada mostra competeix amb l'altra per tal d'unir-se específicament a la sonda complementària. La quantificació de la intensitat de cada *spot* és relativa a la quantitat d'ARNm d'una mostra respecte a l'altra. El tipus d'estudi més habitual és la hibridació competitiva d'una mostra problema amb una mostra control o de referència (Kuo i cols. 2004; Draghici i cols. 2003) (Figura I13).

B. Microarrays d'oligonucleòtids

Les sondes dels microarrays d'oligonucleòtids es sintetitzen *in situ*, és a dir, directament sobre el suport del microarray. A diferència dels microarrays d'ADNc, no hi ha cap pas de clonatge, ni d'amplificació ni d'impressió de les sondes, fet que redueix molt el soroll present en els microarrays d'ADNc. Aquest tipus de fabricació comporta sintetitzar sondes més curtes (d'entre 25 a 80 nucleòtids), les quals són menys específiques però que permeten dissenyar microarrays d'elevada densitat. Les sondes es dissenyen a partir de les seqüències descrites en bases de dades públiques, com GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Draghici i cols. 2003; Kuo i cols. 2004). Els microarrays d'oligonucleòtids estan disponibles a través de diferents cases comercials, en diversos formats i plataformes que poden contenir actualment més de cinc milions de sondes. Generalment, el seu procés d'hibridació és no competitiu; és a dir, únicament s'hibrida una mostra en cada microarray, marcada amb un sol fluorocrom. La intensitat del senyal de cada *spot* és absoluta i proporcional a la quantitat d'ARNm de la mostra (Figura I13).

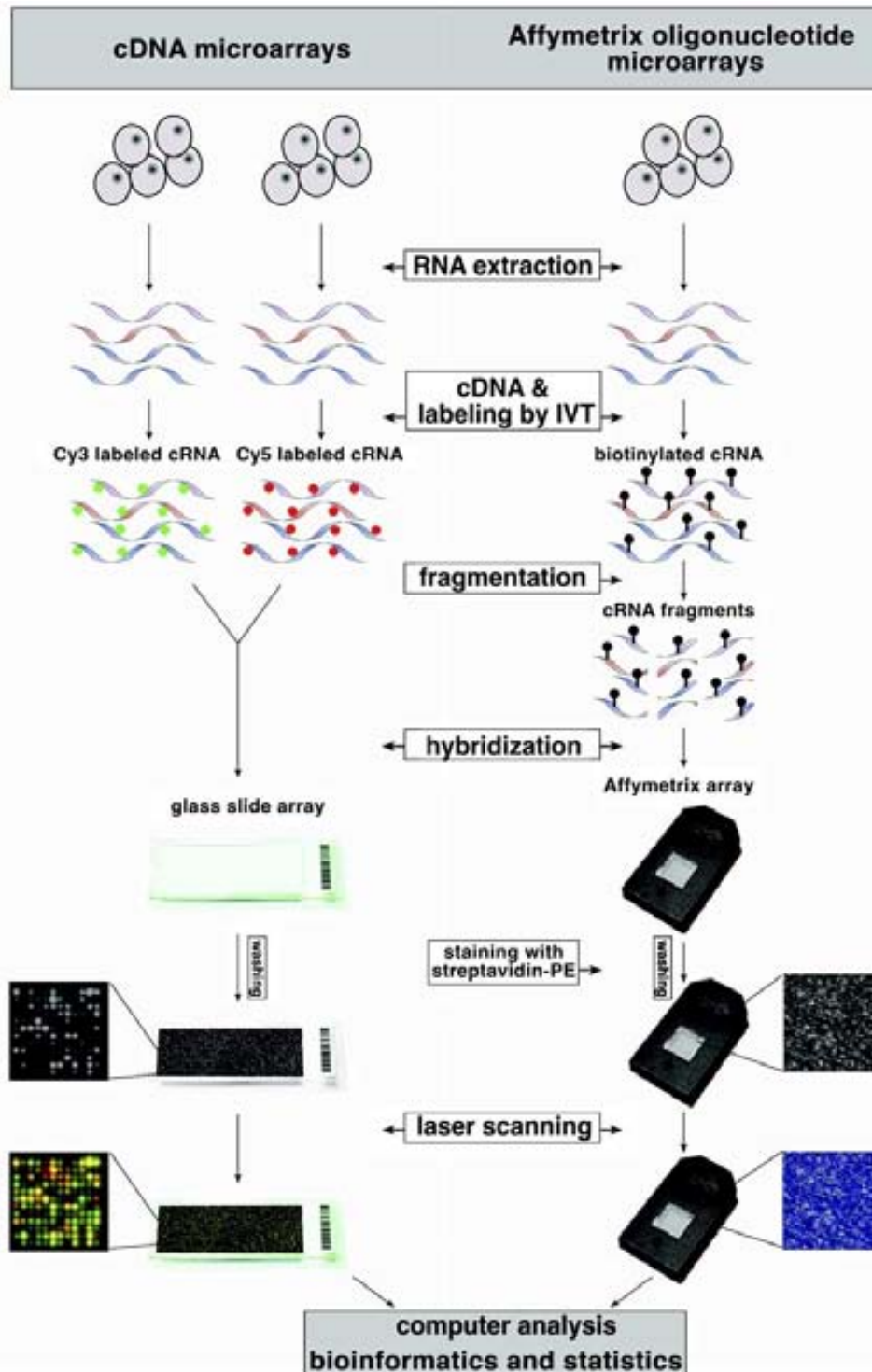


Figura I13. Comparació dels dos tipus de microarrays: els microarrays d'ADNc en els que s'utilitza el mètode d'hibridació competitiva, i els microarrays d'oligonucleòtids, en aquest exemple microarrays de la casa comercial d'Affymetrix, en el que s'utilitza el mètode d'hibridació no competitiva (Margalit i cols. 2004).

En el present treball s'han utilitzat els microarrays d'oligonucleòtids de la casa comercial Agilent. S'ha processat el microarray d'alta densitat *44K Whole Human Genome oligonucleotide microarray* i s'ha hibridat competitivament ARN procedent de granulòcits de SP de les mostres problema (pacients amb TE) amb ARN extret d'un *pool* de 10 individus sans.

1.3.1.2. Metodologia dels microarrays d'expressió gènica

La metodologia dels microarrays d'expressió gènica consta dels següents passos:

1. Disseny de l'experiment

El disseny de l'experiment és el punt més important a tenir en compte quan es realitza un experiment de microarrays. El disseny de l'experiment ha de permetre respondre a una hipòtesi biològica. Cal escollir correctament el tipus de mostra a estudiar (exemple: teixit tumoral) i la mostra a la que volem comparar (exemple: el mateix tipus de teixit però sa). És important també estudiar un mínim de mostres de cada condició i treballar amb mostres d'ARN de qualitat.

2. Processament de la mostra i hibridació al microarray

El processament de la mostra, en termes generals, consisteix en partir d'una quantitat concreta d'ARN total, retrotranscriure a ADNc, amplificar, marcar amb fluorescència i hibridar la mostra al microarray d'expressió. Una vegada hibridat es realitzen els rentats, per tal d'eliminar les unions inespecífiques, i l'escanejat del microarray. Com a resultat s'obté la imatge escanejada, amb els valors d'intensitat corresponents a cada *spot* en forma de matriu. El processament de la mostra s'explica detalladament a l'apartat 3.2.1.5 de material i mètodes.

3. Anàlisi de les dades

L'anàlisi de les dades consta de diferents passos bàsics:

A. Anàlisi de la qualitat de les dades dels microarrays: l'anàlisi de la qualitat de les dades generades per cada microarray és un pas imprescindible per tal de detectar possibles errors tècnics al laboratori. L'anàlisi de qualitat inclou la valoració de la imatge escanejada (per a detectar taques en el microarray, etc.) i diferents anàlisis estadístiques i eines de visualització que ens comparen els resultats de tots els microarrays de l'estudi. Les gràfiques més utilitzades són els *box-plots*, gràfiques de densitat i l'anàlisi de components principals (PCA, *Principal Component Analysis*). L'objectiu és detectar gràficament si en el conjunt de l'experiment la qualitat és correcta i identificar si hi ha alguna mostra que es desvia de la resta de l'experiment.

B. Preprocessament i normalització: El preprocessament de les dades inclou l'extracció dels valors quantitius del senyal de fluorescència de cada sonda a partir de la imatge escanejada del microarray. Durant aquest procés d'extracció es fa una correcció del soroll de fons (o *background*) per tal d'excloure les intensitats de senyal inespecífiques de l'*spot*. Un cop extretes les dades, aquestes es poden filtrar per tal d'eliminar aquelles sondes amb poca expressió, que introduirien soroll en l'anàlisi estadística. Posteriorment, s'apliquen diferents algorismes, tals com l'RMA (*Robust Multi-Array Average*) (Irizarry i cols. 2003), per tal de normalitzar les dades. La normalització és una correcció de les dades l'objectiu de la qual és eliminar la variabilitat entre els diferents microarrays, originada per variacions tècniques. És un pas necessari previ a l'anàlisi de les dades però també delicat, ja que en tota normalització s'elimina també informació biològica. Per aquest motiu l'algorisme escollit per a la normalització condiciona els resultats (Draghici i cols. 2003). Una vegada realitzada la normalització de les dades un pas opcional i també delicat és el filtratge de les dades.

C. Anàlisi dels gens diferencialment expressats: és l'anàlisi de dades pròpiament dit. Es basa en la cerca de grups de gens diferencialment expressats entre dues o més condicions que ens aportin informació biològica en l'experiment que hem realitzat. Per a l'anàlisi dels gens diferencialment expressats s'utilitzen diferents mètodes estadístics, com els tests paramètrics (t-Test Student i l'ANOVA (ANalysis of VAriance)) i test no paramètrics (com el test de la U Mann-Whitney U, el test Kruskal-Wallis i el SAM (*Significance Analysis of Microarrays*)) (Stall i cols. 2006; Allison i cols. 2006). Per a cada gen es crea la hipòtesi de si aquest està diferencialment expressat o no i s'aplica un test estadístic. Com que cada experiment inclou milers de gens, aquest mostreig d'hipòtesi múltiple s'ha de corregir per evitar obtenir falsos positius. El mètode més utilitzat és el FDR (*False Discovery Rate*). Els resultats dels gens diferencialment expressats s'expressen típicament amb un valor de ratio d'expressió entre les dues condicions que comparem, en \log_2 de la ratio, que correspon al *fold change* (FC), o sense base logarítmica, i un valor de significància estadística (valor de p) associat. Existeixen dos mètodes de classificació per tal d'identificar gens que ens divideixin les mostres en classes:

-Anàlisi no supervisada: en aquest tipus d'anàlisi no es coneix prèviament a quina categoria o grup pertany cada mostra de l'estudi, de manera que s'apliquen mètodes estadístics que ens permeten identificar agrupacions de mostres segons la seva expressió. Existeixen diferents tipus d'algorismes que permeten generar aquestes agrupacions o *clusters*, com el *clustering* jeràrquic i l'anàlisi de PCA. A la clínica, l'anàlisi no supervisat permet identificar subgrups de tumors que comparteixen patrons d'expressió semblants.

-Anàlisi supervisada: aquest tipus d'anàlisi permet identificar gens diferencialment expressats entre dues o més categories conegudes. Aquesta estratègia permet establir patrons d'expressió característics de cada categoria i classificar mostres addicionals de categoria prèviament desconeguda. És molt utilitzat per a l'estudi de correlació de dades d'expressió i dades clíniques.

D. Anàlisi funcional i interpretació biològica de les dades: és l'objectiu final de l'anàlisi de dades de microarrays. Es vol obtenir un coneixement biològic de les dades generades, per tal de definir funcions biològiques o xarxes genètiques específiques de la condició estudiada. Per a vincular el llistat de gens diferencialment expressats amb la funció biològica d'aquests s'utilitza la informació de l'ontologia genètica (GO, *gene ontology*, www.geneontology.org) que s'explota amb diferents eines públiques tals com AmiGO (amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi), FatiGO (babelomics.bioinfo.cipf.es) i DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov) i privades (IPA, *Ingenuity Pathway Analyses*), entre d'altres.

L'aplicació de la tecnologia de microarrays d'expressió ha seguit un creixement exponencial de manera que s'ha generat una gran quantitat de dades. Aquestes s'han dipositat en bases de dades públiques (com el GEO (*Gene expression omnibus*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) i Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)) per tal que estiguin disponibles a tota la comunitat científica. Per a facilitar el compartiment de les dades ha estat necessari establir uns estàndards internacionals liderats per la societat *Microarray Gene Expression Data* (MGED), com els inclosos en el MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*).

4. Validació biològica de les dades

Una vegada completada l'anàlisi de dades cal confirmar si tots o alguns dels gens presenten realment expressió diferencial, aplicant tècniques biològiques independents. Aquest anàlisi es realitza en el mateix grup de mostres estudiades pels microarrays i en una sèrie independent.

Per a la validació dels resultats d'expressió a nivell d'ARN la tècnica més emprada és la RT-PCR quantitativa a temps real (RQ-PCR). També és important conèixer si el canvi a nivell d'expressió d'ARN té traducció a nivell de proteïna. Els estudis que es realitzen per a validar l'expressió proteica són principalment les tècniques de Western Blot, d'immunohistoquímica i de citometria de flux.

1.3.2. Microarrays d'expressió en les neoplàsies mieloproliferatives

En el camp de l'hematologia, el primer estudi de microarrays d'expressió en mostres de càncer ja va demostrar la potència d'aquesta tecnologia en la classificació de les leucèmies agudes (Golub i cols. 1999). Posteriorment, Alizadeh i cols. (Alizadeh i cols. 2000) van identificar subgrups de pacients amb limfoma difús de cèl·lula B gran, els quals es correlacionaven amb el pronòstic i amb la resposta a la teràpia.

Des d'aleshores s'han realitzat nombrosos estudis utilitzant aquesta tecnologia els quals han aportat un gran coneixement en la patogènesi de les malalties hematològiques i en la seva classificació i el seu impacte en el pronòstic i tractament.

En les NMP Ph- també existeixen diferents estudis d'expressió gènica utilitzant la tecnologia de microarrays. Concretament, Pellagatti i cols. (2003), Goertler i cols. (2005) i Steidl i cols. (2005) van definir gens amb expressió diferencial en granulòcits de pacients amb PV i l'estudi de Kralovics i cols. (2005c) va identificar gens l'expressió dels quals era dependent de la presència de *JAK2V617F*. En la TE, Schwemmers i cols. (2007), en el mateix període que el nostre estudi (Puigdecanet i cols. 2008), van definir també subclasses de pacients en relació a l'estat de *JAK2V617F*.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1. HIPÒTESI

La TE és una malaltia clonal de la cèl·lula mare hematopoètica, amb hiperplàsia dels megacariòcits de la medul·la òssia i amb una hiperproducció de plaquetes circulants, que no afecta solament a la línia megacariocítica sinó també a les línies mieloides granulocítica i eritroide. La TE és una malaltia clínicament heterogènia i en la que no existeix un marcador diagnòstic. L'alteració molecular més comú és la mutació *JAK2V617F*, però només és present en aproximadament el 50% dels malalts. Així, resta una proporció important de pacients en els quals encara es desconeix l'alteració genètica implicada en la patogènesi de la TE.

La hipòtesi plantejada era que les alteracions genètiques causants de la TE, les conegudes com *JAK2V617F* i les que encara no es coneixen, podien afectar l'expressió gènica de les cèl·lules mieloides, com els granulòcits.

Amb l'anàlisi del perfil d'expressió dels granulòcits dels pacients amb TE es podria identificar una signatura gènica característica de la malaltia que ens aportaria informació sobre la fisiopatologia de la TE. A més a més, l'estudi d'expressió en els pacients *JAK2V617F*-positius identificaria els gens i les vies de senyalització afectades per la mutació. Per altra banda, el perfil d'expressió dels pacients *JAK2V617F*-negatius ens aportaria informació sobre vies de senyalització que podrien estar afectades per alteracions genètiques encara desconegudes.

Amb les dades anteriors, junt amb la comparació del perfil d'expressió de la TE amb el de la TR i de la PV, es podrien definir marcadors específics de la TE, amb possible valor diagnòstic i/o pronòstic, i que podrien ser estudiats per tècniques disponibles en un laboratori de rutina.

2.2. OBJECTIUS

Objectius generals

L'objectiu del treball és caracteritzar el perfil d'expressió gènica de la TE i aprofundir en el coneixement de la fisiopatologia d'aquesta malaltia. També es pretén definir marcadors que permetin el diagnòstic de la TE i que, a la vegada, puguin ser estudiats per tècniques disponibles en un laboratori de rutina.

Objectius concrets

1. Caracteritzar el perfil d'expressió gènica de la TE utilitzant la tècnica de microarrays d'expressió, estudiant el patró d'expressió en granulòcits de sang perifèrica i comparant-lo amb el d'individus sans.
2. Validar els resultats obtinguts per microarrays d'expressió d'un conjunt concret de gens mitjançant RQ-PCR utilitzant targetes microfluídiques (TLDA) en els pacients estudiats prèviament per microarrays d'expressió i en una sèrie independent de pacients amb TE.
3. Analitzar el perfil d'expressió gènica en les TE en relació a la presència de la mutació *JAK2V617F*.
4. Estudiar l'expressió d'un grup de gens seleccionats, utilitzant la tècnica de TLDA, en pacients amb TR i comparar el perfil d'expressió amb el de la TE.
5. Realitzar la mateixa anàlisi en pacients amb PV i comparar el perfil d'expressió amb el de la TE. Analitzar les diferències d'expressió en relació amb la mutació *JAK2V617F*.
6. Validar l'expressió proteica dels gens més rellevants en pacients amb TE, mitjançant les tècniques d'immunocitoquímica i de Western Blot.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. MATERIAL

3.1.1. Selecció de pacients i controls pels anàlisis de microarrays d'expressió i de RQ-PCR

En el treball s'han inclòs un total de 98 pacients amb NMP Ph- diagnosticats segons els criteris de l'OMS 2001 (Jaffe i cols. 2001) i 2008 (Swerdlow i cols. 2008) i sense haver rebut tractament citorreductor.

Concretament s'han estudiat:

- 57 pacients diagnosticats de TE
 - 33 *JAK2V617F*-positius en heterozigosi
 - 1 *JAK2V617F*-positiu en homozigosi
 - 23 *JAK2V617F*-negatius
- 41 pacients diagnosticats de PV
 - 24 *JAK2V617F*-positius en heterozigosi
 - 9 *JAK2V617F*-positius en homozigosi
 - 7 *JAK2V617F*-negatius
 - 1 *JAK2* exon 12-positiu
- 6 pacients amb TR

També s'ha inclòs un grup de 10 persones sanes com a control de l'estudi.

Les mostres han estat recollides entre els anys 2004 i 2008. Les mostres de les 57 TE i 37 PV provenen de l'Hospital del Mar de Barcelona. Quatre pacients amb PV *JAK2V617F*-negatius provenen de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Els pacients estudiats en cada part del treball, així com les seves característiques clínic-biològiques, es detallen en els respectius capítols de l'apartat de resultats.

La mostra utilitzada ha estat granulòcits de SP.

3.1.2. Selecció de mostres de pacients amb TE i controls per a les tècniques d'immunohistoquímica, immunocitoquímica i Western Blot

En les tècniques d'estudi de l'expressió proteica del gen *FOSB* (immunocitoquímica i Western Blot) s'han estudiat 12 pacients inclosos posteriorment (cinc *JAK2V617F*-negatius i set *JAK2V617F*-positius) diagnosticats de TE segons els criteris de l'OMS del 2008 (Swerdlow i cols. 2008) i sense haver rebut tractament citorreductor. Com a condició control d'expressivitat del *FOSB* s'han inclòs cinc individus sans. La línia cel·lular K562 s'ha emprat com a control positiu. En la tècnica d'immunocitoquímica també s'ha utilitzat una biòpsia de càncer de mama com a control positiu.

La línia cel·lular K562 és una línia cel·lular mieloide establerta per Lozzio i cols. (1975) a partir d'una pacient amb leucèmia mieloide crònica en crisi blàstica.

3.2. MÈTODES

3.2.1. Estudis d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial, en trombocitosis reactives i en la policitèmia vera

3.2.1.1. Extracció i processament de la mostra

La mostra utilitzada pels estudis d'expressió ha estat de SP, tant pels pacients com pels individus control. L'obtenció de SP venosa del pacient s'ha realitzat mitjançant una extracció amb xeringa o Vacutainer™ i intentant evitar l'hemòlisi. S'han extret 20ml de sang en un tub amb 1% d'anticoagulant EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*).

La mostra es processa amb el mínim de temps possible des de la seva extracció, sempre guardant-la a temperatura ambient (TA), a 18-26°C. Les mostres provinents de centres externs el període entre l'extracció i el processament de la mostra podia arribar a les 24 hores.

3.2.1.2. Separació dels tipus cel·lulars de la sang perifèrica

Per a l'estudi d'expressió gènica de les NMP és necessari aïllar els diferents tipus cel·lulars de la SP, especialment els granulòcits que és la línia hematopoètica afectada en aquest grup de malalties.

Per a la separació dels tipus cel·lulars de la SP s'ha utilitzat la tècnica de gradient de densitat i posteriorment la sedimentació amb dextrà. La combinació d'ambdues tècniques permet la separació de plaquetes, cèl·lules mononucleades i granulòcits.

3.2.1.2.1. Tècnica de separació per gradient de densitat

El principi de separació per gradient de densitat és l'ús d'una mescla de polisacàrids i diatriozat de sodi d'una densitat concreta amb la que, mitjançant la centrifugació, permet obtenir una monocapa o anell d'aquelles cèl·lules de la mateixa densitat que la

mescla i una sedimentació de les cèl·lules amb densitat superior (tècnica descrita per Bøyum i cols. 1968). Concretament, per a la separació de limfòcits i altres cèl·lules mononucleades, com els monòcits, s'utilitza el producte comercial Lymphoprep™, de densitat $1.077\pm 0,001$ g/ml. Amb aquesta mescla s'aconsegueix un anell de cèl·lules mononucleades i una sedimentació d'eritròcits i de granulòcits.

Equipament

Coulter ACT diff Hematology Analyzer (BR-13692A, Beckman coulter)

Reactius

Lymphoprep™ (1114544, Axis-Shield)

- Característiques de conservació: un cop obert guardar-lo a la nevera (4°C) i a la foscor, embolicant-lo amb paper de plata.
- Composició: -Diatríozat de sodi: 9.1% (w/v)
-Polisacàrids: 5.7% (w/v)

PBS 10x (1666789, Roche)

Solucions

PBS 1x: dilució 1:10 de PBS 10x utilitzant H₂O (exemple: 10ml de PBS 10x i 90 ml d'H₂O).

Procediment

1. Treure el Lymphoprep™ de la nevera i deixar-lo atemperar.
2. Diluir la sang (que conté un 1% d'anticoagulant EDTA) a 1:1 utilitzant PBS 1x (exemple: 20 ml de sang i 20 ml de PBS1x) i barrejar.
3. Amb molta cura i utilitzant una pipeta Pasteur o una pipeta de 10ml dipositar 6 ml de sang diluïda sobre 3 ml de Lymphoprep™, utilitzant tubs cònics de 15ml. Sempre s'ha de mantenir la relació de 2 volums de mostra per 1 volum de Lymphoprep™. És

imprescindible que la sang no es barregi amb el fluid de separació ja que sinó es trenca la consistència del fluid i no actua com a separador.

4. Centrifugar a 280g durant 20 minuts a TA i sense fre de la centrífuga. Després de la centrifugació s'obté un anell de cèl·lules mononucleades en la interfase entre la mostra i el fluid separador, tal i com es mostra en la figura M1.

5. Extreure la capa cel·lular utilitzant una pipeta Pasteur, amb cura de no agafar també el fluid separador, i ho dipositem en un tub cònic de 15 ml.

6. Afegir PBS 1x en la suspensió cel·lular, fins a un volum d'uns 10 ml, i centrifugar a 160-220g durant 10 minuts, de manera que s'obté un pellet cel·lular.

7. Fer dos rentats amb PBS 1x del pellet per tal d'eliminar restes del fluid separador el qual presenta toxicitat cel·lular: decantar el sobrenadant i afegir PBS 1x fins a un volum d'uns 10 ml i centrifugar a 160-220g durant 10 minuts. Repetir el procediment una vegada.

8. Finalment s'obté un pellet de cèl·lules mononucleades de puresa superior al 80%, el qual serà processat per a la posterior extracció d'ADN, ARN o proteïnes.

La puresa cel·lular es quantifica mitjançant un comptador cel·lular automàtic.

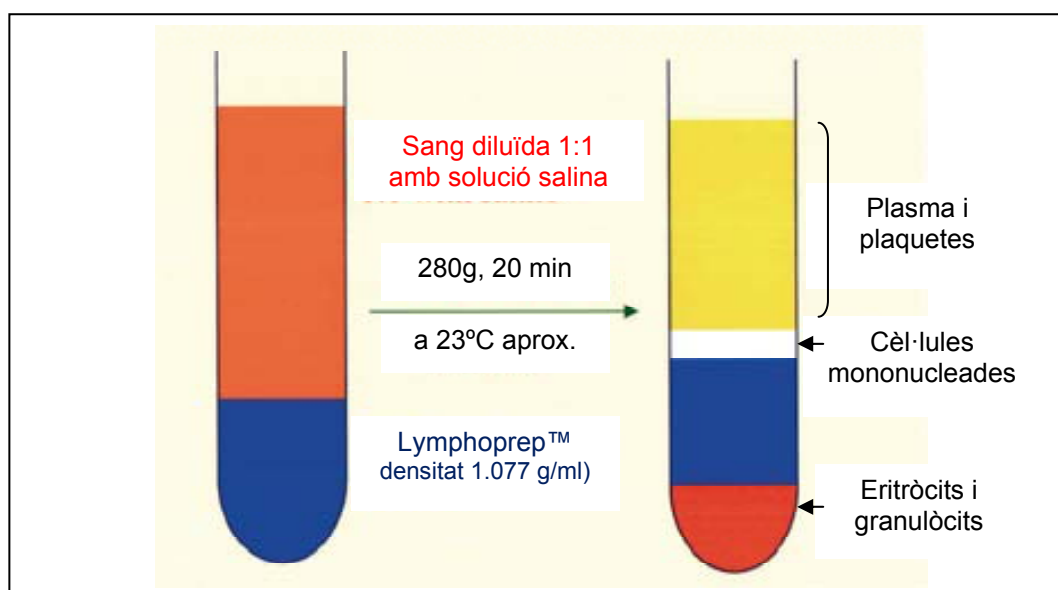


Figura M1. Esquema de la tècnica de separació per gradient de densitat. Imatge modificada de *News bulletin for Axis-Shield density gradient media*.

3.2.1.2.2. Purificació dels granulòcits mitjançant la tècnica de separació per sedimentació amb dextrà 3%

L'objectiu d'aquesta tècnica és aïllar els granulòcits procedents del paquet cel·lular obtingut en la tècnica del Lymphoprep™. Aquest conté els granulòcits i eritròcits que han sedimentat degut a la seva elevada densitat (superior a la del Lymphoprep™, 1.077g/ml).

El principi de separació per sedimentació amb dextrà és l'ús d'aquest sucre a una concentració del 3% que ocasiona la sedimentació dels eritròcits i resten els granulòcits en suspensió. No obstant, no sedimentaran tots els eritròcits de manera que un cop realitzada la separació dels granulòcits amb el dextrà caldrà lisar els eritròcits contaminants amb clorur d'amoni.

Equipament

Coulter ACT diff Hematology Analyzer (BR-13692A, Beckman coulter)

Reactius

Dextrà pur de *Louconostoc mesenteroides* (D1037, Sigma-Aldrich)

Sèrum fisiològic Serrasol (375790.4, Lab Serra Pamies)

Clorur d'amoni (A9434, Sigma-Aldrich)

PBS 1x (preparat a partir de PBS 10x (1666789, Roche))

Solucions

Dextrà 3%: 2g de dextrà en 100 ml de sèrum fisiològic. Barrejar durant uns 30 minuts, utilitzant un agitador magnètic, i guardar a la nevera (4°C) durant màxim un mes.

Procediment

1. Extreure el sobrenadant i el Lymphoprep™ de manera que només quedi el paquet cel·lular, d'aspecte hemàtic pel seu alt contingut en eritròcits.

2. Diluïr el paquet cel·lular a 1:1 utilitzant PBS 1x (exemple: 20 ml de paquet cel·lular i 20 ml de PBS 1x) i ho barregem.
 3. Utilitzar una xeringa de volum d'acord als volums que tinguem de paquet cel·lular diluït. Extreure l'èmbol i tancar la punta de la xeringa amb parafilm o bé amb una xeringa encapsulada.
 4. Afegir la mescla de paquet cel·lular diluït a la xeringa i afegir un volum igual de dextrà 3%.
 5. Introduïr amb cura l'èmbol a la xeringa pressionant a la vegada la punta de la xeringa, per tal d'evitar vessaments.
 6. Barrejar la mescla invertint la xeringa i situar-la en posició vertical durant 30 a 40 minuts. Durant aquest temps els eritròcits sedimentaran i els granulòcits es quedaran en el sobrenadant, tal i com es mostra en la figura M2.
 7. Extreure el sobrenadant mitjançant la introducció del receptor d'una "palometa" a la punta de la xeringa. Tallar la punta del tub on hi ha la "palometa" i introduïr el tub en un recipient per recollir el sobrenadant, com tubs cònics de 15 ml.
 8. Afegir PBS 1x en la suspensió cel·lular, fins a un volum d'uns 10 ml, i centrifugar a 370-444g (aprox.1500-1800rpm) durant 10 minuts, de manera que s'obté un pellet cel·lular, el qual encara conté eritròcits.
 9. Lisar els eritròcits del pellet cel·lular afegint uns 10ml de clorur d'amoni en el pellet cel·lular i barrejar. Deixar la mescla 10 minuts a TA.
 10. Centrifugar la suspensió cel·lular a 370-444g durant 10 minuts, de manera que s'obté el pellet cel·lular purificat d'eritròcits.
 11. Fer dos rentats del pellet amb PBS 1x per tal d'eliminar restes de dextrà i clorur d'amoni: decantar el sobrenadant i afegir PBS 1x fins a un volum d'uns 10ml i centrifugar a 370-444g durant 10 minuts. Repetir el procediment una vegada.
 12. Finalment s'obté un pellet dels granulòcits de puresa superior al 80%, el qual serà processat per la posterior extracció d'ADN, ARN o proteïnes.
- La puresa cel·lular es quantifica mitjançant un comptador cel·lular automàtic.

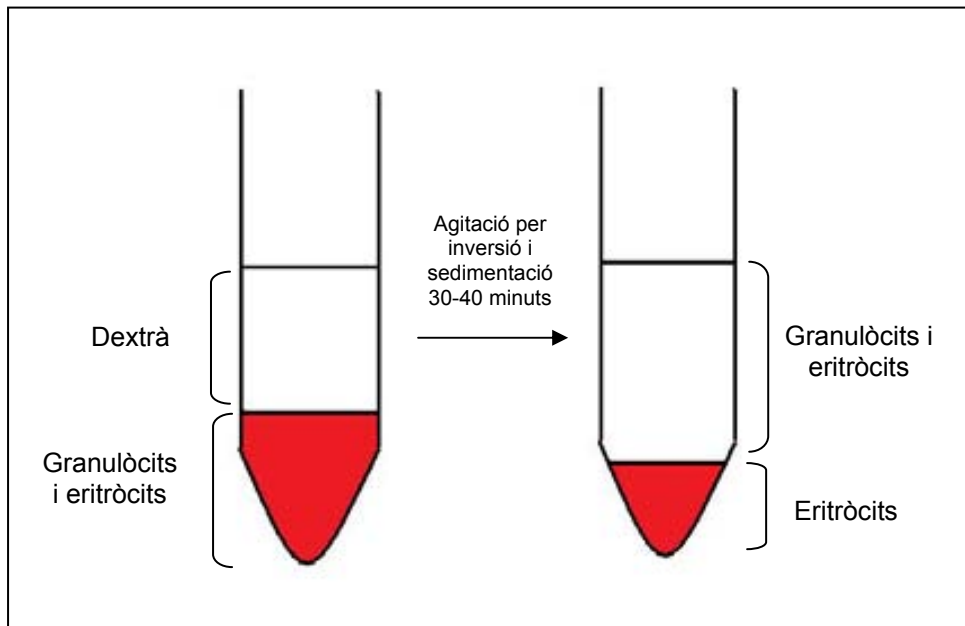


Figura M2. Esquema de la tècnica de separació dels granulòcits per sedimentació amb dextrà 3%.

3.2.1.3. Extracció d'ARN utilitzant el mètode de fenol-cloroform

L'extracció de material genètic (tant ARN com ADN) de cèl·lules aïllades es basa en l'ús dels reactius tiocianat de guanidina, fenol i cloroform aplicant el protocol descrit per Chomczynski i cols (2006) modificat. El tiocianat de guanidina actua com a agent desnaturalitzant i a la vegada estabilitzador de l'ARN, ja que elimina les ARNases i dissocia els complexos proteics-àcid nucleic (separa l'ARN ribosòmic dels ribosomes). El fenol lisa les cèl·lules i junt amb el cloroform permeten separar les proteïnes, restes cel·lulars i àcids nucleics en diferents fases: la fase orgànica (en la que s'hi troba el cloroform junt amb l'ADN, proteïnes i restes cel·lulars) i la fase aquosa (en la que s'hi troba el fenol junt amb l'ARN).

Equipament

Coulter ACT diff Hematology Analyzer (BR-13692A, Beckman coulter)

Reactius

Ultraspec™ (BL-10050, Biotecx)

Cloroform (UN1888, Merck)

Isopropanol (I9516-25ml, Sigma)

Etanol absolut (UN1170, Merck)

Aigua lliure d'ARNases (BE51200, Accugene)

RNAse ZAP (AM9780, Ambion)

Solucions

Etanol 75%: es prepara a partir de l'etanol absolut, utilitzant aigua lliure d'ARNases

Procediment

Prèviament a l'inici de l'extracció de l'ARN cal netejar tota l'àrea de treball amb el reactiu RNAse ZAP i treballar amb guants, per tal de garantir un processament en condicions lliures d'ARNases, que podrien degradar l'ARN.

Es parteix dels granulòcits separats mitjançant les tècniques descrites en els apartats anteriors.

1. Utilitzar un comptador hematològic per a quantificar el nombre de cèl·lules en suspensió i aliquotar 10×10^6 cèl·lules per eppendorf d'1,5 ml. Utilitzar eppendorf lliures d'ADNases i ARNases.
2. Centrifugar 5 minuts a 240g i treure el sobrenadant, de manera que s'obté un pellet de cèl·lules. A partir d'aquest punt s'ha de treballar en fred, a 4°C.
3. Afegir 1 ml d'Ultraspec™ al pellet amb una xeringa de 2 ml i utilitzant una agulla de 20G.
4. Passar la solució unes 15-20 vegades per la xeringa. Anar molt amb compte de no punxar-se.

- Deixar reposar durant 5 minuts a 4°C o bé emmagatzemar la mostra a -80°C. Possible punt de parada del protocol. En cas que es guardi a -80°C, al continuar el processament cal que la mostra es descongeli a 4°C i posteriorment tornar a passar la solució unes 15-20 vegades per una xeringa de 2 ml amb agulla de 20G
- Afegir 200 µl de cloroform (per cada ml d'Ultraspec™) i agitar vigorosament durant uns 15 segons i deixar novament en gel durant mínim 5 minuts.
- Centrifugar a 15.900g durant 15 minuts a 4°C. Després de la centrifugació es formaran 2 fases (Figura M3):

- fase inferior: és la fase orgànica i conté l'ADN, proteïnes i restes cel·lulars
- fase superior: és la fase aquosa i conté l'ARN

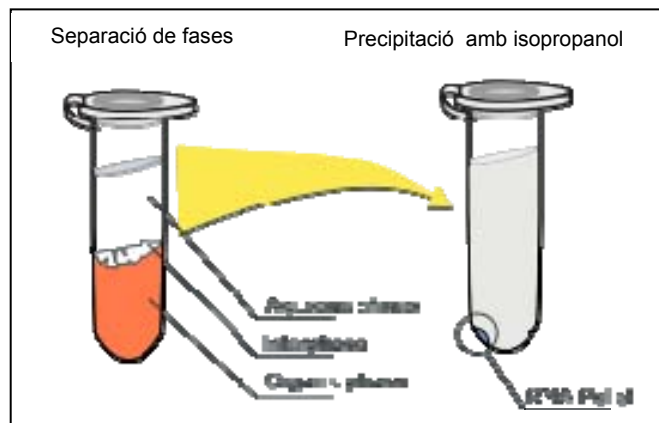


Figura M3. Esquema de la tècnica d'extracció d'ARN utilitzant el mètode de fenol-cloroform.

- Transferir amb molt de compte la fase aquosa a un nou eppendorf lliure d'ARNases. Vigilar de no aspirar la fase orgànica, que es visualitzaria en la punta de la pipeta com a restes blanquinoses. Anotar el volum transferit.
- Afegir un volum igual d'isopropanol, aproximadament uns 600 µl. Barrejar per inversió i deixar les mostres durant mínim 10 minuts a -20°C. Possible punt de parada del protocol.
- Centrifugar a 18.400g durant 10 minuts a 4°C. L'ARN formarà un precipitat blanc al fons de l'eppendorf. Llençar el sobrenadant amb molta cura de no perdre el precipitat blanc.

11. Fer dos rentats amb etanol 75% a 9.400g durant 5 minuts a 4°C. Llençar el sobrenadant després de cada rentat.

12. Deixar assecar el precipitat blanc posant els tubs cap per avall damunt un mocador, un mínim de 30 minuts fins que es torni transparent.

13. Un cop el pellet està sec afegir un volum d'aigua lliure d'ARNases d'acord al tamany del pellet (entre 20 a 50 µl). Ressuspendre el pellet amb la pipeta però sense tocar-lo directament. Després deixar la mostra a la nevera durant un mínim de 30 minuts per tal que s'acabi de dissoldre el pellet d'ARN.

14. Agafar una alíquota d'uns 5 µl de cada mostra per quantificar i analitzar la integritat de l'ARN. La resta de mostra s'emmagatzemarà a -80°C, per a ser processada per a la tècnica de microarrays d'expressió o de RQ-PCR.

3.2.1.4. Quantificació i anàlisi de la qualitat de l'ARN

3.2.1.4.1. Quantificació de l'ARN

La quantificació de l'ARN es realitza mitjançant l'espectrofotòmetre de volum reduït anomenat NanoDrop™. Es forma una pel·lícula molt fina, d'1 mm de longitud, entre el cap inferior i superior, a través de la qual aplicant llum ultraviolada podrà llegir-ne l'absorbància (A) a diferents longituds d'ona. L'espectrofotòmetre permetrà obtenir la concentració d'ARN (mitjançant l'equivalència d'una A260 de valor 1 correspon a una concentració de 40 µg/ml), així com la seva puresa, indicada pels valors següents:

- Ratio A260/280: valor òptim >1,6-2,0. Indica la proporció de proteïnes (A280) respecte als nucleòtids (A260).
- Ratio 260/230: valor òptim >1,3-2,0. Indica la proporció de sals i altres restes de reactius (A230) respecte als nucleòtids (A260)
- A320: valor òptim <0,2. Indica la presència de restes sòlides en la mostra

Equipament

NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (ND-1000 Technologies)

Reactius

Aigua lliure d'ARNases (BE51200, Accugene)

Procediment

Segons el manual v3.7 *User's Manual* de la casa comercial NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer:

1. Obrir el programa de l'aparell "NanoDrop1000 Spectrophotometer" i seleccionem l'opció "Nucleic Acid".
2. Passar un mocador de paper en el cap inferior i superior on es forma la pel·lícula de la mostra i a continuació, tal i com indica el programa, rentar els capçals amb aigua,

dispensant 5 µl d'aigua en el cap inferior. Tancar la barra posant en contacte el cap superior amb l'inferior. Prémer "Continue".

3. Una vegada rentats els capçals ja es pot procedir a la quantificació. Cal primer fer el blanc, seleccionant l'opció d'ARN i dispensant altre cop aigua (ja que és amb el què es troba ressusprès el nostre ARN) en el capçal inferior. Prémer "Blank".

4. Eixugar ambdós caps amb un mocador de paper i dispensar >1,3 µl-2 µl de la primera mostra, sempre evitant introduir bombolles. Identificar-la correctament en la pantalla. Prémer "Measure".

5. Una vegada estiguin totes les mostres quantificades és recomanable mesurar el blanc (en aquest cas l'aigua) com una mostra més. El valor de quantificació ha de ser molt proper a zero, ja que és el nostre blanc. Si la concentració és superior a 5 ng/µl cal tornar a realitzar el blanc i tornar a quantificar totes les mostres.

6. Fer un últim rentat dels capçals amb aigua, per tal de deixar-los nets per a la propera mesura.

7. Guardar els resultats, entrant a *Report_Show Report_Save Report_Export Report Table Only*. Es genera una taula que conté els valors de concentració de cadascuna de les mostres amb els respectius valors de les A260, A280, A230, A320 i les ratios 260/230 i 260/230.

3.2.1.4.2. Anàlisi de la qualitat de l'ARN

L'anàlisi de qualitat de l'ARN es realitza mitjançant el bioanalitzador Agilent 2100 Bioanalyzer, el qual realitza una electroforesi capil·lar en un format de xip amb 16 pous interconnectats. L'anàlisi consisteix en una prèvia injecció d'un polímer que conté un fluorocrom dins dels canals del xip, així com la incorporació d'un *ladder* amb fragments de mida i concentració coneguda. Posteriorment es carreguen 12 mostres d'ARN a cadascun dels pous, juntament amb un marcador, els quals estan en contacte amb un electrode que aplica un gradient de voltatge que ocasiona la migració de l'ARN a través del polímer. En cada canal, tant de les mostres com del *ladder*, s'aconsegueix la

separació de les molècules d'ARN en funció de la seva mida, com en un gel d'agarosa. La detecció dels fragments d'ARN s'aconsegueix gràcies a l'excitació amb làser del fluorocrom, present en el polímer, el qual s'intercala en la cadena d'ARN. El marcador, present en cada mostra i en el *ladder*, s'utilitza per a alinear la lectura de les mostres amb el *ladder*. Com a resultat d'aquesta anàlisi s'obté una imatge virtual d'un gel d'agarosa i un perfil electroforètic de l'ARN ribosòmic de cada mostra i del *ladder* (Figura M4). La lectura del *ladder* permet obtenir una corba de migració estàndar en relació a la mida dels fragments, que és coneguda. D'aquesta manera és possible conèixer la mida de cadascun dels fragments d'ARN detectats. També s'obté la concentració de la mostra, a través de la suma de les àrees sota la corba de tots els pics del perfil electroforètic detectat per una mostra i la comparació amb les àrees sota la corba dels diferents pics del *ladder*, dels quals se'n coneix la concentració .

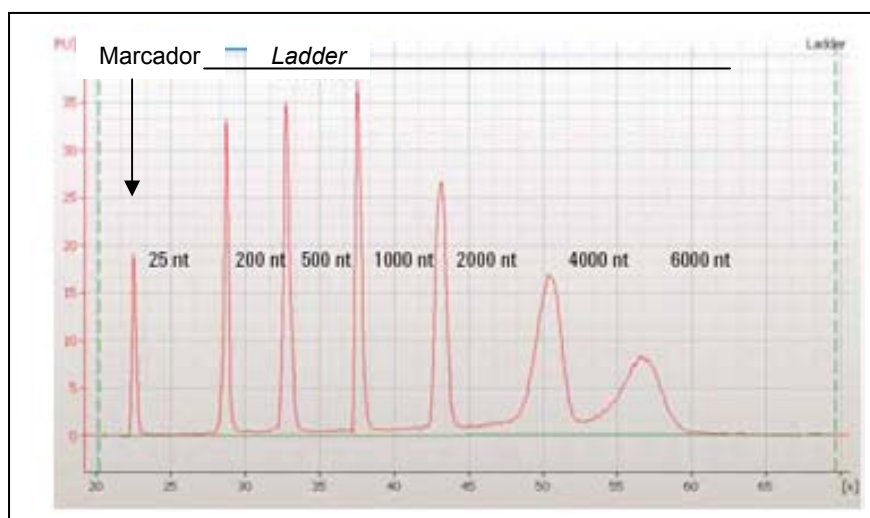


Figura M4. Perfil electroforètic del RNA 600 Nano ladder

A partir del perfil electroforètic de l'ARN ribosòmic s'obtenen els dos paràmetres següents, els quals ens permeten estimar la integritat de l'ARN:

- ratio entre la subunitat 18S i 28S de l'ARN ribosòmic: valor òptim >1,3-2
- *RNA Integrity Number (RIN)*, obtingut mitjançant un algorisme que analitza tot el perfil electroforètic de l'ARN ribosòmic (Figura M5). S'obtenen valors entre zero i 10, essent

zero un valor corresponent a una mostra totalment degradada i 10 un valor d'una mostra de qualitat excel·lent (Figura M6).

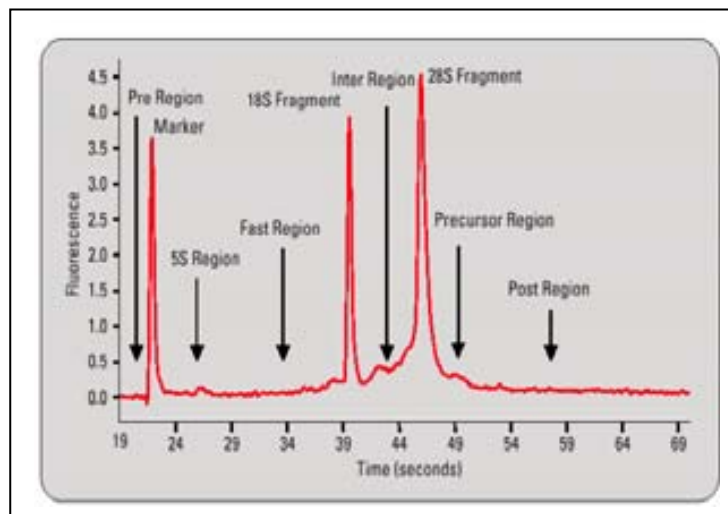


Figura M5. Electroferograma en el que es detallen les regions indicadores de la qualitat de l'ARN ribosòmic i que són utilitzades pel càlcul del valor de *RIN*.

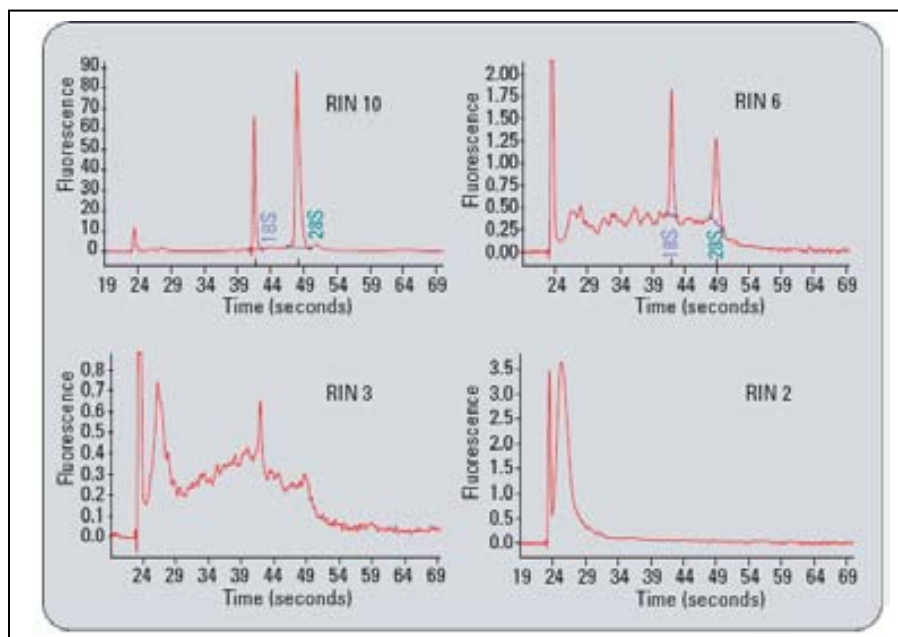


Figura M6. Perfil electroforètic de l'ARN ribosòmic de diferents mostres amb valors de *RIN* de 10, 6, 3 i 2, respectivament.

Tot i que el Bioanalyzer 2100 també proporciona la concentració de la mostra utilitzem el Nanodrop per a obtenir aquest paràmetre, ja que els valors són més fiables.

Equipament

Agilent 2100 Bioanalyzer (G2939AA, Agilent Technologies)

Chip Priming Station (5065-4401, Agilent Technologies)

IKA vortex mixer (inclòs en kit G2939AA, Agilent Technologies)

Reactius

RNA 6000 Nano Total RNA Assay (5067-1511, Agilent Technologies)

- Conté:
- Agilent RNA 6000 Ladder
 - RNA Nano Dye Concentrate
 - Agilent RNA 6000 Nano Marker (2 vials)
 - Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix (2 vials)
 - 25 RNA Nano Chips

RNAsa ZAP (9780, Ambion)

Aigua lliure d'ARNases (BE51200, Accugene)

Procediment

Segons el manual *RNA 6000 Nano Kit Guide (Manual Part Number G2938-90034,*

Edició 08/2006) de la casa comercial Agilent:

A. Posada a punt de la *chip priming station* per a la utilització del xip *RNA 6000*

Nano Total RNA

1. Enroscar la xeringa d'1ml a la tapa.
2. Ajustar el suport a la posició C.
3. Ajustar l'èmbol de la xeringa a la posició d'1ml.

B. Posada a punt de l'Agilent 2100 Bioanalyzer

1. Ajustar el selector de xip a la posició 1.

C. Preparació del *ladder*

1. Quan arriba el ladder a 4°C cal pipetejar-lo a un eppendorf lliure d'ARNases.
2. Desnaturalitzar-lo durant 2 minuts a 70°C.

3. Immediatament posar el vial en gel.
4. Fer aliquotes d'uns 1,2µl en eppendorf de 0,2 ml lliures d'ARNases.
5. Emmagatzemar-les a -80°C.

D. Descontaminació dels electrodes

Cal descontaminar els electrodes per tal d'evitar la degradació de la mostra.

1. Afegir 350 µl d'RNase ZAP en un dels pous d'un xip de neteja d'electrodes, rotulat prèviament com a RNase ZAP.
2. Afegir 350 µl d'aigua lliure d'ARNases en un dels pous d'un xip de neteja d'electrodes, rotulat prèviament com a RNase *free*.
3. Posar el xip de neteja que conté RNase ZAP en el 2100 Bioanalyzer i tancar la tapa. Deixar-lo durant mínim 1 minut.
4. Treure el xip. Es guarda per la neteja dels electrodes posterior a l'anàlisi
5. Posar el xip de neteja que conté aigua lliure d'ARNases en el 2100 Bioanalyzer i tancar la tapa. Deixar-lo durant mínim 1 minut.
6. Treure el xip. També es guarda per la neteja dels electrodes posterior a l'anàlisi
7. Deixar la tapa oberta durant 1 minut per tal que s'evapori l'aigua restant dels electrodes.

E. Preparació del gel

1. Treure tots els reactius (es troben dins la caixa del kit) i deixar atemperar durant 30 minuts.
2. Posar 550 µl del gel (vial marcat en vermell) sobre el filtre que conté l'eppendorf subministrat en el kit.
3. Centrifugar durant 10 minuts a TA a 1500g.
4. El gel filtrat es pot guardar durant 1 mes a 4°C.

F. Preparació de la solució gel-dye

1. Aliquotar 65 µl del gel filtrat en un eppendorf de 0,5 ml lliure d'ARNases.
2. Vortejar el fluocrom (*dye*, vial marcat en blau) durant 10 segons i fer un pols.

3. Afegir 1 µl de fluorocrom als 65 µl de gel filtrat. Vortejar i comprovar que la mescla sigui homogènia.

4. Centrifugar durant 10 minuts a 13.000g.

5. Deixar-lo equilibrar a TA durant 30 minuts.

Sempre utilitzar la barreja de gel i fluorocrom preparada el mateix dia.

Cal sempre protegir el fluorocrom de la llum, així com la barreja gel-dye.

G. Càrrega del xip

Durant la càrrega dels diferents reactius al xip cal posar sempre la pipeta tocant el fons de cada pou.

1. Agafar i treure de l'embolcall un xip RNA Nano.

2. Posar el xip a la *chip priming station*.

3. Pipetejar 9 µl de la mescla de gel i fluorocrom en el pou inferior marcat com a G.

4. Posar la pipeta a 1ml. Tancar la tapa de la *chip priming station* i apretar l'èmbol de la xeringa avall fins a la posició del clip.

5. Esperar exactament 30 segons i després alliberar l'èmbol obrint el suport del clip.

6. Esperar que l'èmbol retorni a la posició de mínim 0,3ml.

7. Esperar 5 segons i lentament retornem l'èmbol fins a la posició inicial d'1 ml.

8. Obrir la tapa de la *chip priming station*.

9. Pipetejar 9 µl de la mescla de gel i fluorocrom en els dos pous superiors marcats com a G.

10. Pipetejar 5 µl del marcador (vial marcat en verd) en el pou identificat amb el símbol de *ladder* i en cadascun dels 12 pous de les mostres.

11. Desnaturalitzar durant 2 minuts a 70°C les 12 mostres d'ARN, prèviament aliquidades en volums d'1 µl en eppendorf de 0,2 ml. S'evita així la presència d'estructures secundàries en l'ARN.

12. Pipetejar 1µl de cada mostra a cadascun dels 12 pous del xip.

13. Pipetejar 1µl de ladder, prèviament desnaturalitzat i emmagatzemat a -80°C, en el pou identificat com a *ladder*.

14. Vortejar el xip durant 1 minut, utilitzant l'IKA vortex a 2.400rpm.

15. Procedir a l'anàlisi del xip en un termini de 5 minuts.

H. Anàlisi del xip en l'Agilent 2100 Bioanalyzer

1. Engegar l'aparell i posteriorment obrir el programa *2100 Expert Software*.

Seleccionar l'assaig corresponent a *RNA 6000 Nano Total RNA Assay*.

2. Comprovar que el programa ens detecta l'aparell.

3. Obrir la tapa i introduir-hi el xip.

4. Seleccionar *Start* i començar l'anàlisi.

5. Introduir els identificadors de les mostres en la posició del pou del xip corresponent.

6. Al cap d'uns 20 minuts es completa l'anàlisi de les mostres.

7. Es guarden els resultats en format "pdf".

Comprovar que el perfil electroforètic del *ladder* és el correcte i també el de les mostres.

I. Descontaminació dels electrodes després de l'anàlisi

Com a últim pas cal netejar els electrodes de nou per tal d'evitar contaminacions en les properes anàlisis.

1. Un cop acabada l'anàlisi treure immediatament el xip.

2. Repetir el procés de neteja dels electrodes descrit en l'apartat D.

3.2.1.5. Microarrays d'expressió en la trombocitèmia essencial

Per a l'anàlisi de microarrays d'expressió s'ha utilitzat el mètode de marcatge en dos colors, que consisteix en hibridar competitivament dues mostres en un mateix microarray marcades amb fluorocroms diferents i després realitzar una nova hibridació amb un marcatge de fluorocroms invers, anomenat *dye swap*. S'ha utilitzat la plataforma comercial Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), emprant el xip d'oligonucleòtids *44K Whole Human Genome oligonucleotide microarray*. En el nostre estudi s'ha hibridat en cada microarray ARN d'un pacient junt amb un pool d'ARN control, procedent de 10 individus sans.

Prèviament a l'anàlisi per microarrays s'ha valorat la qualitat de l'ARN, utilitzant el mètode d'electroforesi capil·lar (descriu en l'apartat 2.4.1). Només es van escollir aquelles mostres amb un valor d'integritat (RIN) de l'ARN superior a 7, descartant aquelles mostres amb valors inferiors per evitar treballar amb mostres degradades.

Aquesta tècnica s'ha realitzat en la *Core Facility* de Microarrays del Centre de Regulació Genòmica, Barcelona.

La tècnica dels microarrays d'expressió consisteix en quatre passos diferenciats, que són els següents:

- A. Retrotranscripció, amplificació i marcatge de l'ARN
- B. Fragmentació i hibridació de la mostra als xips
- C. Rentats
- D. Escanejat
- E. Obtenció de la matriu de valors d'intensitat

A. Retrotranscripció, amplificació i marcatge de l'ARN

La retrotranscripció (RT), l'amplificació i el marcatge de l'ARN és la primera part del processament de la mostra per tal d'hibridar-la en el microarray d'expressió. En aquest estudi s'ha utilitzat el mètode de marcatge en dos colors per crear ARN complementari (ARNc) amplificat i marcat amb cianina 3 (Cy3) i/o cianina 5 (Cy5). De forma resumida, es parteix de 500 ng d'ARN total el qual es retrotranscriu a ADNc, s'amplifica i es marca mitjançant una transcripció *in vitro* amb la presència de CTP marcats amb fluorescència (Cy3 i Cy5). Finalment el producte amplificat es purifica per tal d'eliminar els nucleòtids no incorporats. Una vegada les mostres estan marcades s'hibriden en el microarray (Figura M7). El processament s'ha realitzat d'acord al protocol recomanat per Agilent (*Agilent low RNA input linear amplification kit plus, Manual Part Number 5185-5818, 1era edició, versió 4.0, Gener 2006*).

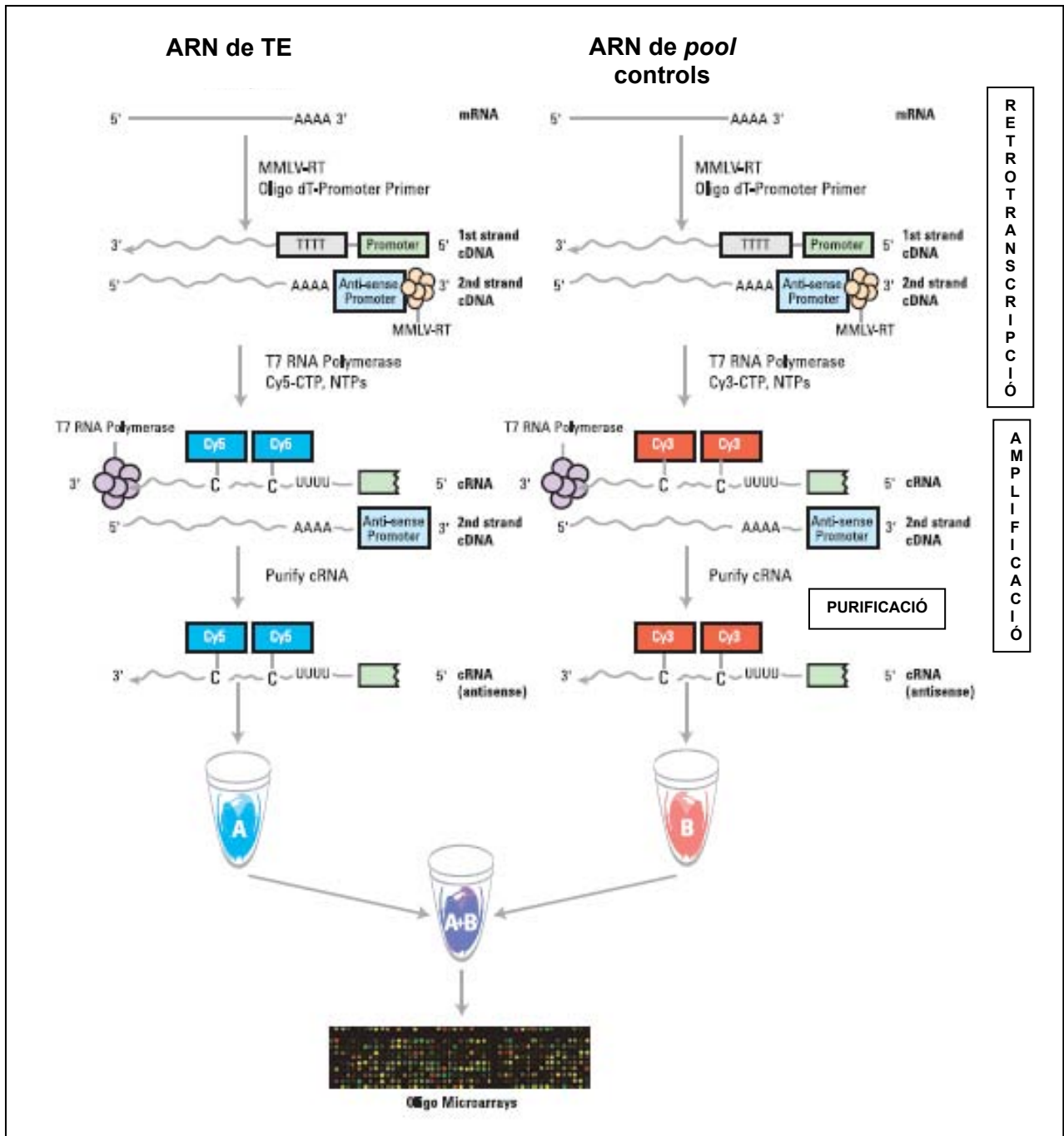


Figura M7. Esquema de la retrotranscripció, amplificació i marcatge de l'ARN. Imatge modificada del manual *Agilent low RNA input linear amplification kit plus, Manual Part Number 5185-5818*, 1era edició, versió 4.0, Gener 2006.

Equipament

DNA Engine Tetrad 2 Thermocycler (PTC-0240G, Bio-Rad)

NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific)

Agilent 2100 Bioanalyzer (G2939AA, Agilent Technologies)

Reactius

Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit (5184-3523, Agilent)

Conté:

- T7 *Promoter primer*
- 5X *First strand buffer*
- 0,1M DTT
- 10 mM dNTP mix
- MMLV RT
- RNase OUT
- 4X *Transcription buffer*
- 10 mM NTP mix
- 50% PEG (polyethylene glycol)
- fosfatasa inorgànica

Cyanine 3-CTP (10,0 mM), (NEL580, PerkinElmer/NEN Life Sciences)

Cyanine 5-CTP (10,0 mM), (NEL581), PerkinElmer/NEN Life Sciences)

RNeasy mini Kit (74104, QIAGEN)

β -mercaptoetanol (8057400005, Merck)

Etanol absolut (UN1170, Merck)

DNase/RNase-free distilled water (10977015, Invitrogen)

Procediment

A.1.Retrotranscripció: generació de l'ADNc a partir de l'ARN total

Tot el procediment s'ha de realitzar treballant en fred, utilitzant gel.

1. Descongelar els següents reactius: T7 *Promoter Primer*, 5X *First Strand Buffer*, 0.1M DTT, 10mM dNTP mix.
2. Partir de 500ng d'ARN total en un volum màxim de 8,3 µl.
3. Afegir 1,2 µl de T7 *Promoter Primer*.
4. Afegir aigua lliure d'ARNases fins a un volum d'11,5 µl.
5. Barrejar i fer un pols.
6. Desnaturalitzar els *primers* i l'ARN incubant a 65°C durant 10 minuts, en un bloc sec.
7. Posar la reacció en gel i incubar durant 5 minuts.
8. Preparar la master mix d'ADNc de la següent manera:
 - Preescalfar el buffer 5X *First strand* incubant el vial a 80°C durant 3 o 4 minuts per tal d'assegurar la ressuspensió dels components del buffer. Posteriorment vortejar i fer un pols.
 - Inmediatament abans d'utilitzar els diferents reactius barrejar-los mitjançant el pipeteig i posteriorment fer un pols.
 - Afegir els reactius en un eppendorf d'1,5 ml seguint l'ordre i els volums indicats en la taula M1. Afegir els enzims (MMLV-RT i RNase OUT) a l'últim moment. Calcular sempre un excés de volum per assegurar tenir suficient quantitat de mix.

Taula M1. Reactius per la master mix d'ADNc

| Reactiu | Volum (µl)/ 1 Rxn |
|--------------------|-------------------|
| 5x First Strand | 4 |
| 0.1M DTT | 2 |
| 10mM dNTP | 1 |
| MMLV-RT | 1 |
| RNase Out | 0,5 |
| Volum total | 8,5 |

9. Barrejar i fer un pols de la mix.

10. Afegir 8,5 µl de la mix a cada reacció i barrejar mitjançant el pipeteig. Deixar les reaccions a fora del gel per evitar la precipitació dels reactius.
11. Incubar les reaccions durant 2 hores a 40°C en un bany d'aigua circulant, sense agitació.
15. Mentrestant descongelar els següents reactius: 4X *transcription buffer*, 0,1 M DTT , 10 mM NTP mix i 50% PEG, fosfatasa inorgànica.
16. Inactivar l'enzim MMLV-RT incubant les mostres a 65°C en un bany o bloc sec durant 15 minuts.
17. Moure les mostres al gel i incubar durant 5 minuts.
18. Fer un pols de les mostres.

A.2. Amplificació i marcatge: generació d'ARNc marcat amb fluorescència. Transcripció in vitro i incorporació dels CTP marcats amb els fluorocroms Cyanine 3 i Cyanine 5

Tol el procediment s'ha de realitzar a TA i protegint les mostres de la llum una vegada s'hagin incorporat els fluorocroms.

1. Preparar la master mix de transcripció de la següent manera i durant els 20 minuts últims del protocol anterior:

- Si el PEG té precipitats preescalfar incubant el vial a 40°C durant 1 minut. Per assegurar una ressuspensió òptima vortejar breument i fer un pols.
- Immediatament abans d'utilitzar els diferents reactius barrejar-los mitjançant el pipeteig i posteriorment fer un pols.
- Afegir els reactius en un eppendorf d'1,5 ml seguint l'ordre i els volums indicats en la taula M2. Afegir els enzims (RNase out i T7 *RNA Polymerase*) a l'últim moment. Calcular sempre un excés de volum per assegurar tenir suficient quantitat de mix.

Taula M2. Reactius per la master mix d'amplificació i marcatge

| Reactiu | Volum (µl)/ 1 Rxn |
|-------------------------------|-------------------|
| H2O DEPC | 15,3 |
| 4x transcription buffer | 20 |
| 0.1M DTT | 6 |
| NTP mix | 8 |
| 50% PEG | 6,4 |
| RNase Out | 0,5 |
| Fosfatasa inorgànica | 0,6 |
| T7 RNA Polymerase | 0,8 |
| Cyanine 3-CTP o cyanine 5-CTP | 2,4 |
| Volum total | 60 |

2. Barrejar i fer un pols de la mix.
3. Afegir 57,6 µl de la mix a cada reacció i barrejar mitjançant el pipeteig.
4. Incubar les reaccions durant 2 hores a 40°C en un bany d'aigua circulant.

A.3. Purificació de l'ARN amplificat

Per a la purificació de l'ARNc amplificat s'utilitza el kit RNeasy de Qiagen i es segueix el seu protocol amb modificacions especificades en el protocol d'Agilent.

1. Ajustar el volum de la mostra a 100 µl, afegint 20 µl de H₂O lliure d'ARNases.
2. Preparar buffer RLT afegint en proporció 1 a 100 de β-mercaptoetanol i buffer RLT (exemple: 7 µl de β-mercaptoetanol per cada 700 µl de buffer RLT).
3. Afegir 350 µl de buffer RLT a cada mostra i barrejar.
4. Afegir 250 µl d'etanol fred (puresa 100%). Barrejar mitjançant el pipeteig, sense centrifugar.

Fins aquest punt mantenim les mostres en gel.

5. Transferir 700 µl de la mostra a una columna mini RNeasy, que es troba en un tub col·lector de 2 ml.
6. Centrifugar 30 segons a 15.900g i a 4°C.
7. Canviar el tub col·lector, llençant l'eluït i posar la columna en un nou tub col·lector de 2 ml.
8. Afegir 500 µl de buffer RPE a la columna.
9. Centrifugar 30 segons a 15.900g i a 4°C.
10. Llençar el volum del tub col·lector i reutilitzar el tub.
11. Altre cop, afegir 500µl de buffer RPE.
12. Centrifugar 30 segons i 60 segons addicionals a a 15.900g i a 4°C.
13. Llençar el tub col·lector i posar la columna en un nou tub d'1,5 ml.
14. Eluïr l'ARNc purificat afegint 30 µl d'H₂O lliure d'ARNases directament al filtre de la columna.
15. Incubar durant 60 segons abans de centrifugar 30 segons a 15.900g i a 4°C.
16. Tornar a afegir 30 µl d'H₂O lliure d'ARNases directament al filtre de la columna.
17. Incubar durant 60 segons abans de centrifugar 30 segons a 15.900g i a 4°C.
18. Guardar l'ARNc eluït i purificat a 4°C.

És important preservar la integritat de l'ARNc produït, evitant cicles de congelació i descongelació successius. La integritat es pot avaluar utilitzant el bioanalitzador Agilent 2100 Bioanalyzer i en el que s'ha d'obtenir un perfil semblant al de la figura M8.

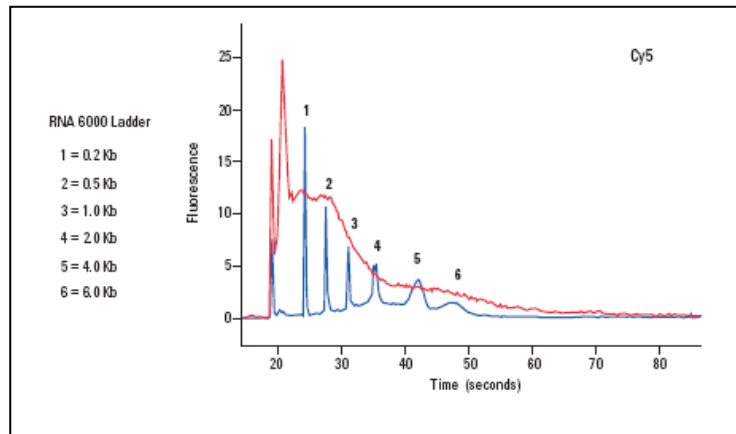


Figura M8. Perfil electroforètic d'ARNc marcat amb fluorescència (Cy5) d'elevada integritat, junt amb el perfil del RNA 6000 ladder.

A.4. Quantificació de l'ARN amplificat

L'ARNc amplificat es quantifica utilitzant l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000, calculant la concentració segons l'equivalència de A260 de valor 1 a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ARN.

Partint de 500 ng d'ARN total s'espera obtenir una quantitat d'ARNc amplificat d'entre 2 i 4 μg , la qual és depenent de la puresa i integritat de la mostra d'ARN.

A.5. Quantificació de l'activitat específica de l'ARN amplificat

Per a la quantificació de l'activitat específica de l'ARN amplificat també s'utilitza l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000, en l'opció d'anàlisi per microarrays del programa. L'activitat específica de l'ARN mesura la quantitat de fluorocrom incorporat en l'ARN i es calcula per a cadascun dels fluorocroms, segons les fórmules especificades en el manual.

Partint de 500 ng d'ARN total s'espera obtenir una activitat específica d'entre 10-15 pmols/ μg . Aquelles mostres d'ARNc amb activitat específica inferior a 8 pmols/ μg no s'haurien d'hibridar en el microarray.

B. Fragmentació i hibridació de la mostra als microarrays

Una vegada les mostres estan marcades ja estan apunt per ser fragmentades i hibridades en el microarray.

En el nostre estudi es van hibridar simultàniament en un microarray 750 ng d'ARNc amplificat i marcat amb Cy5 o Cy3 corresponent a mostra d'un pacient junt amb mostra d'un pool de 10 individus sans, amb una activitat específica d'entre 7 i 15 pmols/ μ g. Cada comparativa es va hibridar per duplicat, realitzant un marcatge amb fluorocroms invers o *dye swap*, per tal d'eliminar possibles diferències en la ratio d'incorporació d'ambdós fluorocroms.

El processament s'ha realitzat d'acord al protocol recomanat per Agilent (*Agilent oligonucleotide microarray hybridization, Manual Part Number G4140-90010*, 1era edició, versió 4.1, Octubre 2002).

Equipament

Hybridization Chamber kit-SureHyb enabled, Stainless (G2534A, Agilent Technologies)

Forn d'hibridació (G2545, Agilent Technologies)

Reactius

Kit d'hibridació (5184-3568, Agilent Technologies)

Conté: -25x *Fragmentation buffer*

-2x *Hybridization buffer*

-10% *Triton X-102*

-10x *Control targets*

Whole Human Genome oligonucleotide microarrays (G4112A, Agilent Technologies)

SSC 20x (0804, Amresco)

Aigua lliure d'ARNases (BE51200, Accugene)

Procediment

B.1. Fragmentació i preparació de la solució d'hibridació

Tot el procediment s'ha de realitzar en fred i protegint les mostres de la llum, pel què s'utilitza un eppendorf d'1,5 ml àmber.

B.1.1. Preparació de la solució 2x *Target*

Per a la preparació de la solució 2x *Target Solution* que contindrà l'ARNc que s'hibridarà en el microarray es barregen els següents reactius:

- 750 ng de Cy3-cRNA
- 750 ng de Cy5-cRNA
- 50 µl de 10x *Control targets*
- H₂O lliure d'ARNases fins a 240 µl (el volum d'aigua necessari varia segons la concentració de l'ARNc de cada mostra)

La solució 2x *Target* preparada es pot guardar congelada a -80°C durant 1 mes.

B.1.2. Fragmentació i preparació de la solució d'hibridació 1x.

1. Afegir 10 µl de 25x *Fragmentation buffer* als 240 µl.
2. Barrejar amb el vortex.
3. Incubar 30 minuts a 60°C.
4. Afegir 225 µl de Buffer d'hibridació 2x, obtenint una solució d'hibridació 1x de volum final de 475 µl.
5. Es barreja pipetejant amb cura de no generar bombolles. No vortejar.
6. Fer un pols.
7. Procedir a hibridar la solució immediatament.

B.2. Muntatge del microarray en la cambra d'hibridació i hibridació

Per a hibridar la mostra marcada i fragmentada en el microarray cal utilitzar cambres d'hibridació, una per cada mostra. És important identificar correctament cada cambra d'hibridació amb l'identificador de la mostra que s'hi hibridarà.

1. Col·locar el cobreobjectes dins la cambra d'hibridació.
2. Amb una pipeta dipositar tot el volum de la solució (475 µl) sobre el cobreobjectes
3. Col·locar el microarray a sobre el cobreobjectes, tenint en compte que la part activa del microarray, on es troben les sondes, correspon a la part que conté la inscripció Agilent. La part inactiva és la que conté com a inscripció el codi de barres del microarray.
4. Posar la tapa de la cambra d'hibridació i tancar.
5. Col·locar la cambra d'hibridació en una graella situada en el rotor del forn d'hibridació, el qual es troba a 60°C i en rotació.
6. Hibridar les mostres durant 18 hores a 60°C i en rotació.

C. Rentats del microarray

Els rentats serveixen per, una vegada hibridada la mostra en el microarray, eliminar l'excés de reactius i de mostra no hibridada i eliminar les unions no específiques, per tal d'evitar falsos positius i reduir el soroll de fons.

Equipament

Agitador magnètic Lab-Mix 10(W930H, Fisher Scientific)

Reactius i solucions

Solució de rentat 1: 6x SSC, 0,005% Triton X-102

Barrejar els següents reactius d'acord als valors de la taula M3:

Taula M3. Reactius de la solució de rentat 1

| Reactiu | Volum (ml) |
|--------------------|---------------|
| H ₂ O | 350 |
| 20x SSC (filtrat) | 150 |
| 10% Triton X-102 | 0,25 |
| Volum total | 400,25 |

-Filtrar la solució utilitzant un filtre de 0,2 µm.

-Segellar l'ampolla i barrejar la solució per agitació.

-Guardar la solució a TA.

Solució de rentat 2: 0,1x SSC, 0,005% Triton X-102

Barrejar els següents reactius d'acord als valors de la taula M4:

Taula M4. Reactius de la solució de rentat 2

| Reactiu | Volum (ml) |
|--------------------|----------------|
| H ₂ O | 248,75 |
| 20x SSC (filtrat) | 1,25 |
| 10% Triton X-102 | 0,125 |
| Volum total | 250,125 |

-Filtrar la solució utilitzant un filtre de 0,2 µm.

-Segellar l'ampolla i barrejar la solució per agitació.

-Guardar la solució a 4°C.

Procediment

C.1. Preparació de les solucions de rentat:

Prèviament als rentats dels microarrays cal preparar les solucions de rentat. Es preparen 250 ml per cubeta.

Preparar 3 cubetes, de la següent manera:

- Cubeta 1: cubeta opaca. Conté la solució de rentat 1 a TA.
- Cubeta 2: conté la solució de rentat 1 a TA, i una graella pels microarrays. Situem la cubeta sobre un agitador magnètic.
- Cubeta 3: conté la solució de rentat 2 a 4°C, i una graella pels microarrays. Tot dins un contenidor amb gel.

C.2. Rentats

1. Submergir les cambres d'hibridació a la cubeta 1.
2. Desmuntar la cambra d'hibridació treient el cobreobjectes amb una pinça. Agitar manualment el microarray per eliminar l'excés de solució d'hibridació. Sempre subjectar el microarray per la part on s'hi troba imprès el codi de barres o per les puntes.
3. Treure el microarray i ràpidament posar-lo en la graella de la cubeta 2.
4. Una vegada la graella conté tots els microarrays agitar la solució utilitzant l'agitador magnètic i una mosca, durant 10 minuts, i després agitar-la manualment durant 5 minuts.
5. Passar la graella a la cubeta 3 i fer aquest 3er rentat en fred. Agitem manualment la graella als 2.5 minuts i als 5 minuts.
6. Posar els microarrays als adaptadors (amb la part activa, que conté la inscripció d'Agilent, cara amunt) per tal d'escanejar-los. Cal escanejar immediatament.

D. Escanejat

L'escanejat dels microarrays consisteix en la detecció de la fluorescència emesa de cada fluorocrom per excitació amb làser. Degut a que es realitza un doble marcatge, en el que una mostra està marcada amb Cy3 i l'altra amb Cy5, la lectura de la fluorescència de cada punt de la matriu del microarray es realitza excitant amb làser el fluorocrom Cy3 a 532-nm i el fluorocrom Cy5 a 633-nm.

Equipament

Agilent dual-laser microarray scanner (G2505A, Agilent Technologies)

Programa Genepix 6.0 (Molecular Dynamics)

Procediment

1. S'introdueixen els microarrays a l'escàner dins els suports i en la posició adequada
2. S'escanegen els microarrays i s'obtenen les imatges de fluorescència.
3. Els valors d'intensitat de fluorescència s'extreuen i es quantifiquen utilitzant el programa Genepix 6.0.

E. Obtenció de la matriu de valors d'intensitat

L'anàlisi de dades dels microarrays d'expressió consisteix en generar una matriu de valors tractats estadísticament, a partir d'una matriu de valors d'intensitat procedent de l'escanejat del microarray, de manera que ens permeti realitzar anàlisis estadístiques comparant els valors de les diferents mostres estudiades.

Els perfils d'expressió dels pacients estudiats es van obtenir utilitzant el microarray d'oligonucleòtids *44K Whole Human Genome oligonucleotide microarray* de la plataforma comercial d'Agilent Technologies. Aquest array conté 44K sondes de 60nt, de les quals 41.000 corresponen a regions d'estudi i la resta són controls del microarray. Per a cada sonda o *feature* del microarray es disposa de la informació de

l'oligonucleòtid que representa, així com de les corresponents dades bioinformàtiques com l'identificador del GenBank, del SwissProt i l'anotació del gen.

Les dades es van dipositar a la base de dades pública GEO amb l'identificador GSE11003.

3.2.1.6. RT-PCR quantitativa a temps real en la trombocitèmia essencial, en trombocitosis reactives i en la policitèmia vera

La tècnica de RQ-PCR permet també quantificar l'expressió gènica, i s'ha utilitzat per a validar l'expressió d'un grup seleccionat de gens d'interès obtinguts en l'anàlisi dels microarrays d'expressió. S'ha utilitzat la plataforma d'arrays de baixa densitat (TaqMan® Low Density Arrays, TLDA) analitzant el mateix grup de pacients estudiats per microarrays d'expressió i en un grup independent de pacients amb TE, així com en pacients amb PV.

Previ a l'estudi de RQ-PCR s'ha valorat la qualitat de l'ARN, utilitzant el mètode d'electroforesi capil·lar (descriu en l'apartat 2.4.1). Només es van escollir aquelles mostres amb un valor d'integritat (RIN) de l'ARN superior a 7.

La tècnica de RQ-PCR consta de dues etapes:

- A. Retrotranscripció de l'ARN total a ADNc
- B. PCR-quantitativa a temps real

A. Retrotranscripció

La RT consisteix en l'obtenció d'ADNc de cadena senzilla a partir de l'ARN total.

Per a la RT de les mostres del present treball s'han utilitzat dos kits de RT de la mateixa casa comercial, ja que el *High capacity cDNA archive kit* va ser substituït pel *High capacity cDNA reverse transcription kit* durant el desenvolupament del projecte. El processament s'ha realitzat de manera manual i d'acord als respectius protocols recomanats per Applied Biosystems (*High capacity cDNA archive kit, Manual Part Number 4322169 Rev. A, 2000; High capacity cDNA reverse transcription kit, Manual Part Number 4375575 Rev. C. 10/2006*). Ambdós kits retrotranscriuen l'ARN total a ADNc utilitzant *primers* de tipus random (octàmers) i els mateixos reactius, diferint només en el volum d'ADNc generat: en el *High capacity cDNA archive kit* obtenim un volum de 100 µl i en el *High capacity cDNA reverse transcription kit* de 20 µl. En

ambdós kits s'ha partit de 500 ng d'ARN total de cada mostra, a una concentració entre 50 a 200 ng/µl i amb un contingut d'ADN genòmic inferior al 0,5%, de manera que, considerant que l'eficiència de la RT és del 100%, s'han obtingut les següents concentracions d'ADNc:

-5 ng/µl amb el *High capacity cDNA archive kit*

-25 ng/µl amb el *High capacity cDNA reverse transcription kit*

Equipament

Termociclador 2720 (4359659G, Applied Biosystems)

Reactius

High capacity cDNA archive kit, "Kit 1" (4322171, Applied Biosystems) i *High capacity cDNA reverse transcription kit* amb inhibidor d'ARNases "Kit 2" (4368814, Applied Biosystems):

Ambdós kits contenen:

-10x RT buffer

-10x RT Random primers

-25x dNTPs

-MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/µl

Aigua lliure d'ARNases (BE51200, Accugene)

Processament

Al llarg de tot el processament treballar en fred, utilitzant gel.

1. Descongelar els reactius del kit en gel.

2. Preparar la master mix 2x de la RT d'acord a la taula M5 i calculant un excés de volum del 5%:

Taula M5. Reactius de la master mix de la RT

| Reactiu | Kit 1 | Kit 2 |
|--|-------------------|-------------------|
| | Volum (µl)/ 1 Rxn | Volum (µl)/ 1 Rxn |
| 10x RT buffer | 10 | 2 |
| 25x dNTPs | 4 | 0.8 |
| 10x RT Random primers | 10 | 2 |
| MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/µl | 5 | 1 |
| Aigua lliure d'ARNases | 21 | 4.2 |
| Volum total | 50 | 10 |

3. Fer un vortex i un pols i guardar la RT master mix 2x en gel.
4. Preparar la placa o eppendorf de 0,2 ml per a generar els ADNc.
5. Descongelar els ARNs en gel. Una vegada descongelats es ressuspen la solució fent copets a l'eppendorf i després un pols.
6. Segons els valors de concentració de cada mostra s'afegeix en la placa o eppendorf el volum corresponent a 500 ng.
7. Afegir el volum necessari d'aigua lliure d'ARNases per mostra per assolir un volum final de 50 µl en High capacity cDNA archive kit i de 20 µl en *High capacity cDNA reverse transcription kit*.
8. Fer un pols de la placa o eppendorf.
9. Afegir 50 µl de la RT master mix 2x a cada pou de la placa o eppendorf.
10. Ressuspendre amb la pipeta i fer un pols de la placa o eppendorf.
11. Mantenir la placa o eppendorf en gel fins que els carreguem en el termociclador.
12. Programar el termociclador d'acord a les condicions següents (Taula M6 i Taula M7):

Taula M6. Condicions termociclador pel *High capacity cDNA archive kit (Kit 1)*:

| | Step1 | Step2 |
|-------------|--------|---------|
| Temperatura | 25°C | 37°C |
| Temps | 10 min | 120 min |

Taula M7 Condicions del termociclador pel *High capacity cDNA reverse transcription kit (Kit 2)*:

| | Step1 | Step2 | Step3 | Step 4 |
|-------------|--------|---------|-------|--------|
| Temperatura | 25°C | 37°C | 85°C | 4°C |
| Temps | 10 min | 120 min | 5 seg | ∞ |

13. Carregar la placa o eppendorf al termociclador i iniciar el programa de RT.

14. Una vegada finalitzat el programa fer un pols de la placa o eppendorf i guardar les mostres en fred a 4°C en cas que es realitzi la PCR quantitativa a temps real immediatament i en cas d'ús a més llarg termini cal emmagatzemar-les a -20°C.

B. PCR-quantitativa a temps real utilitzant la plataforma d'arrays de baixa densitat (TaqMan® Low Density Arrays (TLDA))

La tècnica de RQ-PCR, desenvolupada per Higuchi i cols. el 1992, consisteix en una PCR en la que es pot quantificar el producte que s'està amplificant durant la reacció, gràcies a la monitorització de la fluorescència generada pels fluorocroms introduïts. Les sondes Taqman®, emprades en aquest treball, són sondes d'hidròlisi que utilitzen l'activitat 5' exonucleasa de l'enzim Taq polimerasa per a generar fluorescència. Es tracta de sondes marcades amb un fluorocrom a l'extrem 5' (anomenat *reporter*) i un fluorocrom receptor a l'extrem 3' (anomenat *quencher*), el qual bloqueja l'emissió de fluorescència del reporter. Quan la sonda s'uneix als àcids nucleics la Taq polimerasa hidrolitza la sonda, gràcies a la seva activitat exonucleasa 5'-3', i el *quencher* es separa

del *reporter* i aquest últim emet fluorescència. Aquest procés es repeteix en cada cicle de la PCR (Figura M9).

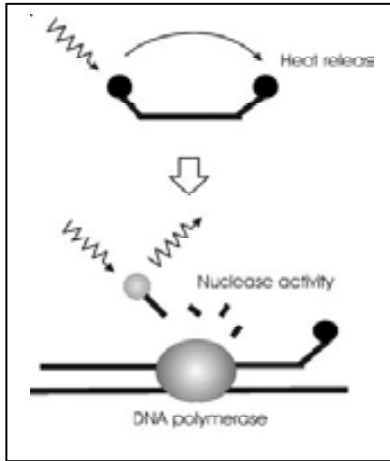


Figura M9. Mecanisme de funcionament de les sondes Taqman (Modificat de Kubista i cols. 2006).

Durant el procés es mesura la quantitat de fluorescència emesa en cada cicle de PCR i es registre el nombre de cicles necessaris per a generar un mínim de fluorescència, conegut com a *Cycle Threshold* (Ct), el qual s'estableix en un punt de la fase de creixement exponencial de la corba de fluorescència, abans de que aquesta arribi a la fase *plateau*, que correspon a la saturació de la reacció de PCR (Figura M10).

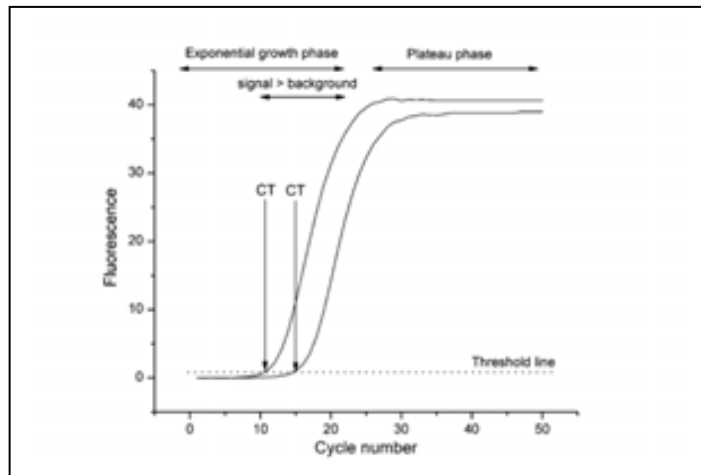


Figura M10. Corba d'amplificació de la RT-PCR quantitativa a temps real (Kubista i cols. 2006).

El Ct és proporcional a la quantitat inicial de molècules d'ARN de la mostra de manera que és un valor que permet quantificar el nombre inicial de còpies de l'ARN d'interès.

Aquesta tècnica té una elevada especificitat i sensibilitat i és àmpliament utilitzada per a validar els resultats d'expressió obtinguts mitjançant la tècnica de microarrays d'expressió.

B1. Disseny de les plataformes TLDA

Per a l'anàlisi de RQ-PCR s'ha utilitzat la plataforma TLDA, que consisteix en una targeta amb 384 pous cadascun dels quals conté un assaig Taqman®. S'han dissenyat tres plataformes de TLDA (anomenades TLDA1, TLDA2 i TLDA3), d'acord als resultats obtinguts en els microarrays d'expressió, dos que contenen 96 gens per duplicat (format 96a, TLDA1 i TLDA3) i una altra amb 48 gens per duplicat (TLDA2) (Figura M11).

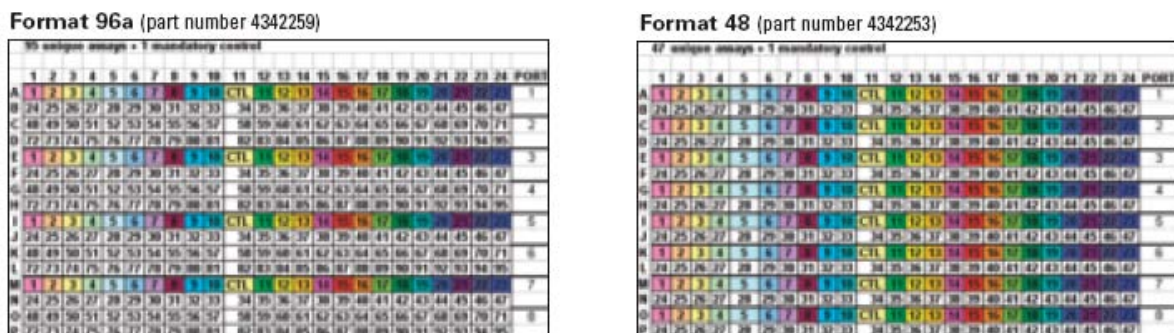


Figura M11. Format 96a i 48 de les TLDA

Les TLDA consten de 384 pous amb 8 canals d'entrada, cadascun dels quals comunica amb 48 pous (Figura M12). D'aquesta manera, en el format de TLDA per 96 gens s'hi han analitzat 2 pacients/targeta (carregant mostra del pacient 1 en els 4 primers canals d'entrada i del pacient 2 en els 4 últims canals) i en el format de TLDA de 48 gens s'hi han analitzat 4 pacients/targeta (carregant mostra de cada pacient en 2 canals d'entrada consecutius).

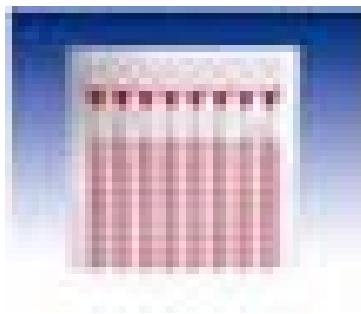


Figura M12. Plafaforma TLDA

Per a cada gen d'estudi s'ha escollit l'assaig Taqman® corresponent a la sonda del microarray, i sempre que estava disponible s'han escollit assaigs de tipus “_m”, els quals només amplifiquen regions exòniques (regions d'unió d'exons) i s'evita així l'amplificació d'ADN genòmic. Per un nombre reduït de gens s'han escollit assaigs de tipus “_g” (pot detectar ADN) o “_s” (regió intraexònica, detecta ADN), en els que és possible que s'amplifiqui ADN genòmic. El llistat dels assaigs inclosos en cada disseny, junt amb els respectius controls endogens, es troben en les Taules M8, M9 i M10).

Taula M8. Llistat d'assaigs inclosos en el format de TLDA 96a. **Plataforma TLDA 1.**

| Gen | Descripció | Assaig Taqman |
|----------------|--|---------------|
| <i>ACAT2</i> | acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase) | Hs00255067_m1 |
| <i>ANKRD15</i> | ankyrin repeat domain 15 | Hs00299498_m1 |
| <i>AP3M1</i> | adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit | Hs00201543_m1 |
| <i>ARL8</i> | ADP-ribosylation factor-like 8, | Hs00379311_m1 |
| <i>ARRDC3</i> | arrestin domain containing 3 | Hs00385845_m1 |
| <i>AXUD1</i> | AXIN1 up-regulated 1 | Hs00263583_m1 |
| <i>AZIN1</i> | antizyme inhibitor 1, | Hs00210634_m1 |
| <i>B2M</i> | beta-2-microglobulin | Hs99999907_m1 |
| <i>BCL2A1</i> | BCL2-related protein A1, Gene hCG201186 Celera Annotation | Hs00187845_m1 |
| <i>BTN2A2</i> | butyrophilin, subfamily 2, member A2 | Hs00272927_m1 |
| <i>C1QG</i> | complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide | Hs00757779_m1 |
| <i>C4BPA</i> | complement component 4 binding protein, alpha | Hs00426339_m1 |
| <i>CCL20</i> | chemokine (C-C motif) ligand 20 | Hs00171125_m1 |
| <i>CCL23</i> | chemokine (C-C motif) ligand 23 | Hs00270756_m1 |
| <i>CCL3</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3 | Hs00234142_m1 |
| <i>CCL4</i> | chemokine (C-C motif) ligand 4 | Hs99999148_m1 |
| <i>CCNL1</i> | cyclin L1 | Hs00220399_m1 |
| <i>CD44</i> | CD44 antigen | Hs00153304_m1 |
| <i>CD83</i> | CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily) | Hs00188486_m1 |
| <i>CKAP4</i> | cytoskeleton-associated protein 4 | Hs00199135_m1 |
| <i>CNGB1</i> | cyclic nucleotide gated channel beta 1 | Hs00757900_m1 |
| <i>CXCL2</i> | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | Hs00601975_m1 |
| <i>DAF</i> | decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system) | Hs00167090_m1 |
| <i>DDIT4</i> | DNA-damage-inducible transcript 4 | Hs00430304_g1 |
| <i>DDX28</i> | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 | Hs00251087_s1 |
| <i>DNAJA1</i> | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 | Hs00266011_m1 |
| <i>DUSP2</i> | dual specificity phosphatase 2 | Hs00358879_m1 |
| <i>DUSP5</i> | dual specificity phosphatase 5 | Hs00244839_m1 |
| <i>EDN1</i> | endothelin 1 | Hs00174961_m1 |
| <i>EREG</i> | epiregulin | Hs00914313_m1 |

Anàlisi de l'expressió gènica en la TE. Relació amb la PV

| | | |
|--------------------|---|---------------|
| <i>ETS2</i> | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) | Hs00232009_m1 |
| <i>FCAR</i> | Fc fragment of IgA, receptor for | Hs00370197_m1 |
| <i>FOSB</i> | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | Hs00171851_m1 |
| <i>GADD45B</i> | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | Hs00169587_m1 |
| <i>GCH1</i> | GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia) | Hs00609198_m1 |
| <i>GPR43</i> | G protein-coupled receptor 43 | Hs00271142_s1 |
| <i>GPR65</i> | G protein-coupled receptor 65 | Hs00269247_s1 |
| <i>HCST</i> | hematopoietic cell signal transducer | Hs00367159_m1 |
| <i>HLA-G</i> | HLA-G histocompatibility antigen, class I | Hs00365950_g1 |
| <i>ICAM1</i> | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | Hs00164932_m1 |
| <i>ID2</i> | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | Hs00747379_m1 |
| <i>IER3</i> | immediate early response 3 | Hs00174674_m1 |
| <i>IER5</i> | immediate early response 5 | Hs00275419_s1 |
| <i>IL1A</i> | interleukin 1, alpha | Hs00174092_m1 |
| <i>IL1RN</i> | interleukin 1 receptor antagonist | Hs00277299_m1 |
| <i>IL23A</i> | interleukin 23, alpha subunit p19 | Hs00372324_m1 |
| <i>KLF10</i> | Kruppel-like factor 10 | Hs00194622_m1 |
| <i>KLF5</i> | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | Hs00156145_m1 |
| <i>LAMB3</i> | laminin, beta 3 | Hs00165078_m1 |
| <i>LIMS1;LIMS3</i> | LIM and senescent cell antigen-like domains 1,LIM and senescent cell antigen-like domains 3 | Hs00414460_m1 |
| <i>MAFF</i> | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) | Hs00544822_m1 |
| <i>MAP3K8</i> | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 | Hs00178297_m1 |
| <i>MT1K</i> | metallothionein 1K | Hs00828387_g1 |
| <i>MYLIP</i> | myosin regulatory light chain interacting protein | Hs00203131_m1 |
| <i>NBN</i> | nibrin, | Hs00159537_m1 |
| <i>NFE2</i> | nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa | Hs00232351_m1 |
| <i>NFKBIE</i> | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon | Hs00234431_m1 |
| <i>NFKBIZ</i> | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta | Hs00230071_m1 |
| <i>NR4A2</i> | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 | Hs00428691_m1 |
| <i>OSM</i> | oncostatin M | Hs00171165_m1 |
| <i>PDE4B</i> | phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, | Hs00277080_m1 |

| | Drosophila) | |
|-----------------|--|---------------|
| <i>PFKFB3</i> | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 | Hs00190079_m1 |
| <i>PHACTR1</i> | phosphatase and actin regulator 1 | Hs00286959_m1 |
| <i>PLAU</i> | plasminogen activator, urokinase | Hs00170182_m1 |
| <i>PLAUR</i> | plasminogen activator, urokinase receptor, | Hs00182181_m1 |
| <i>PLEKHG2</i> | pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2 | Hs00293943_m1 |
| <i>PLEK</i> | pleckstrin | Hs00160164_m1 |
| <i>PLK2</i> | polo-like kinase 2 (Drosophila) | Hs00198320_m1 |
| <i>PPP1R15A</i> | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | Hs00169585_m1 |
| <i>PRG1</i> | proteoglycan 1, secretory granule | Hs00160444_m1 |
| <i>PRNP</i> | prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia) | Hs00175591_m1 |
| <i>PTGS2</i> | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | Hs00153133_m1 |
| <i>PTX3</i> | pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta | Hs00173615_m1 |
| <i>RABGEF1</i> | RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 | Hs00205696_m1 |
| <i>RBAF600</i> | retinoblastoma-associated factor 600 | Hs00378210_m1 |
| <i>SEC31L1</i> | SEC31-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>) | Hs00274601_m1 |
| <i>SLC35B2</i> | solute carrier family 35, member B2 | Hs00379360_m1 |
| <i>SLC7A5</i> | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 | Hs00185826_m1 |
| <i>SNFT</i> | Jun dimerization protein p21SNFT | Hs00232744_m1 |
| <i>SOD2</i> | superoxide dismutase 2, mitochondrial | Hs00167309_m1 |
| <i>SOLH</i> | small optic lobes homolog (Drosophila) | Hs00232164_m1 |
| <i>SOX4</i> | SRY (sex determining region Y)-box 4 | Hs00268388_s1 |
| <i>TAGAP</i> | T-cell activation GTPase activating protein | Hs00299284_m1 |
| <i>TA-NFKBH</i> | T-cell activation NFKB-like protein | Hs00262018_m1 |
| <i>TBCC</i> | tubulin-specific chaperone c | Hs00268437_s1 |
| <i>TCTE1L</i> | t-complex-associated-testis-expressed 1-like | Hs00359622_m1 |
| <i>TNFAIP3</i> | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | Hs00234713_m1 |
| <i>TNFAIP6</i> | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | Hs00200180_m1 |
| <i>TNF</i> | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | Hs00174128_m1 |
| <i>TRIB1</i> | tribbles homolog 1 (Drosophila) | Hs00179769_m1 |

Anàlisi de l'expressió gènica en la TE. Relació amb la PV

| | | |
|---------------|---|---------------|
| <i>XBP1</i> | X-box binding protein 1 | Hs00231936_m1 |
| <i>ZFP36</i> | zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse) | Hs00185658_m1 |
| <i>ZNF217</i> | zinc finger protein 217 | Hs00232417_m1 |

| Control endogen | Descripció | Assaig Taqman |
|------------------------|--|----------------------|
| <i>18S</i> | eukaryotic 18S ribosomal RNA | Hs99999901_s1 |
| <i>GAPDH</i> | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Hs99999905_m1 |
| <i>GUSB</i> | glucuronidase, beta | Hs99999908_m1 |

Taula M9. Llistat d'assaigs inclosos en el format de TLDA 48. **Plataforma TLDA 2.**

| Gen | Descripció | Assaig Taqman |
|------------------|--|----------------------|
| <i>ADM</i> | adrenomedullin | Hs00181605_m1 |
| <i>ATP2B4</i> | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 | Hs00608066_m1 |
| <i>BATF</i> | basic leucine zipper transcription factor, ATF-like | Hs00232390_m1 |
| <i>BCL2L1</i> | BCL2-like 1 | Hs00236329_m1 |
| <i>C13orf18</i> | chromosome 13 open reading frame 18 | Hs00228336_m1 |
| <i>CCND1</i> | cyclin D1 | Hs00277039_m1 |
| <i>CD14</i> | CD14 molecule | Hs00169122_g1 |
| <i>CD44</i> | CD44 molecule (Indian blood group) | Hs00153304_m1 |
| <i>CD9</i> | CD9 molecule | Hs00233521_m1 |
| <i>CHSY1</i> | carbohydrate (chondroitin) synthase 1 | Hs00208704_m1 |
| <i>CISH</i> | cytokine inducible SH2-containing protein | Hs00367082_g1 |
| <i>CRX</i> | cone-rod homeobox | Hs00230899_m1 |
| <i>EMILIN2</i> | elastin microfibril interfacier 2 | Hs00230757_m1 |
| <i>F2R</i> | coagulation factor II (thrombin) receptor | Hs00169258_m1 |
| <i>HBG1;HBG2</i> | hemoglobin, gamma A;hemoglobin, gamma G | Hs00361131_g1 |
| <i>HBLD2</i> | HESB like domain containing 2 | Hs00832784_sH |
| <i>HCP1</i> | heme carrier protein 1 | Hs00611081_m1 |
| <i>HEMGN</i> | hemogen | Hs00218346_m1 |
| <i>HMOX1</i> | heme oxygenase (decycling) 1 | Hs00157965_m1 |
| <i>HRH4</i> | histamine receptor H4 | Hs00222094_m1 |

| | | |
|----------------|---|---------------|
| <i>IL3RA</i> | interleukin 3 receptor, alpha (low affinity) | Hs00174356_m1 |
| <i>LDHA</i> | lactate dehydrogenase A | Hs00855332_g1 |
| <i>LTBP1</i> | latent transforming growth factor beta binding protein 1 | Hs00386448_m1 |
| <i>MAD1L1</i> | MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) | Hs00269119_m1 |
| <i>MYOM2</i> | myomesin (M-protein) 2, 165kDa | Hs00187676_m1 |
| <i>NDUFV2</i> | NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa | Hs00221478_m1 |
| <i>NEBL</i> | nebullette | Hs00255521_m1 |
| <i>NQO2</i> | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2 | Hs00168552_m1 |
| <i>OPLAH</i> | 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) | Hs00417215_m1 |
| <i>P2RX5</i> | purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5 | Hs00531938_m1 |
| <i>PIM1</i> | pim-1 oncogene | Hs00171473_m1 |
| <i>PLB1</i> | phospholipase B1 | Hs00290809_m1 |
| <i>PLEK2</i> | pleckstrin 2 | Hs00212774_m1 |
| <i>PWP1</i> | PWP1 homolog (S. cerevisiae) | Hs00199991_m1 |
| <i>SLAMF1</i> | signaling lymphocytic activation molecule family member 1 | Hs00234149_m1 |
| <i>SLC2A1</i> | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 | Hs00197884_m1 |
| <i>SLC4A10</i> | solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 10 | Hs00222849_m1 |
| <i>SOCS1</i> | suppressor of cytokine signaling 1 | Hs00705164_s1 |
| <i>SOCS2</i> | suppressor of cytokine signaling 2 | Hs00919620_m1 |
| <i>SOCS3</i> | suppressor of cytokine signaling 3 | Hs00269575_s1 |
| <i>SPATS2</i> | spermatogenesis associated, serine-rich 2 | Hs00225008_m1 |
| <i>TRPM6</i> | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6 | Hs00214306_m1 |
| <i>UGCG</i> | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase | Hs00234293_m1 |
| <i>ZDHHC20</i> | zinc finger, DHHC-type containing 20 | Hs00708514_s1 |

| Control endogen | Descripció | Assaig Taqman |
|------------------------|---|----------------------|
| 18S | eukaryotic 18S ribosomal RNA | Hs99999901_s1 |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Hs99999905_m1 |
| GUSB | glucuronidase, beta | Hs99999908_m1 |
| HPRT1 | hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) | Hs99999909_m1 |

Taula M10. Llistat d'assaigs inclosos en el format de TLDA 96a, resultat de la selecció de gens del formats 96a i 48 anteriors. En **negreta** els gens inclosos en el format anterior de 96a i sense negreta els gens inclosos en el format de 48. **Plataforma TLDA 3.**

| Gen | Descripció | Assaig Taqman |
|----------------|---|----------------------|
| ACAT2 | acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase) | Hs00255067_m1 |
| ANKRD15 | ankyrin repeat domain 15 | Hs00299498_m1 |
| ARL8 | ADP-ribosylation factor-like 8 | Hs00379311_m1 |
| AXUD1 | AXIN1 up-regulated 1 | Hs00263583_m1 |
| AZIN1 | antizyme inhibitor 1 | Hs00210634_m1 |
| B2M | beta-2-microglobulin | Hs99999907_m1 |
| BATF | basic leucine zipper transcription factor, ATF-like | Hs00232390_m1 |
| BCL2A1 | BCL2-related protein A1, Gene hCG201186 Celera Annotation | Hs00187845_m1 |
| BTN2A2 | butyrophilin, subfamily 2, member A2 | Hs00272927_m1 |
| C13orf18 | chromosome 13 open reading frame 18 | Hs00228336_m1 |
| C4BPA | complement component 4 binding protein, alpha | Hs00426339_m1 |
| CCL20 | chemokine (C-C motif) ligand 20 | Hs00171125_m1 |
| CCL23 | chemokine (C-C motif) ligand 23 | Hs00270756_m1 |
| CCL3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | Hs00234142_m1 |
| CCL4 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | Hs99999148_m1 |
| CCNL1 | cyclin L1 | Hs00220399_m1 |
| CD44 | CD44 antigen | Hs00153304_m1 |
| CD83 | CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily) | Hs00188486_m1 |
| CISH | cytokine inducible SH2-containing protein | Hs00367082_g1 |
| CKAP4 | cytoskeleton-associated protein 4 | Hs00199135_m1 |
| CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | Hs00601975_m1 |
| DAF | decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system) | Hs00167090_m1 |
| DDIT4 | DNA-damage-inducible transcript 4 | Hs00430304_g1 |
| DDX28 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 | Hs00251087_s1 |
| DNAJA1 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 | Hs00266011_m1 |
| DUSP2 | dual specificity phosphatase 2 | Hs00358879_m1 |
| DUSP5 | dual specificity phosphatase 5 | Hs00244839_m1 |

| | | |
|---------|--|---------------|
| EDN1 | endothelin 1 | Hs00174961_m1 |
| EREG | epiregulin | Hs00914313_m1 |
| ETS2 | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) | Hs00232009_m1 |
| FCAR | Fc fragment of IgA, receptor for | Hs00370197_m1 |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | Hs00171851_m1 |
| GADD45B | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | Hs00169587_m1 |
| GCH1 | GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia) | Hs00609198_m1 |
| GPR43 | G protein-coupled receptor 43 | Hs00271142_s1 |
| GPR65 | G protein-coupled receptor 65 | Hs00269247_s1 |
| HCST | hematopoietic cell signal transducer | Hs00367159_m1 |
| HRH4 | histamine receptor H4 | Hs00222094_m1 |
| ICAM1 | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | Hs00164932_m1 |
| ID2 | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | Hs00747379_m1 |
| IER3 | immediate early response 3 | Hs00174674_m1 |
| IER5 | immediate early response 5 | Hs00275419_s1 |
| IL1A | interleukin 1, alpha | Hs00174092_m1 |
| IL1RN | interleukin 1 receptor antagonist | Hs00277299_m1 |
| IL23A | interleukin 23, alpha subunit p19 | Hs00372324_m1 |
| KLF10 | Kruppel-like factor 10 | Hs00194622_m1 |
| KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | Hs00156145_m1 |
| LAMB3 | laminin, beta 3 | Hs00165078_m1 |
| MAFF | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) | Hs00544822_m1 |
| MAP3K8 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 | Hs00178297_m1 |
| MYLIP | myosin regulatory light chain interacting protein | Hs00203131_m1 |
| NBN | nibrin, | Hs00159537_m1 |
| NFE2 | nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa | Hs00232351_m1 |
| NFKBIE | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon | Hs00234431_m1 |
| NFKBIZ | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta | Hs00230071_m1 |
| NR4A2 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 | Hs00428691_m1 |
| OSM | oncostatin M | Hs00171165_m1 |
| PDE4B | phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 duncce | Hs00277080_m1 |

| | homolog, Drosophila) | |
|----------|--|---------------|
| PFKFB3 | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 | Hs00190079_m1 |
| PIM1 | pim-1 oncogene | Hs00171473_m1 |
| PLAU | plasminogen activator, urokinase | Hs00170182_m1 |
| PLAUR | plasminogen activator, urokinase receptor, | Hs00182181_m1 |
| PLEK | pleckstrin | Hs00160164_m1 |
| PLEKHG2 | pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2 | Hs00293943_m1 |
| PLK2 | polo-like kinase 2 (Drosophila) | Hs00198320_m1 |
| PPP1R15A | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | Hs00169585_m1 |
| PRG1 | proteoglycan 1, secretory granule | Hs00160444_m1 |
| PRNP | prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia) | Hs00175591_m1 |
| PTGS2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | Hs00153133_m1 |
| PTX3 | pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta | Hs00173615_m1 |
| RABGEF1 | RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 | Hs00205696_m1 |
| RBAF600 | retinoblastoma-associated factor 600 | Hs00378210_m1 |
| SEC31L1 | SEC31-like 1 (S. cerevisiae) | Hs00274601_m1 |
| SLC35B2 | solute carrier family 35, member B2 | Hs00379360_m1 |
| SLC7A5 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 | Hs00185826_m1 |
| SNFT | Jun dimerization protein p21SNFT | Hs00232744_m1 |
| SOCS2 | suppressor of cytokine signaling 2 | Hs00919620_m1 |
| SOCS3 | suppressor of cytokine signaling 3 | Hs00269575_s1 |
| SOD2 | superoxide dismutase 2, mitochondrial | Hs00167309_m1 |
| SOLH | small optic lobes homolog (Drosophila) | Hs00232164_m1 |
| SOX4 | SRY (sex determining region Y)-box 4 | Hs00268388_s1 |
| TAGAP | T-cell activation GTPase activating protein | Hs00299284_m1 |
| TA-NFKBH | T-cell activation NFKB-like protein | Hs00262018_m1 |
| TBCC | tubulin-specific chaperone c | Hs00268437_s1 |
| TCTE1L | t-complex-associated-testis-expressed 1-like | Hs00359622_m1 |
| TNF | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | Hs00174128_m1 |

| | | |
|----------------|---|---------------|
| TNFAIP3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | Hs00234713_m1 |
| TNFAIP6 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | Hs00200180_m1 |
| TRIB1 | tribbles homolog 1 (Drosophila) | Hs00179769_m1 |
| XBP1 | X-box binding protein 1 | Hs00231936_m1 |
| ZFP36 | zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse) | Hs00185658_m1 |
| ZNF217 | zinc finger protein 217 | Hs00232417_m1 |

| Control endogen | Descripció | Assaig Taqman |
|------------------------|---|----------------------|
| 18S | eukaryotic 18S ribosomal RNA | Hs99999901_s1 |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | Hs99999905_m1 |
| GUSB | glucuronidase, beta | Hs99999908_m1 |
| HPRT1 | hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) | Hs99999909_m1 |

B.2. Procediment per a processar les TLDA

La tècnica de PCR-quantitativa a temps real s'ha realitzat a partir de l'ADNc generat per RT en l'apartat anterior (A) i els nivells relatius d'expressió s'han determinat per la fluorescència generada durant l'amplificació de l'ADNc per PCR i detectada utilitzant l'aparell ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems).

Per a la realització d'aquesta tècnica s'ha utilitzat l'equipament disponible com a Servei Científicotècnic localitzat en la Unitat de Genòmica del Parc Científic, Universitat de Barcelona i en el Servei de Genòmica de la Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

Equipament (disponible en els Serveis Científicotècnics)

ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Sequence Detection System (SDS) Software (SDS 2.1 i 2.3)

7900 HT Taqman Low Density Array Hardware Upgrade Kit (PN 4329012):

-Low Density Array Thermal Cycling Block

-7900HT System heated cover

-Low Density Array Sealer

-4 cistelles i adaptadors

Reactius

Taqman Low Density array (TLDA)

Master Mix TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) without UNG (4324018, Applied Biosystems)

Processament

El processament s'ha realitzat d'acord al protocol recomanat per Applied Biosystems (*Applied Biosystems Taqman low density arrays user bulletin, February 3, 2006*).

Cada placa es processa individualment i s'analitza immediatament, a excepció d'alguns casos en els que s'ha deixat la mostra carregada a la TLDA *overnight* a 4°C.

B.2.1. Càlcul dilucions i preparació de la mix per a la PCR

1. Descongelar els ADNc en gel.
2. Vortejar i fer un pols.
3. Per a cada mostra afegir en un eppendorf d'1,5 ml les següents proporcions de reactius per canal d'entrada:

Taula M11. Reactius de la mix per a la PCR

| Reactiu | Volum (µl) |
|---|------------|
| ADNc (30 a 1000ng)+ Aigua lliure RNAses | 50 |
| TaqmanR Universal PCR Master Mix (2x) | 50 |
| Volum per canal | 100 |

S'han utilitzat dos formats de targetes en els que hem partit del mateix ADNc generat de cada mostra però s'ha carregat diferent quantitat d'ADNc per canal (Figura M13):

-Format 96 gens: s'han carregat 50 ng per canal.

-Format 48 gens: s'han carregat 100 ng per canal.

Els càlculs de les dilucions de l'ADNc generat corresponents a cada format de targetes han estat els següents:

Format 96: es carreguen 4 canals/mostra. Es necessiten 200 ng d'ADNc, en un volum de 200µl. Per tant, s'ha de diluïr l'ADNc a 1ng/µl

- Si s'utilitza el *High capacity cDNA archive kit* per a la RT es disposarà de 100 µl d'ADNc 5ng/µl. Diluïr l'ADNc a 1 ng/µl (40 µl ADNc a 5 ng/ µl i 160 µl aigua).

- Si s'utilitza el *High capacity cDNA reverse transcription kit* per a la RTes disposarà de 20 µl d'ADNc a 25ng/ µl. Diluïr l'ADNc a 1 ng/ul (8 µl cDNA a 25 ng/µl i 192 µl aigua).

4. Vortejar i fer un pols de les dilucions

5. En cada mostra en el volum de 200 µl d'ADNc diluït a 1 ng/µl s'hi afegeixen 200 µl de master mix, segons les proporcions de la taula M11, amb un volum final de 400 µl i una concentració de l'ADNc de 0,5 ng/µl.

6. Vortejar i fer un pols.

Format 48: es carreguen 2 canals/mostra. Es necessiten 200 ng d'ADNc, en un volum de 100 µl. Per tant, s'ha de diluïr l'ADNc a 2 ng/µl.

- Si s'utilitza el *High capacity cDNA archive kit* per a la RT es disposarà de 100 µl d'ADNc a 5 ng/µl. Diluïr l'ADNc a 2ng µl (40 µl ADNc a 5ng/µl i 60 µl aigua).

- Si s'utilitza el *High capacity cDNA reverse transcription kit* per a la RT: es disposarà de 20 µl d'ADNc a 25ng/ul. Diluïr l'ADNc a 2 ng/ul (8 µl cDNA a 25 ng/ul i 92 µl aigua).

4. Vortejar i fer un pols de les dilucions.

5. En cada mostra en el volum de 100 µl d'ADNc diluït a 1 ng/µl hi afegim 100 µl de master mix, segons les proporcions de la taula anterior, amb un volum final de 200 µl i una concentració de l'ADNc d'1 ng/µl.

6. Vortejar i fer un pols.

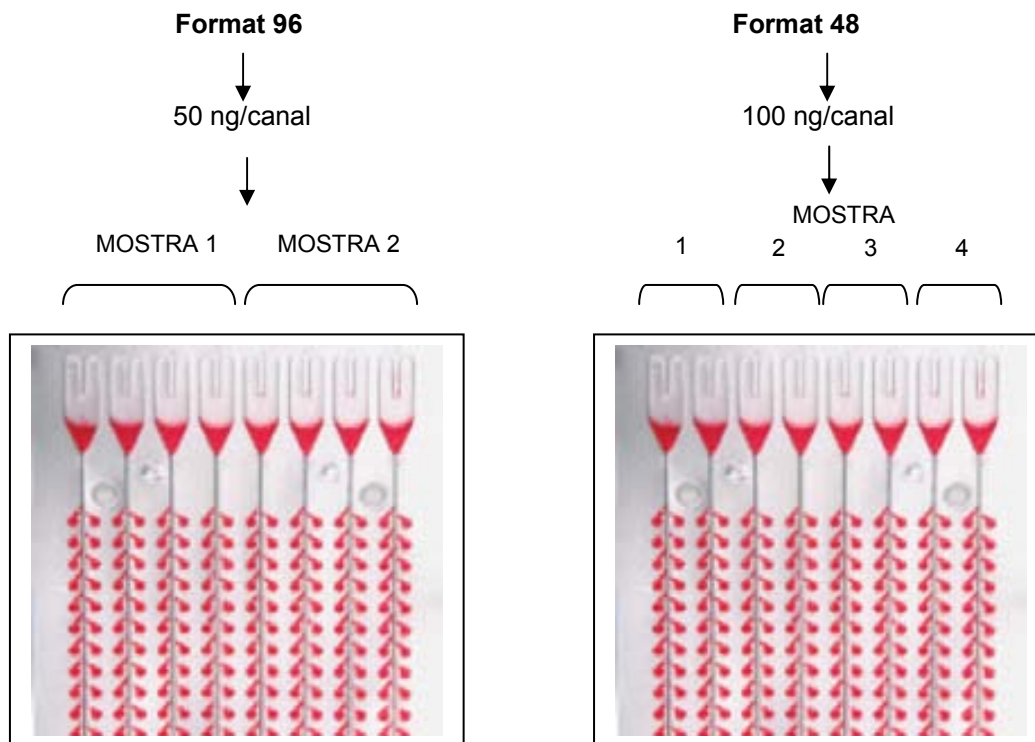


Figura M13. Esquema de la càrrega dels dos formats de les targetes

B2.2. Càrrega mix de PCR a la TLDA

1. Atemperar la TLDA i desempaquetar-la.
2. Col·locar la TLDA de cap per amunt sobre la taula de treball.
3. Identificar els canals d'entrada de la placa d'acord amb les mostres que es carregaran per canal. La distribució és diferent segons el format de la TLDA (segons figura M13).
4. Carregar 100 µl de la mix de PCR per canal, utilitzant una pipeta de 100 µl o 200 µl. Introduïr la punta de la pipeta en el forat esquerre del canal, el més gran, amb cura de no malmetre el suport de la placa.

5. Comprovar que el volum carregat és el mateix en tots els canals.

B.2.3. Centrifugació de la TLDA

Una vegada s'han carregat els canals d'entrada amb les mostres d'ADNc es centrifuga la TLDA per tal de distribuir les mostres a tots els pous. Cada canal comunica amb 48 pous o assaigs Taqman, així el volum de reacció per pou és de 2 µl aproximadament.

1. Col·locar la TLDA en l'adaptador de placa, en posició vertical i encarada a fora. Col·locar l'adaptador dins la cistella, la qual ha de tenir l'inscripció encarada a fora.

2. Utilitzar una TLDA buida com a contrapès.

3. Introduïr les dues cistelles que contenen les TLDAs en la centrifuga.

4. Centrifugar la TLDA fent dues centrifugades consecutives d'1 minut a 1.200rpm cadascuna.

5. Examinar la correcta distribució de la mostra en els pous de la TLDA, comprovant que queda un residu de volum en els canals d'entrada i que aquest és uniforme en tots els canals. Si la distribució no és uniforme degut a que queda un excés de mostra en un dels canals cal centrifugar la TLDA de nou durant 1 minut a 1.200rpm. És important no centrifugar més de 3 minuts acumulats, ja que es pot deformar la TLDA.

B.2.4. Segellat de la TLDA

Cal segellar la TLDA per tal d'aïllar cadascun dels pous, els quals estaven comunicats durant la càrrega de la mostra.

1. Col·locar el segellador en la posició d'inici.

2. Disposar la TLDA cap per avall i en la orientació adequada, d'acord a les indicacions del segellador i fixar-la introduïnt la placa en els dos pins de la part inferior. La TLDA ha de quedar al mateix nivell que la base del segellador.

3. Empènyer lentament i amb força el carro en la direcció de les fletxes indicades en el *Sealer*, passant per sobre de la TLDA, fins arribar al punt de parada. La TLDA ha quedat segellada.

4. Treure la TLDA del segellador.
5. Tallar els canals d'entrada de manera que ens quedi només la placa de 384 pous apunt per processar-la.

B.2.4. Anàlisi de la TLDA

Abans de processar la TLDA és necessari importar en el programa SDS de l'aparell ABI PRISM 7900 HT el fitxer "Assay Information File, AIF", el qual conté la informació dels assaigs Taqman i els respectius detectors de cada pou. Aquest fitxer és utilitzat per a configurar la matriu de la placa de TLDA.

1. Obrir el programa SDS.
2. Seleccionar *File>New*. Escollir *Relative Quantificatio*".
3. Importar el fitxer AIF, seleccionant *File>Import*. Navegar per localitzar el fitxer i importar-lo. La configuració de la matriu de la placa és automàtica.
4. Identificar les mostres que hem carregat a la placa i els controls endògens.
5. Seleccionar opció *Instrument* i després *Real-Time*.
6. Comprovar que el programa està connectat a l'aparell, clicar *Connect to Instrument*.
7. Obrir la safata de la placa clicant *Open*.
8. Col·locar la TLDA en el bloc que es troba en la safata, en l'orientació adequada.
9. Seleccionar *Start Run*. La safata es tanca automàticament i l'aparell comença a realitzar els cicles de PCR registrant a temps real la fluorescència detectada.
10. Una vegada acabada l'anàlisi apareix la *dialog box* de *Run Complete*. Clicar *Ok* i *Open* per tal de treure la TLDA.

B.2.5. Visualització de les dades crues i obtenció dels Cts

Software

Sequence Detection System (SDS) Software (SDS 2.1 i 2.3)

RQ Manager Software (RQ 1.2)

Per a obtenir els valors d'expressió de cadascun dels gens de la TLDA s'utilitza el mateix programa SDS emprat pel processament de la mostra. En el present treball s'ha utilitzat el programa SDS versió 2.1 i SDS versió 2.3 juntament amb el programa RQ Manager versió 1.2.

El programa SDS permet visualitzar les corbes d'amplificació de cada assaig i analitzar les dades per obtenir els valors de Ct. Per a l'anàlisi s'ha escollit l'opció de Ct i *baseline* automatic, per tal d'estandaritzar al màxim els paràmetres d'anàlisi.

3.2.1.7. Anàlisi de les dades dels microarrays d'expressió i de les TLDA

Programes informàtics

GenePix 6.0 (Molecular Dynamics)

Entorn R: www.r-project.org

Paquet Bioconductor: www.bioconductor.org

MultiExperimentViewer (MEV): www.tm4.org/mev

Programa SPSS12 (SPSS Inc.)

Ingenuity Pathways Analysis software (Ingenuity Systems, Inc.)

FATIGO+ *gene ontology-based application*: bioinfo.cipf.es

A. Pre-processament i normalització de les dades

A.1. Microarrays d'expressió

En l'anàlisi de les dades de microarrays es va realitzar un primer pas de filtratge en el que només es van seleccionar aquelles sondes amb una intensitat superior al doble del soroll de fons, no es trobaven saturades i no estaven identificades com a absents segons el programa d'anàlisi GenePix 6.0. Posteriorment, es van normalitzar les dades utilitzant l'eina MMARGE, una implementació en format web del paquet de Limma en l'entorn de R (Smyth i cols. 2004; Gentleman i cols. 2004). La normalització de les dades és necessària per a escalar els valors d'intensitat entre les diferents mostres per tal de poder comparar els resultats dels diferents xips entre sí.

A.2. TLDA

En l'anàlisi de les dades de TLDA s'ha realitzat un filtre dels resultats eliminant aquells assaigs que presentaven entre les dues rèpliques una desviació estàndar $>0,2$ o bé una diferència de $Ct > 0,5$, considerant que no han replicat bé. A la vegada s'ha comprovat també la correcta amplificació de cadascun dels assaigs analitzats,

observant la corba d'amplificació. Si aquesta presentava un perfil aberrant s'eliminava l'assaig de l'estudi. La normalització de les dades s'ha realitzat dins el mètode de quantificació relativa, utilitzat per a l'anàlisi dels gens diferencialment expressats detallat en l'apartat B.2.

B. Anàlisi dels gens diferencialment expressats

B.1. Microarrays d'expressió

A partir de les dades dels microarrays d'expressió es va analitzar l'expressió de gens diferencials entre els pacients amb TE i els controls. Els valors d'expressió diferencial s'expressen en forma de FC, que correspon al \log_2 de la ratio entre les dues comparacions. Es va aplicar un test estadístic Bayesià emprant també l'eina MMARGE i utilitzant el FC d'ambdues rèpliques d'hibridació de cada mostra (del marcatge directe i *dye swap*). Es va considerar que un gen es trobava diferencialment expressat quan el valor B de l'estadístic Bayesià era superior a 3.

B.2. TLDA

L'anàlisi comparativa entre les diferents mostres s'ha realitzat utilitzant el **mètode de quantificació relativa** (Kenneth i cols. 2001). Aquesta anàlisi consisteix en un primer pas de normalització de les dades, en el que el valor d'expressió de cada assaig correspon a la diferència de la mitjana del Ct de cada assaig amb la mitjana geomètrica dels controls endògens de cada mostra (ΔCt).

$$\Delta Ct_{\text{assaig1_mostra 1}} = Ct_{\text{assaig 1_mostra1}} - Ct_{\text{controls endogens_mostra1}}$$

$$\Delta Ct_{\text{assaig1_pool controls}} = Ct_{\text{assaig 1_pool controls}} - Ct_{\text{controls endogens_pool controls}}$$

Posteriorment s'utilitzen les dades del pool de 10 controls, dels que també s'obté el valor de ΔCt per a cada assaig, com a mostra calibradora i s'obté el valor de $\Delta \Delta Ct$ per

cada assaig, que correspon a la diferència entre el ΔCt de la mostra i el pool de controls.

$$\Delta\Delta Ct_{\text{assaig1_mostra1}} = \Delta Ct_{\text{assaig1_mostra1}} - \Delta Ct_{\text{assaig1_pool controls}}$$

D'aquesta manera s'obté la quantificació relativa de l'expressió del gen, la qual s'expressa com a $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Per a l'elecció dels millors controls endogens per a normalitzar les dades s'ha utilitzat el mètode de Vandesompele (Vandesompele i cols. 2002).

Per tal de reduir les diferències d'expressió que podien ser degudes al processament de les TLDA en diferents tandes, en cada tanda es va repetir el processament del *pool* de controls i es va utilitzar per a normalitzar les dades.

C. Anàlisi d'agrupació de les dades

C.1. Anàlisi no supervisada

Tant en les dades de microarrays d'expressió i de TLDA, es van aplicar algorismes d'agrupament (*clustering*) jeràrquics per tal d'explorar l'agrupació de les dades d'expressió dels pacients entre sí. Es van utilitzar paquets de Bioconductor en l'entorn estadístic de computació R i el programa MEV. En l'anàlisi de les dades de microarrays d'expressió els resultats d'agrupació es van validar utilitzant el mètode de PCA i una anàlisi segons el mètode inclòs en el programa informàtic FADA (Lozano i cols. 2005).

C.2. Anàlisi supervisada

També es va realitzar una anàlisi supervisada, de les dades de microarrays d'expressió i de les TLDA, per a identificar els gens diferencialment expressats en les

diferents categories clínic-biològiques. Les anàlisis estadístiques s'han realitzat utilitzant els paquets de Bioconductor en l'entorn estadístic de computació R i el programa SPSS12. Depenent del nombre de grups a comparar es va utilitzar un o altre mètode estadístic: t-test per a comparació entre dos grups i ANOVA d'un factor per a comparatives de més de dos grups, i test no paramètrics quan era necessari. S'ha emprat la correlació de Pearson per a estudiar la correlació entre l'expressió dels gens i les variables contínues. La significància estadística es va considerar per a valors de $P < 0,05$.

D. Anàlisi funcional i interpretació biològica de les dades

Es va realitzar també un estudi funcional dels gens diferencialment expressats en ambdues tècniques i en les diferents comparatives. Es va utilitzar el programa *Ingenuity Pathways Analysis software* i l'aplicació FATIGO+, les quals proporcionen la informació d'ontologia gènica (*GO, Gene Ontology*) dels gens anotats així com les vies de senyalització i xarxes genètiques comunes d'aquests gens. A més a més, els gens d'interès es van estudiar a través de bases de dades genòmiques disponibles a internet, com GeneCards (www.genecards.org), GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), UniProt (www.ebi.ac.uk/uniprot) i Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).

E. Anàlisi comparativa dels microarrays d'expressió i de les TLDA

Es va realitzar una anàlisi comparativa de l'expressió dels 96 gens seleccionats dels microarrays, analitzant mitjançant el test de correlació d'Spearman la concordància entre els valors d'expressió obtinguts en els microarrays d'expressió i en les TLDA, en els 20 pacients amb TE inclosos en ambdós estudis. Per a l'anàlisi es va considerar el valor de quantificació relativa FC dels microarrays el qual és equivalent al valor de quantificació relatiu $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_t})$ de les TLDA. En ambdues tècniques el valor d'expressió és relatiu al mateix pool de 10 mostres controls.

F. Creació del predictor

El model predictor en els pacients amb TE es va construir amb les dades de TLDA. Es va seleccionar un grup de mostres com a *training set* (26 mostres; 13 *JAK2V617F*-positives i 13 *JAK2V617F*-negatives) i el predictor es va avaluar en un grup de mostres independent que seria el *validation set* (12 mostres; 6 *JAK2V617F*-positives i 6 *JAK2V617F*-negatives). Es va utilitzar l'algorisme MiPP (Misclassification-Penalized Posterior) (Soukup i cols. 2005), el qual es basa en un model de classificació incremental per passos per a descobrir els models predictius més parsimoniosos. L'entrenament del model es va realitzar utilitzant diferents algorismes de classificació incloent l'anàlisi discriminant lineal i discriminant quadràtic lineal, aprenentatge pel vector de suport i la regressió logística.

3.2.2. Estudis d'expressió proteica en la trombocitèmia essencial

3.2.2.1. Obtenció i processament de la mostra

Per a la realització dels estudis d'expressió a nivell de proteïna s'han emprat els granulòcits obtinguts de la SP així com la biòpsia de MO. Només s'han inclòs pacients diagnosticats de TE i controls sans. Com a control de l'estudi d'expressió proteica del FOSB s'ha emprat la línia cel·lular K562 i una biòpsia de càncer de mama.

3.2.2.1.1. Obtenció dels granulòcits

Els granulòcits s'obtenen de la SP i s'aïllen mitjançant la separació per gradient de densitat i la sedimentació per dextrà, mètodes descrits en l'apartat 2.2.2.

3.2.2.1.2. Inclusió de les biòpsies de mama i preparació dels talls

Les biòpsies de mama s'han fixat amb formalina tamponada el 10% i posteriorment s'han inclòs en parafina. Per a realitzar els estudis d'immunohistoquímica s'han realitzat talls del bloc d'estudi, utilitzant el micròtom, en seccions de 3 µm i s'han muntat sobre un portaobjectes silanitzat carregat positivament (portaobjectes superfrost plus) perquè la mostra s'adhereixi al vidre.

3.2.2.1.3. Cultiu de cèl·lules K562 i estimulació amb TPA

Equipament

Incubador: Autoflow 8500 Water Jacket CO₂ Incubator (Nuaire)

Reactius

RPMI al 10% FCS (*Fetal Calf Serum*)

PBS 1x (preparat a partir de PBS 10x (1666789, Roche)

TPA (*Phorbol-12-myristate 13-acetate*) (P8139, Sigma)

DMSO (Dimetil sulfòxid) (D2438, Sigma-Aldrich)

Procediment

Les cèl·lules de la línia cel·lular K562 s'han descongelat i s'han cultivat en flascons ROUX de 75 ml de capacitat amb 15 ml de medi RPMI al 10% FCS, a una concentració de $0,5-1 \times 10^6$ cèl·lules/mL i en una estufa a 37°C i 5% de CO₂. Els cultius s'han mantingut durant uns 15 dies, realitzant una dilució cel·lular cada 2-3 dies.

S'han sembrat cinc flascons amb cèl·lules K562, segons les condicions següents:

- Flascó 1: cèl·lules K562 amb medi RPMI, cultiu de 24 hores
- Flascó 2: cèl·lules K562 amb medi RPMI i DMSO, cultiu de 24 hores
- Flascó 3: cèl·lules K562 amb medi RPMI i estimulades amb 20 mg/ml de TPA dissolt en DMSO, cultiu 16 hores
- Flascó 4: cèl·lules K562 amb medi RPMI i estimulades amb 20 mg/ml de TPA dissolt en DMSO, cultiu 24 hores
- Flascó 5: cèl·lules K562 amb medi RPMI i estimulades amb 20 mg/ml de TPA dissolt en DMSO, cultiu 48 hores

Una vegada finalitzat el temps de cultiu les cèl·lules K562 en suspensió es centrifuguen en un tub de 15 ml i es realitza un rentat amb PBS1x, centrifugant durant 5 minuts a 240g i a TA. S'obté el botó cel·lular que es ressuspen en PBS1x. Part de la mostra s'utilitzarà per a la tècnica d'immunocitoquímica (apartat 3.2.2.1.4 i 3.2.2.4) i part pel Western Blot (apartat 3.2.2.5).

3.2.2.1.4. Citocentrifugació

Per a obtenir una extensió dels granulòcits o de les cèl·lules K562 es realitza una citocentrifugació.

Equipament

Cytospin 4 (A78300002, Thermo Scientific)

Reactius i solucions

Sueroalbúmina bovina, SAB (A3294, Sigma-Aldrich) al 2%

Acetona (179124, Sigma-Adrich)

Procediment

1. Col·locar els portaobjectes, prèviament identificats, amb els embuts, el filtre i el suport. Col·locar-ho a la citocentrífuga.
2. Ajustar les cèl·lules a una concentració d'entre 2 i 3×10^5 /ml.
3. Centrifugar-les i reconstituïr-les amb 1 ml de SAB al 2% (de manera que quedin a una concentració entre 2 i 3×10^5 /ml).
4. Posar 0,2 ml per embut (que correspon a una extensió).
5. Centrifugar a la citocentrífuga durant 10 minuts a 500 rpm.
6. Un cop acabada la centrifugació, treure els embuts i els filtres i deixar assecar les extensions.
7. Previ a la congelació de l'extensió cal realitzar una fixació amb acetona durant 1 minut.
8. Embolicar el portaobjectes amb paper d'alumini i es retola amb una etiqueta.
9. Deixar l'extensió al congelador a -20°C fins el moment de realitzar la tècnica d'immunocitoquímica.

3.2.2.2. Tècniques d'immunologia per a l'estudi d'expressió de la proteïna FOSB

En els estudis immunològics de l'expressió del FOSB s'ha utilitzat l'anticòs FOSB (5G4) Rabbit mAb (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts, EEUU).

Com a control de l'estudi d'expressió proteica del FOSB s'ha emprat la línia cel·lular K562 i una biòpsia de càncer de mama.

3.2.2.2.1. Tècnica d'immunohistoquímica

És la tècnica utilitzada per a l'estudi de l'expressió del FOSB en les biòpsies de mama. S'ha utilitzat un sistema de visualització en dos passos, anomenat EnVision, basat en l'aplicació del complex polímer de dextrà conjugat amb un enzim dissenyat per Dako (*Labelled Polymer-HRP Dual Link Rabbit/Mouse*). És un sistema que incrementa la sensibilitat de la detecció de l'anticòs primari.

Equipament

Ptlink (PT10126, Dako, Glostrup, Dinamarca)

Autostainer plus 48 (S3800, Dako)

Reactius

FOSB (5G4) Rabbit mAb (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts, EEUU)

Anticòs 2ari anti-rabbit (NA934, Amersham)

Labelled Polymer-HRP Dual Link Rabbit/Mouse (Ref. K5007, Dako)

Kit EnVision Flex + High (K8012, Dako)

- Conté:
- Solució High pH9 (solució de desparafinació, hidratació i recuperació antigènica)
 - Tampó de rentat
 - Peròxid d'hidrogen (H₂O₂)
 - Tetrahidroclorur de 3.3-Diaminobenzidina (DAB)
 - Hematoxilina de Mayer (S2020, Dako)

DePeX (18243, Serva)

Etanol absolut (UN1170, Merck)

Xilol (UN1307, Prolabo)

Procediment

1. Es realitza la desparafinació i el desemascament antigènic amb calor, durant 20 minuts a 97°C, utilitzant el contenidor Ptlinc (Dako) amb la solució de desparafinació, hidratació i recuperació antigènica a pH9 (High) diluïda (150 ml de la solució High diluïda amb 1350 ml d'aigua destil·lada).
2. Posteriorment es realitza la immunotinció en l'aparell automatitzat Autostainer plus 48 (Dako).
3. S'incuba l'anticòs primari específic (FOSB) durant 30 minuts a la dilució 1:25 per tal que es produeixi la unió amb l'antigen.
4. Rentar amb el tampó de rentat.
5. S'inhibeix la peroxidasa endògena amb peròxid d'hidrogen (H_2O_2), realitzant una incubació de 5 minuts.
6. Rentar amb el tampó de rentat
7. Seguidament es realitza la unió amb l'anticòs secundari, amb una incubació de 30 minuts, el qual es troba unit a la molècula de dextrà inert marcada amb l'enzim peroxidasa de rave (Sistema FLEX+ EnVision, Dako).
8. El revelat de la unió es realitza amb el substrat H_2O_2 i el cromògen tetrahydroclorur de 3.3-Diaminobenzidina (DAB), realitzant una incubació de 5 minuts.
9. S'utilitza l'hematoxilina de Mayer com a coloració de contrast, incubant 10 minuts.
10. Finalment es realitza una deshidratació de la mostra amb gradient creixent d'alcohols fins a xilol.
11. Es realitza un muntatge permanent de les preparacions amb DePeX.

En cada processament s'han afegit extensions de cèl·lules K562 estimulades amb TPA i un tall d'una biòpsia de càncer de mama com a control positiu.

3.2.2.2.2. Tècnica d'immunocitoquímica

Reactius

Metanol (UN1230, Prolabo)

Acetona (179124, Sigma-Adrich)

Procediment

És necessari fixar l'extensió una vegada es treu del congelador, durant 5 minuts en una solució de metanol/acetona. Posteriorment, es realitza la tècnica d'immunocitoquímica segons el protocol descrit en l'apartat 3.2.2.3 però sense realitzar el desemascament antigènic.

3.2.2.2.3. Tècnica de Western Blot

El Western Blot és una tècnica analítica semiquantitativa emprada per a detectar proteïnes específiques en una mostra determinada. Previ a la detecció immunològica, es realitza una extracció de les proteïnes de les cèl·lules o teixit d'estudi, realitzant una lisis cel·lular, una separació d'aquestes segons el seu pes molecular i la seva càrrega, mitjançant una electroforesi en gel SDS de poliacrilamida, i una transferència i immobilització a una membrana. Posteriorment les proteïnes d'interès es detecten utilitzant anticossos primaris específics i anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa per a la visualització.

Aquesta tècnica l'ha realitzat el Grup de Recerca de cèl·lules mare i càncer, del programa de Càncer de l'IMIM.

A. Lisi cel·lular i obtenció i desnaturalització de les proteïnes**Equipament**

Bioruptor standard (UCD-200, Diagenode)

Reactius i solucions

Buffer de lisi:

Conté inhibidors de proteases (com el PMSF) i inhibidors de fosfatases (com l'EDTA)

-Composició: Taula M12

| Reactiu | Volum (ml)/ 100ml |
|--|--------------------------|
| Tris pH 7,6 (10mM) | 1 d'1M |
| NaCl (140mM) | 2,8 de 5M |
| Nonidet P-40, NP40 1% | 1 (pur) |
| Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5mM | 1 de 0.5M |
| NaF 50mM | 10 de 0.5M |
| Ortovanadate Na 0,4mM | 0,4 de 0.1M |
| PMSF 1mM | 1 de 0.1M |
| Leupeptin 10µg/ml | 0,1 a 10mg/ml |
| Aprotin 10µg/ml | 0,1 a 10mg/ml |
| H ₂ O | Fins a 100 |
| Volum total | 100 |

Buffer de càrrega 6x:

-Composició: Taula M13

| Reactiu | Volum |
|--------------------------------|-----------|
| Blau bromofenol (0.5%) saturat | 1 |
| Ficoll 30% | 25 |
| H ₂ O | 24 |
| Volum total | 50 |

Procediment

Es parteix de la suspensió cel·lular en PBS 1x dels granulòcits o de les cèl·lules K562 en cultiu. Es fa el lisat de la cel·lularitat total.

1. Fer un recompte del nombre de cèl·lules totals.
2. Obtenir el paquet cel·lular centrifugant durant 5 minuts a 240g.
3. Incubar les cèl·lules amb el buffer de lisi, preparat segons la taula M12 (proporció de 200 µl buffer de lisi per cada 20×10^6 cèl·lules), durant 30 minuts a 4°C. Cal ressuspèndre periòdicament amb la pipeta.
4. Centrifugar a 15.900g durant 5-10 minuts a 4°C i recollir el sobrenadant, on s'hi troben les proteïnes solubles. En el botó cel·lular hi han les proteïnes insolubles.
5. Separar un volum de 10 µl per a realitzar la quantificació de proteïna, alíquota que es guarda directament a -20°C.
6. Afegir 100 µl de buffer de càrrega 6x, preparat segons la taula M13, a la resta de sobrenadant per a portar la solució a 1x.
7. Per a desnaturalitzar les proteïnes es bull la suspensió a 100°C durant 10 a 15 minuts.
8. Sonicar la suspensió proteica, en fred durant 10 minuts a una potència mitjana, per a eliminar possibles agregats de proteïnes.
8. Guardar la suspensió proteica a -20°C. La mostra ja està preparada per a realitzar l'electroforesi.

B. Quantificació de les proteïnes: mètode de Bradford

La quantificació de proteïnes es realitza utilitzant el mètode colorimètric de Bradford, que es basa en la unió del colorant Comassie Blue G-250 a les proteïnes. Quan el colorant s'uneix a les proteïnes canvia de color taronja a blau, ocasionant un canvi en el màxim d'absorció del colorant desde 465 a 595 nm (Bradford i cols. 1976).

Es realitza una dilució seriada de SAB que s'emprarà com a proteïna patró per a crear una corba patró que permetrà estimar la concentració de proteïnes de les mostres d'interès.

Equipament

Espectrofotòmetre de plaques: Multiskan ascent 96/384 plate reader (51118300, Thermo Electron Corporation)

Reactius i solucions

Sueroalbúmina bovina, SAB (A3294, Sigma-Aldrich)

Reactiu de Bradford (1-800-4, Bio-Rad)

Procediment

1. Realitzar una dilució seriada de SAB, partint de la dilució mare de concentració d'1mg/ml. Les dilucions de proteïna SAB són les següents: 0 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg i 16 µg. Mesclar el volum necessari de la dilució mare de BSA amb aigua destil·lada, fins a aconseguir un volum final de cada dilució d'1 ml.
2. Agafar l'aliquota de 2-5 µl de cada mostra, que prèviament s'havia separat per a la quantificació (veure apartat 2.2.2.3.A), i afegir 998-995 µl d'aigua destil·lada per arribar a un volum d'1 ml.
3. Carregar 200 µl de les dilucions seriades i les mostres en una placa de 96 pous per a espectrofotometria i afegir 50 µl del reactiu Bradford en cada pou. Evitar la formació de bombolles i sinó eliminar-les amb una agulla.

4. Es realitza la lectura en l'espectrofotòmetre (a 595nm) de les dilucions seriades i de les mostres, immediatament després de barrejar les mostres amb el reactiu. El programa de l'aparell crea la corba patró en base a les dilucions seriades de SAB i extrapola la concentració de les mostres. S'obté una taula amb les concentracions proteiques de les mostres d'estudi.

C. Electroforesi en gel d'acrilamida

Les proteïnes es separen segons el seu pes molecular i la seva càrrega mitjançant una electroforesi SDS-PAGE, en la que s'utilitza un gel de poliacrilamida i tampó amb dodecilsulfat (SDS). El tampó, junt amb el B-mercaptoetanol, ocasiona el trencament de les estructures secundàries i terciàries de les proteïnes i manté els polipèptids en estat desnaturalitzat, aconseguint que la separació de les proteïnes sigui en funció només del seu pes molecular. A la vegada l'SDS forma complexos amb les proteïnes i els confereix una càrrega negativa, que permetrà que totes les proteïnes migrin en el mateix sentit al aplicar la corrent elèctrica. La concentració del gel d'acrilamida s'escull en funció del pes molecular de les proteïnes que es volen estudiar. A més, per a millorar la resolució de les bandes de proteïnes s'utilitzen gels discontinus, en els que hi ha una capa de gel *stacking* (empaquetador) i una de gel de separació.

Equipament

Cubeta vertical Mini-ProteanR3 (Bio-Rad)

Reactius i solucions

Acrilamida/Solució bis 40% (Bio-Rad)

Gel de separació: pH 8,8

Dimensions gel: 1,5mm

-Composició: Taula M14

| Reactiu | Quantitat o Volum |
|-----------------------------|---|
| Aigua destil·lada | 4 ml |
| Acilamida 40% | Si 40% Acilamide/Bis solution 3,3 ml |
| 10% SDS | 100 µl |
| 10% Ammonium persulfate,APS | 100 µl |
| TEMED | 4 µl |
| I 1,5M Tris (pH8,8) | 2,5 ml |

Gel *stacking* 5% (pH 6,8):

-Composició: Taula M15

| Reactiu | Quantitat o Volum |
|-----------------------------|---|
| Aigua destil·lada | 4,6 ml |
| Acilamida 40% | Si 40% Acilamide/Bis solution 2,7 ml |
| 10% SDS | 100 µl |
| 10% Ammonium persulfate,APS | 100 µl |
| TEMED | 6 µl |
| I 1,5M Tris (pH8,8) | 2,5ml |

Marcador de proteïnes: *Precision Plus Protein Standards* (161-0373, Bio-Rad)

Tampó de càrrega 1x

Solució del marcador de proteïnes:

-Composició: Taula M16

| Reactiu | Volum (µl) |
|-----------------------|------------|
| Marcador de proteïnes | 5 |
| Tampó de càrrega 1x | 10 |
| Volum total | 15 |

Tampó d'electroforesi: *Running buffer* (10x):

-Composició: Taula M17

| Reactiu | Volum (μ l) |
|-----------|------------------|
| Tris base | 0,25M |
| Glycine | 1,92M |
| SDS | 1% |

Diluir el tampó a 1x (100ml de tampó 10x + 900ml d'aigua destil·lada)

Procediment

Preparació del gel d'acrilamida

1. Muntatge dels vidres i separadors.
2. Afegir la solució d'acrilamida al 10% (gel separació), preparada segons la taula M14,. Cobrir amb aigua destil·lada i esperar fins que el gel hagi polimeritzat.
3. Treure l'aigua i afegir la solució d'acrilamida al 5% (gel *stacking*), preparada segons la taula M15, i es col·loca la pinta a la part superior, evitant la formació de bombolles. Esperar fins que el gel hagi polimeritzat.
4. Posar muntatge del gel dins la cubeta d'electroforesi i omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi, preparat segons la taula M17.

Càrrega del gel

1. Càrrega en el primer pou de 15 μ l de marcador de pes molecular diluït en el buffer de càrrega, segons la taula M16.
2. Càrrega de les mostres als diferents pous (25 μ g i 5 μ g de la línia cel·lular K562 estimulada amb TPA i 75 μ g de les mostres), les quals ja contenen el tampó de càrrega.
3. En cas que quedin pous sense mostres carregar 10 μ l de buffer.

4. Col·locar la tapa de la cubeta d'electroforesi i endollar el sistema.
5. Aplicar una corrent elèctrica de 100V aproximadament durant 1h 30 minuts, fins que el dye del tampó de càrrega arribi al final del gel.

D. Transferència electroforètica semiseca

Una vegada les proteïnes es troben separades per pes molecular i càrrega en el gel d'acrilamida aquestes es transfereixen a una membrana de poliflorur de vinilidè (PVDF) per electrotransferència. S'utilitza el mètode *sandwich* en el que s'apila paper de filtre (o Whatmann) empapat de tampó de transferència, el gel d'acrilamida, la membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EEUU) i altre cop paper de filtre empapat de tampó de transferència, i s'aplica una corrent elèctrica. L'objectiu és desplaçar les proteïnes del gel, carregades negativament, cap al pol positiu de tal manera que queden atrapades a la membrana. La membrana és una rèplica del patró proteic del gel d'acrilamida.

Equipament

Trans-Blot Semi-Dry (170-3940, Bio-Rad)

Material, reactius i solucions

Membrana de PVDF (162-0177, Bio-Rad)

Paper Whatman (Z270857, Sigma)

Metanol (UN1230, Prolabo)

Solució de transferència semiseca, a pH9

-Composició:Taula M18

| Reactiu | Quantitat o Volum |
|--------------------|-------------------------|
| Trisbase | 29 g (48 mM) |
| Glicina | 14,5 g (39 mM) |
| SDS | 1,85 g (0,037% Vol/Vol) |
| Metanol | 1 litre (20%) |
| Aigua miliQ | fins a 5 litres |
| Volum total | 5 litres |

Solució de Ponceau (0,2%) (33427, Serva)

Procediment

Durant tot el procediment és important que la membrana no s'assequi.

1. Equilibrar el gel d'acrilamida amb la solució de transferència semiseca, preparada segons la taula M18, durant mínim 10 minuts.
2. Tractar la membrana de PVDF amb metanol durant 30 segons, aproximadament. Posteriorment, rentar-la amb aigua destil·lada i equilibrar-la amb la solució de transferència, durant mínim 10 minuts.
3. Transferir el gel d'acrilamida a la membrana utilitzant el mètode *sandwich*, segons l'esquema de la figura M14.

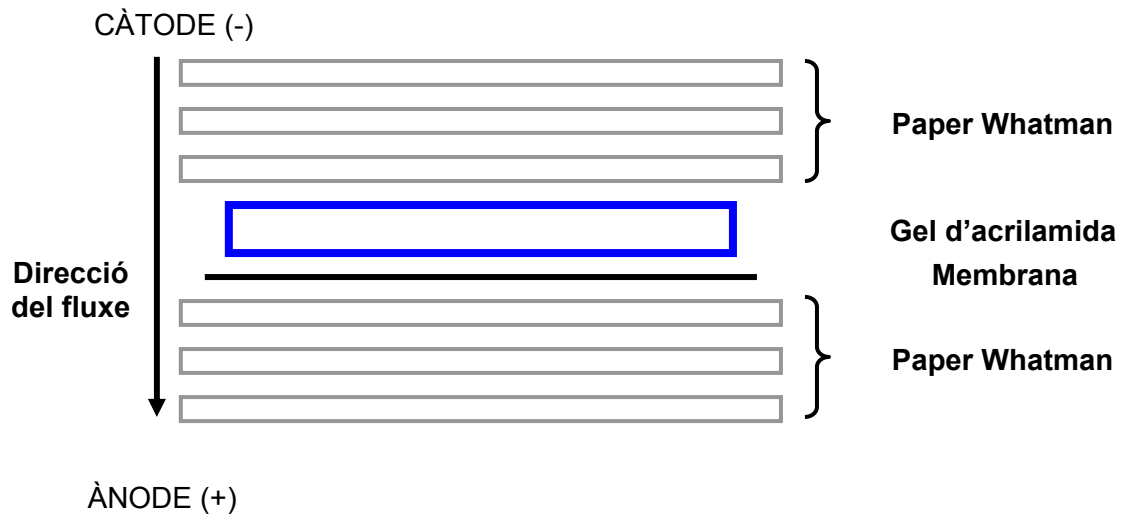


Figura M14. Esquema del mètode *sandwich* per a realitzar la transferència electroforètica de les proteïnes del gel d'acrilamida a la membrana

4. Treure les bombolles passant un rodet per sobre el muntatge.
5. Col·locar el *sandwich* en el transfer sec.
6. Transferir durant 1 hora a 12V.
7. Una vegada transferit, de forma opcional es pot tenyir la membrana amb Ponceau per tal de detectar l'efectivitat de la transferència.
8. Tinció de la membrana: Es submergeix la membrana en solució de Ponceau durant 5 minuts amb agitació suau. La tinció és reversible i s'ha d'eliminar amb aigua o amb solució de rentat, submergeint la membrana durant 15 minuts aproximadament, fins que quedi neta.

E. Bloqueig de la membrana i revelat

Per tal que l'anticòs es pugui unir específicament a les proteïnes de la membrana és necessari bloquejar els llocs d'unió que han quedat lliures. El bloqueig es realitza incubant la membrana amb una solució proteica, en el nostre cas llet en pols o caseïna. En el revelat s'utilitza l'anticòs primari, específic per a la proteïna que volem detectar, i l'anticòs secundari, conjugat a un marcador quimioluminiscent per tal de ser revelat en una pel·lícula fotogràfica. El mètode utilitzat és el sistema de detecció

Enhanced Chemiluminescence (ECL), en el qual es conjuga l'anticòs secundari amb la peroxidasa de rave (HRP) i el substrat luminol quimioluminiscent. En la presència de peròxid d'hidrogen, l'HRP catalitza el luminol i aquest emet luminiscència. L'emissió de llum és màxima immediatament després de l'exposició del substrat a l'HRP i es manté durant 30 minuts. La llum es capta en els films autoradiogràfics.

Material, reactius i solucions

Cassettes autoradiografia (Kodak)

Films autoradiogràfics 18x24 (06SHRG-H1824B, Fujifilm)

Anticòsos primaris:

-FOSB, *Rabbit* mAb (5G4, Cell Signaling Technology)

-ERK (p44/42 MAPK (ERK1/2), *Rabbit* mAb (9102, Cell Signaling Technology)

-PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*), *Mouse* mAb (SC-56, Santa Cruz Biotechnology)

- α -Actina, *Rabbit* mAb (A2172, Sigma-aldrich)

- α -Tubulina, *Mouse* mAb (T9026, Sigma-aldrich)

Anticòs secundari: (*rabbit* o *mouse*, DAKO)

Reactius de detecció ECL (RPN2106, Amersham)

Solució de bloqueig

Solució de rentat amb 5% de llet en pols (que no contingui cap suplement)

Solució de rentat (Tris-Buffered Saline Tween (TBS) 5‰ Tween en TBS 1x)

Procediment

1. Bloquejar la membrana de PVDF amb la solució de bloqueig, durant mínim 1 hora a TA, en agitació.
2. Rentar la membrana amb la solució de rentat TBST per a eliminar l'excés de solució de bloqueig.

3. Incubar la membrana amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig *overnight* a 4°C, sempre en agitació. Les dilucions dels anticossos utilitzats són les següents:

- FOSB: 1/1000
- ERK: 1/1000
- PCNA: 1/1000
- α -Actina: 1/1000
- α -Tubulina 1/1000

4. Rentar la membrana en agitació a TA durant 30 minuts en la solució de rentat, realitzant mínim 5 canvis successius de la solució.

5. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari, en aquest estudi el α -*rabbit* o α -*goat* conjugat amb peroxidasa, diluït a 1/2000 en la solució de bloqueig durant 1 hora a TA.

6. Rentar la membrana de la mateixa manera que amb l'anticòs primari.

7. Preparar la solució d'ECL segons les recomanacions del fabricant.

8. Col·locar la membrana en una caixa i incubar-la amb 1ml del reactiu de detecció ECL durant 60 segons a TA.

9. Assecar la membrana amb paper.

10. Revelar la membrana en una pel·lícula fotogràfica realitzant diferents exposicions als raigs X, als 5, 10, 20 i 40 segons, en la càmera fosca.

11. S'obtenen unes bandes fosques que corresponen a la proteïna d'interès. El pes molecular de la proteïna es pot estimar per comparació de la distància de migració de les seves bandes amb les del marcador de pes molecular.

12. En el cas en el que s'obté poca senyal s'utilitza el reactiu ECL Advance.

4. RESULTATS

La secció de resultats s'estructura en dos apartats (apartat 4.1 i 4.2). En l'apartat 4.1 s'exposen els resultats del treball publicat en la revista *Leukemia* l'any 2008 (Puigdecanet i cols. 2008), el qual es troba en l'apartat d'annex de la tesi.

En la taula R1 es resumeixen les tècniques i les plataformes utilitzades, les seves característiques i els pacients analitzats en cadascuna d'elles.

Taula R1. Llistat de les tècniques i les plataformes utilitzades, les seves característiques i els pacients analitzats en cadascuna d'elles.

| Tècnica | Plataforma | Nº gens | Característiques | Pacients estudiats | Apartat Resultats |
|--------------------------------|---|---------|---|--|--|
| Microarrays d'expressió | <i>44K Whole Human Genome oligonucleotide microarray</i> (Agilent Technologies) | 41.000 | Anàlisi global del transcriptoma | 20 TE <i>Pool controls</i> | Apartat 4.1 |
| RQ-PCR | TLDA 1 | 96 | -81/124 dels gens més sobreexpressats i 9/14 dels més infraexpressats entre TE i controls -Gens associats a NMP: <i>CD44</i> , <i>NFE2</i> i <i>ANKRD15</i> -Controls endogens: <i>18S rRNA</i> , <i>GAPDH</i> i <i>GUSB</i> | 57 TE 6 TR 10 PV <i>Pool controls</i> | Apartat 4.1: 40 TE Apartat 4.2: 17 TE 6 TR i 10 PV |
| | TLDA 2 | 48 | -40 gens diferencialment expressats entre <i>JAK2V617F</i> -positius vs. <i>JAK2V617F</i> -negatius -Altres gens implicats en la via JAK-STAT: <i>SOCS1</i> , <i>SOCS3</i> , <i>CCND1</i> i <i>BCL2L1</i> -Controls endogens: <i>18S rRNA</i> , <i>GAPDH</i> , <i>GUSB</i> i <i>HPRT1</i> | 38 TE <i>Pool controls</i> | Apartat 4.1 |
| | TLDA 3 | 96 | -62 gens diferencialment expressats en TE vs. Controls (TLDA 1) -30 gens diferencialment expressats entre TE <i>JAK2V617F</i> -positius i negatius (TLDA 2) -Controls endogens: <i>18S rRNA</i> , <i>GAPDH</i> , <i>GUSB</i> i <i>HPRT1</i> | 31 PV <i>Pool controls</i> | Apartat 4.2 |

4.1. PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I SIGNIFICAT BIOLÒGIC

Pacients

Es van incloure 40 casos (28 dones i 12 homes) amb una mitjana d'edat de 54 anys (de 31 fins a 85 anys), diagnosticats de TE segons els criteris de l'OMS (2001) (Jaffe i cols. 2001). Cap dels pacients inclosos en l'estudi havia rebut tractament citorreductor. Al moment del diagnòstic quatre pacients havien presentat un episodi de trombosi i tres pacients episodis d'hemorràgia. Vint-i-quatre dels 40 pacients presentaven un cariotip normal i en els 16 pacients restants no es van obtenir metafases. Entre els 40 pacients, 32 presentaven almenys un dels següents marcadors de clonalitat: *JAK2V617F*, clonalitat detectada per l'assaig del gen *HUMARA* i creixement endogen de progenitors mieloides. La mutació *JAK2V617F* es va detectar en el 52,5% (21/40) dels pacients, sempre en estat heterozigot. El percentatge d'al·lels mutats era del 28,3% de mitjana, amb un valor mínim del 7,8% i un màxim del 40,7%. Entre les 28 dones, 17 eren informatives per l'assaig de clonalitat del gen *HUMARA*, i d'aquestes 7 eren clonals. Dels 40 pacients estudiats, 26 presentaven creixement endogen de colònies eritrocítiques (eBFU-E) i/o de colònies megacariocítiques (eCFU-MK). Dels 19 pacients *JAK2V617F*-negatius, 11 mostraven clonalitat i/o creixement endogen de progenitors mieloides. En conseqüència, només vuit pacients no presentaven cap marcador de clonalitat. En la taula R2 es mostra els resultats de l'anàlisi de l'associació entre la presència o absència de *JAK2V617F* i les dades clínico-biològiques dels 40 pacients.

En l'estudi també es van incloure 10 controls corresponents a individus sans (5 dones i 5 homes), d'edat entre 25 a 85 anys i amb un recompte hematològic dins els valors de normalitat.

El treball es va aprovar pel comitè ètic local i es va obtenir un consentiment informat de tots els pacients, d'acord amb la Declaració de Helsinki.

Taula R2. Dades clínico-biològiques al diagnòstic dels 40 pacients amb TE en relació amb l'estat de *JAK2V617F*.

| | <i>JAK2V617F</i>-positiu (n=21) | <i>JAK2V617F</i>-negatiu (n=19) | P-valor |
|--|--|--|---------|
| Edat* | 52 (31-76) | 55 (35-85) | NS |
| Sexe | 15D/6H | 13D/6H | NS |
| Plaquetes, x10 ⁹ /L° | 719,29 (+/-235,69) | 832,61 (+/-243,08) | NS |
| Leucòcits, x10 ⁹ /L° | 9,12 (+/-2,57) | 7,97 (+/-1,33) | P=0,097 |
| Hemoglobina, g/dL° | 14,6 (+/-1.4) | 13,5 (+/-1,6) | NS |
| LDH augmentada (>450) | 3/20 | 5/19 | NS |
| Índex FAG° | 86,17 (+/-30,99) | 55,64 (+/-16,28) | P=0,002 |
| Esplenomegàlia | 1/21 | 1/19 | NS |
| Episodis trombòtics | 2/21 | 2/19 | NS |
| Episodis hemorràgics | 0/21 | 3/19 | NS |
| Factors de risc cardiovascular | 10/21 | 8/19 | NS |
| % al·lels <i>JAK2V617F</i> * | 28,3% (7,8-40,7%) | - | NA |
| Clonalitat <i>HUMARA</i> | 2/7 | 5/10 | NS |
| Creixement endogen mieloide (eBFU-E i/o eCFU-MK) | 18/21 | 8/18 | P=0,015 |
| eBFU-E | 17/21 | 1/18 | P<0,001 |
| eCFU-MK | 15/21 | 8/18 | P=0,112 |
| <i>PRV-1</i> augmentat (>15) | 10/20 | 1/19 | P=0,003 |

*: es mostra la mediana (rang), °: es mostra la mitjana (\pm DS).

Abreviatures: D:dona; H:Home; FAG: fosfatasa alcalina granulocítica; NS: no estadísticament significatiu; NA:no aplicable.

Mètodes

En aquest estudi es va utilitzar mostra de granulòcits de SP dels 40 pacients amb TE i dels 10 controls, obtinguda i processada segons l'apartat 3.2.1.1 i 3.2.1.2 Es va extreure l'ARN dels granulòcits (apartat 3.2.1.3) i es va valorar la seva puresa i integritat (apartat 3.2.1.4).

Es van utilitzar dues tecnologies per a l'estudi d'expressió gènica: microarrays d'expressió, utilitzant el microarray *44K Whole Human Genome oligonucleotide* d'Agilent (apartat 3.2.1.5), i RQ-PCR, utilitzant la plataforma TLDA 1 i 2 (apartat 3.2.1.6). Mitjançant els microarrays d'expressió es van estudiar 20 pacients amb TE (9 *JAK2V617F*-positius i 11 *JAK2V617F*-negatius), junt amb els 10 controls. En cada experiment de microarrays l'ARN d'un sol pacient es va hibridar amb un *pool* d'ARN control procedent dels 10 controls. Posteriorment, es van validar els resultats d'expressió gènica d'un grup seleccionat de gens diferencialment expressats en els microarrays utilitzant la tecnologia de les TLDA. La validació amb la tècnica TLDA es va realitzar en el mateix grup de 20 pacients i els 10 controls i en una sèrie independent de 20 pacients amb TE (11 *JAK2V617F*-positius i 9 *JAK2V617F*-negatius) (veure la taula R1 on es resumeixen les plataformes utilitzades, les seves característiques i els pacients analitzats en cadascuna d'elles). En la figura R1 es mostra un esquema del disseny de l'estudi. Es detallen les diferents tècniques utilitzades així com els resultats més rellevants obtinguts en cada anàlisi. En general, tant amb les dades de microarrays d'expressió com de les TLDA es van realitzar dos tipus d'anàlisi: la cerca de gens diferencialment expressats entre les TE i el *pool* de controls i els gens diferencials expressats entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius.

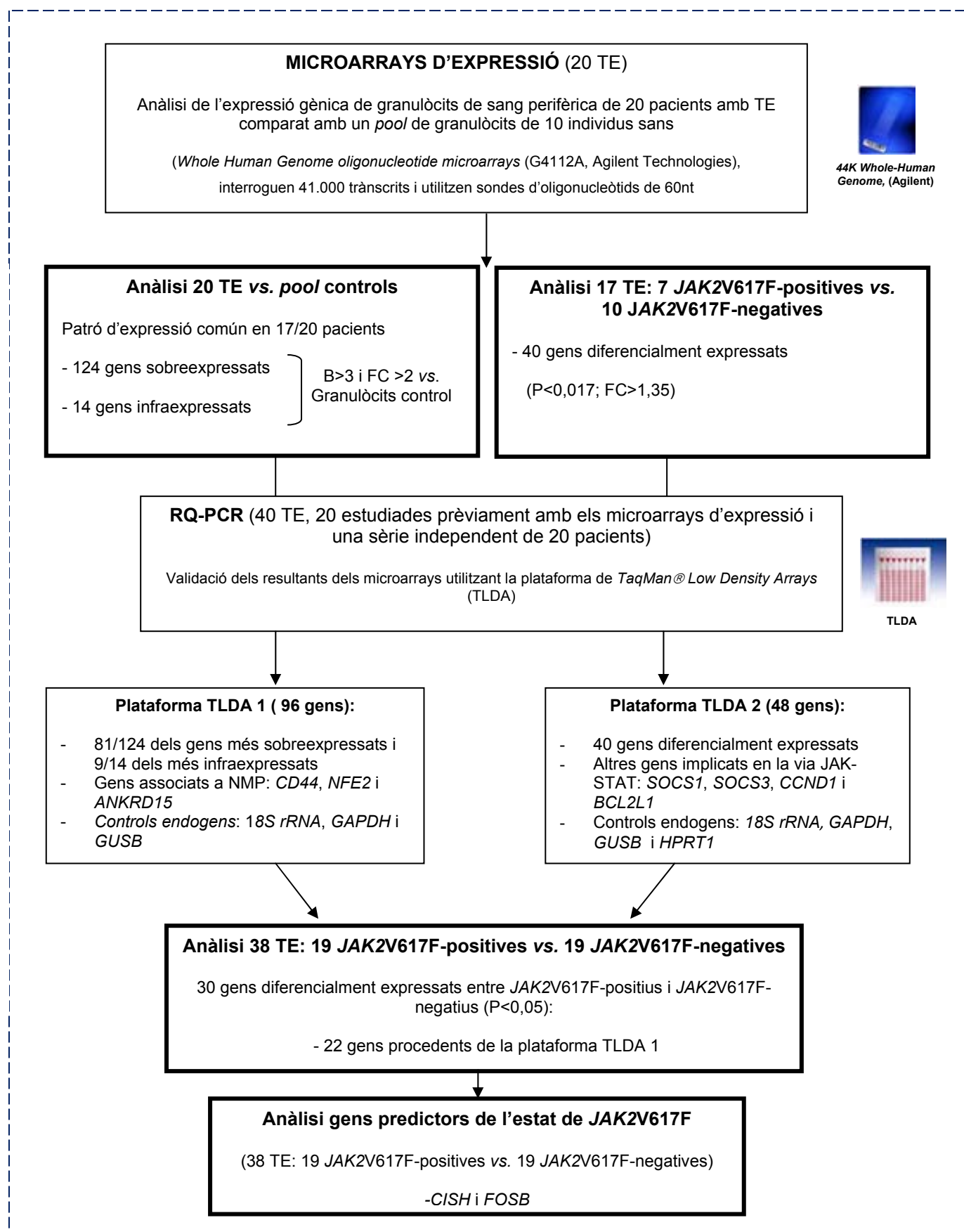


Figura R1. Esquema del disseny de l'estudi. Es ressalten els requadres que corresponen a les anàlisis realitzades i els resultats obtinguts.

4.1.1. Patrons d'expressió gènica

4.1.1.1. Anàlisi d'agrupació de les dades

Com a anàlisi inicial de les dades d'expressió obtingudes dels microarrays d'expressió de les 20 TE en relació amb els 10 controls es va aplicar un algorisme d'agrupament (*clustering*) no supervisat per tal de conèixer l'agrupació de les dades dels diferents pacients entre sí. Es va utilitzar un *clustering* jeràrquic (elaborat utilitzant la distància euclídea i el mètode de la mitjana) a partir de les mitjanes dels valors d'intensitat del microarray amb marcatge directe i *dye swap* de cada pacient. El *cluster* va mostrar un patró d'expressió semblant en 17 dels 20 pacients estudiats (TE 1-17) Els tres pacients restants (TE 18-20) presentaven un comportament diferent i independent entre sí, i es van considerar *outliers* (Figura R2). L'existència d'aquests 3 *outliers* es va confirmar per una anàlisi de components principals (PCA) i una anàlisi segons el mètode inclòs en el programa informàtic FADA (resultats no mostrats) (Lozano i cols. 2005). El comportament diferencial d'aquests tres pacients no es podia justificar per cap variable clínic-biològica.

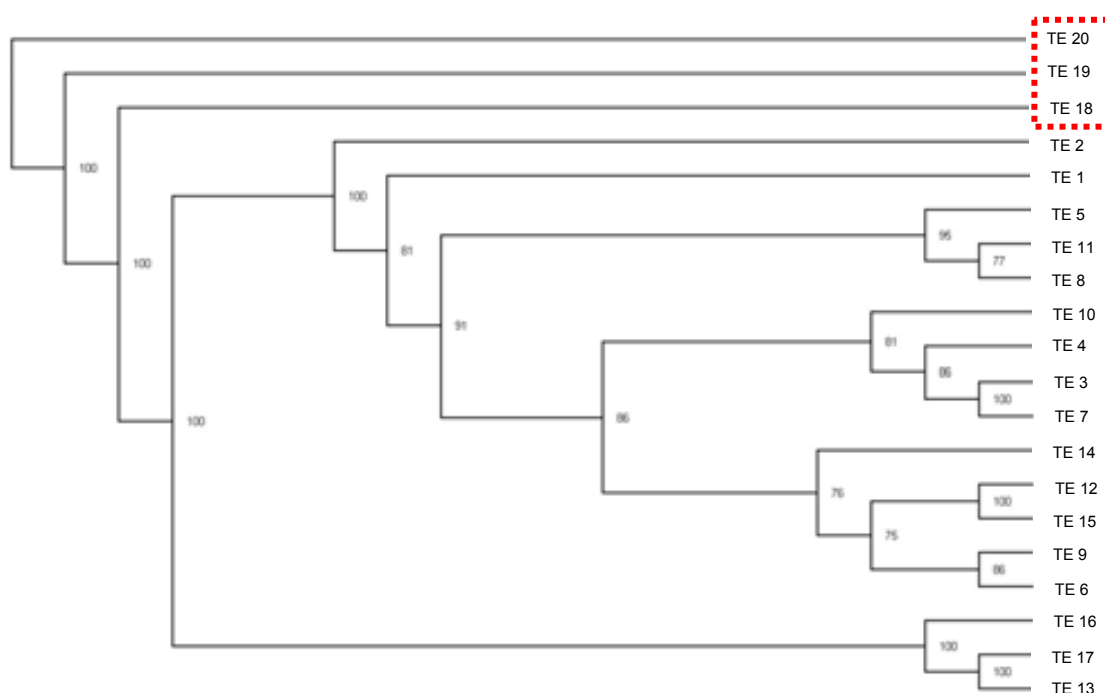


Figura R2. Dendrograma del *clustering* jeràrquic no supervisat de les dades dels 20 pacients amb. El valor de cada branca del dendrograma indica la robustesa de la separació. Els tres pacients amb un comportament independent estan emmarcats en vermell.

4.1.1.2. Anàlisi dels gens diferencialment expressats entre les 20 TE i el *pool* de controls i anàlisi funcional

Posteriorment, es va realitzar l'anàlisi de l'expressió de gens diferencials entre els pacients amb TE i els controls, exclouent els tres pacients amb comportament diferencial. Es va considerar que un gen es trobava diferencialment expressat quan el valor B era superior a 3 i el valor de FC era superior a 2, respecte als granulòcits control. Basant-nos en aquests criteris es va obtenir la signatura d'expressió característica dels 17 pacients, formada per 124 gens sobreexpressats i 14 gens infraexpressats amb anotació funcional coneguda (Figura R1). Entre ells trobem molts gens relacionats amb la resposta immunològica, entre els que destaquem la sobreexpressió del *TNF* i la *IL-1*, els quals són els iniciadors principals de la resposta immunològica i inflamatòria. Altres gens sobreexpressats i relacionats també amb el desenvolupament i la funció hematopoètica són gens que intervenen directament en la

quimiotaxi dels neutròfils (*CXCL2*, *PPBP*, *CCL4*, *CCL3*, *CCL20* i *CCL23*), en l'adhesió dels neutròfils (*ICAM1*), gens que actuen com a mediadors del complement i la coagulació (*PLAU* i *PLAUR*) i gens com *OSM*, *PTGS2*, *ETS2*, *CD83* i *EDN1* que exerceixen altres funcions rellevants. En la taula R3 es llisten els gens més diferencialment sobreexpressats i infraexpressats.

Taula R3. Classificació funcional, segons el programa FATIGO+, dels gens més diferencialment sobreexpressats i infraexpressats en els granulòcits de sang perifèrica de pacients amb TE comparat amb els granulòcits d'individus sans

| CATEGORIA FUNCIONAL GO | Nº accés GenBank | SÍMBOL | DESCRIPCIÓ GEN | FC |
|--------------------------------------|------------------|--------|---|-----|
| Gens sobreexpressats en la TE | | | | |
| Activitat citocines | | | | |
| | NM_002089 | CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | 9,2 |
| | NM_004591 | CCL20 | chemokine (C-C motif) ligand 20 | 5,5 |
| | NM_002984 | CCL4 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | 4,4 |
| | NM_004591 | CCL3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | 3,9 |
| | NM_005064 | CCL23 | chemokine (C-C motif) ligand 23 | 3,4 |
| | NM_173841 | IL1RN | interleukin 1 receptor antagonist | 6,7 |
| | NM_000575 | IL1A | interleukin 1, alpha | 3,7 |
| | NM_016584 | IL23A | interleukin 23, alpha subunit p19 | 2,6 |
| | NM_002704 | PPBP | pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7) | 2,4 |
| Resposta immunològica | | | | |
| | NM_001955 | EDN1 | Homo sapiens endothelin 1 | 7,5 |
| | NM_004233 | CD83 | CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily) | 7,1 |
| | NM_000963 | COX2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | 6,2 |
| | NM_002852 | PTX3 | pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta | 4,4 |
| | NM_000594 | TNF | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | 4 |
| | NM_020530 | OSM | oncostatin M | 3 |
| Coagulació | | | | |
| | NM_002658 | PLAU | plasminogen activator, urokinase | 5,1 |
| | NM_002659 | PLAUR | plasminogen activator, urokinase receptor | 2,7 |
| Adhesió cel·lular | | | | |
| | | ICAM1 | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | 4,1 |
| Activitat factor de transcripció | | | | |

| | | | | |
|--|-----------|---------|---|------|
| | NM_005655 | KLF10 | Kruppel-like factor 10 | 4,5 |
| | NM_006732 | FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | 3,7 |
| | AL050388 | SOD2 | superoxide dismutase 2, mitochondrial | 3,6 |
| | NM_006186 | NR4A2 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 | 2,7 |
| | NM_001432 | EREG | epiregulin | 2,7 |
| | NM_005080 | XBP1 | X-box binding protein 1 | 2,7 |
| | NM_005239 | ETS2 | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) | 2,6 |
| Antiapoptosi | | | | |
| | NM_006290 | TNFAIP3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | 6,7 |
| | NM_031419 | NFKBIZ | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta | 5 |
| | NM_004556 | NFKBIE | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon | 4,3 |
| | NM_003897 | IER3 | immediate early response 3 | 3,8 |
| Gens infraexpressats en la TE | | | | |
| Resposta immunològica | | | | |
| | NM_000715 | C4BPA | complement component 4 binding protein, alpha | -4,1 |
| | NM_172369 | C1QG | complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide | -2,1 |
| Activitat factor de transcripció | | | | |
| | NM_006526 | ZNF217 | zinc finger protein 217 | -2,9 |
| | NM_003107 | SOX4 | SRY (sex determining region Y)-box 4 | -2,2 |
| | BC011939 | SOLH | small optic lobes homolog (Drosophila) | -2 |
| Regulació dels receptors acoplats a la proteïn G i les cascades de senyalització | | | | |
| | NM_020801 | ARRDC3 | arrestin domain containing 3 | -3,6 |
| Localització cel·lular i transport intracel·lular | | | | |
| | AL833820 | AP3M1 | adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit | -2,4 |
| Processament ARN | | | | |
| | NM_018380 | DDX28 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 | -2,9 |

Per a realitzar una anàlisi funcional més exhaustiva de la signatura gènica de la TE es va utilitzar el programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). Per a l'anàlisi es van incloure tots aquells gens diferencialment expressats amb un valor de B superior a 3 però sense filtrar pel valor de FC, per tal de disposar d'un conjunt més gran de gens en el que l'anàlisi funcional té més sentit. El nombre total de gens va ser de 895, entre els que s'hi trobaven els 124 gens sobreexpressats i els 14 infraexpressats descrits anteriorment. El programa IPA va identificar 578 dels 895 gens.

Es van identificar diferents funcions biològiques alterades en aquest grup de pacients, entre les que destaquem:

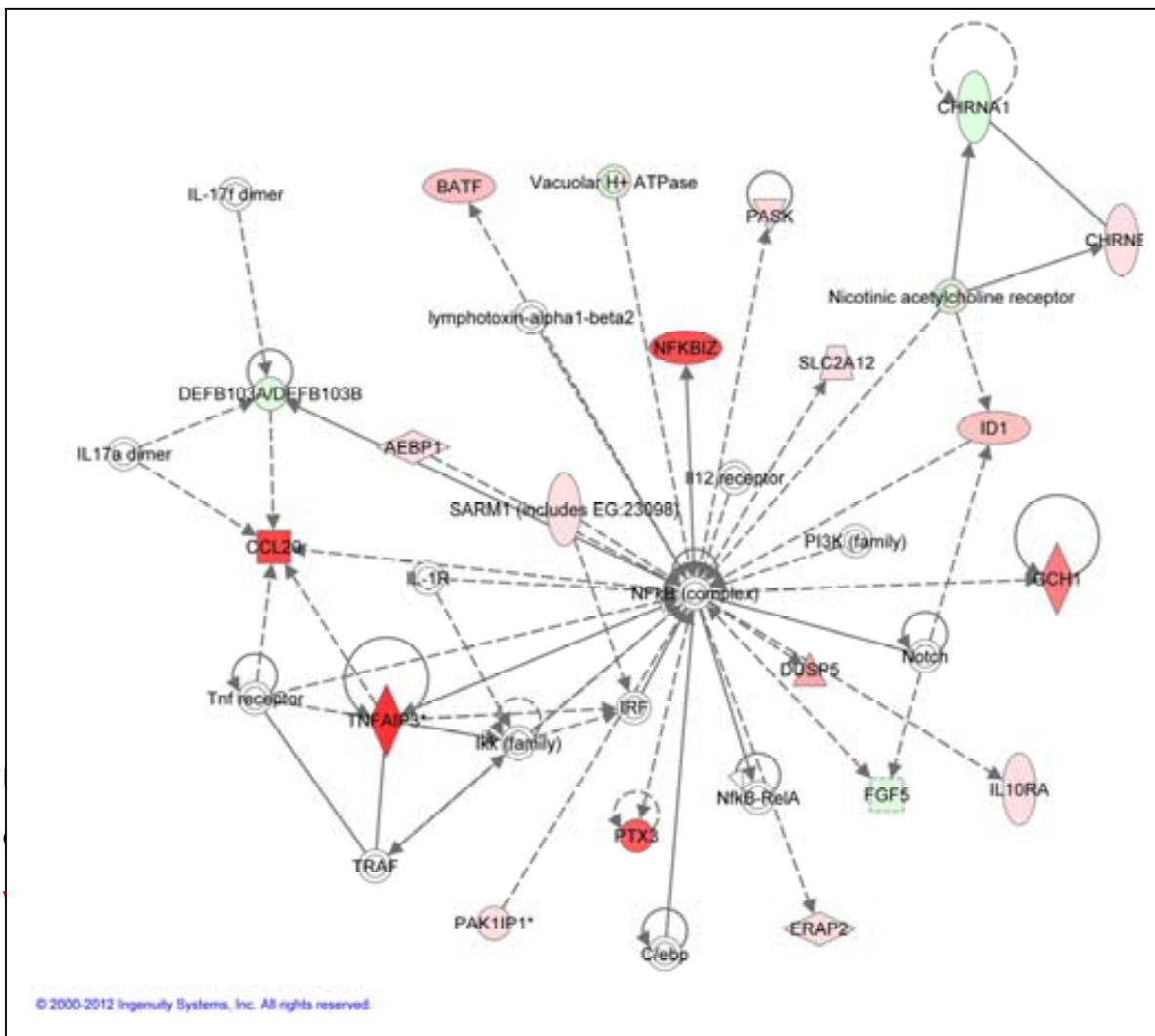
- **Resposta inflamatòria:** 97 gens, amb un valor de $P < 0,003$
- **Desenvolupament i funció del sistema hematopoètic:** 56 gens, amb un valor de $P < 0,003$
- **Càncer:** 161 gens, amb un valor de $P < 0,003$
- **Creixement cel·lular i proliferació:** 130 gens amb un valor de $P < 0,003$
- **Senyalització i interacció cèl·lula a cèl·lula:** 63 gens amb un valor de $P < 0,003$

Identificació de xarxes gèniques amb expressió alterada en la trombocitèmia essencial

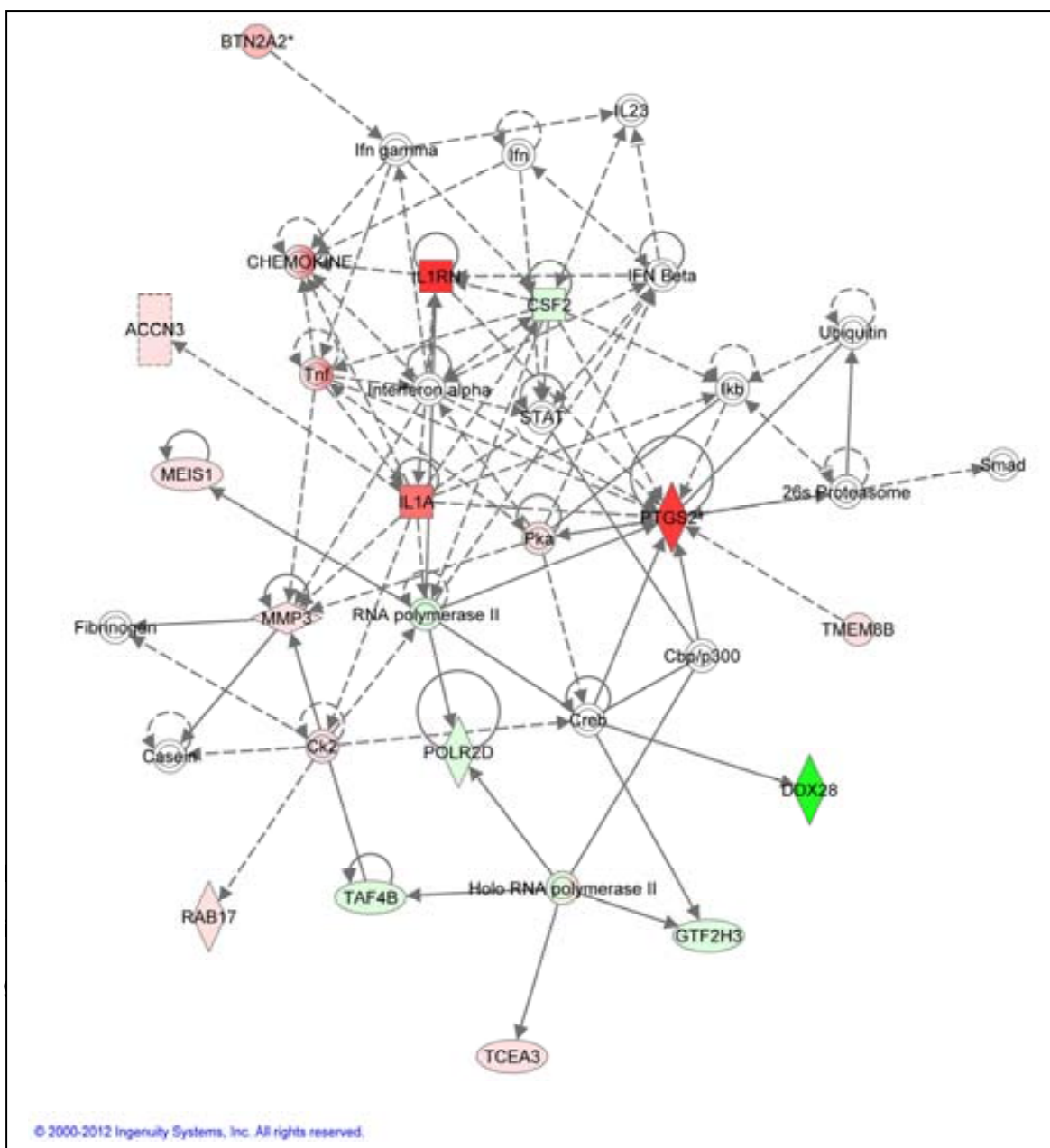
També es van cercar vies de senyalització comunes d'aquests gens i es van identificar diferents xarxes gèniques, la majoria d'elles relacionades entre sí i constituïdes per gens implicats en la resposta inflamatòria junt amb el desenvolupament i funció del sistema hematopoètic, la interacció cèl·lula a cèl·lula i el creixement cel·lular. Les funcions associades a les xarxes gèniques més rellevants són les següents:

- **Interacció cèl·lula a cèl·lula i funció hematopoètica:** trobem dues xarxes gèniques relacionades amb aquestes funcions:
 - Xarxa genètica constituïda per 22 gens amb expressió alterada i en la que el FT *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NFkB)* és el nucli de la via (Figura R3).
 - Xarxa genètica en la que hi trobem 21 gens amb expressió alterada com la *IL1A* i el *PTGS2* (Figura R4).
- **Càncer i moviment cel·lular:** xarxa genètica constituïda per 25 gens amb expressió alterada (Figura R5).
- **Regulació del cicle cel·lular, creixement i proliferació:** en la que hi trobem 24 gens amb expressió alterada (Figura R6).

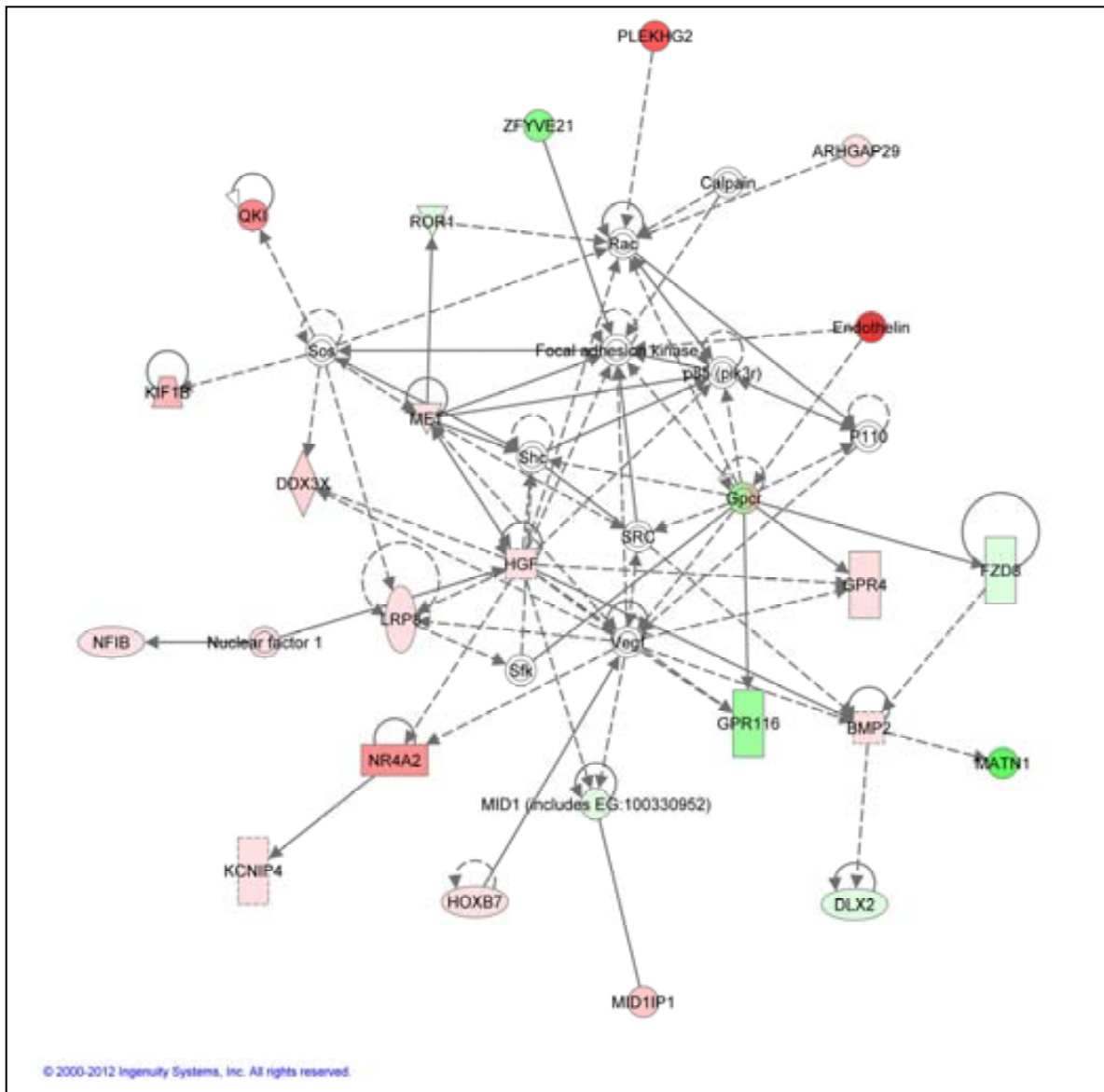
Interacció cèl·lula a cèl·lula i funció hematopoètica



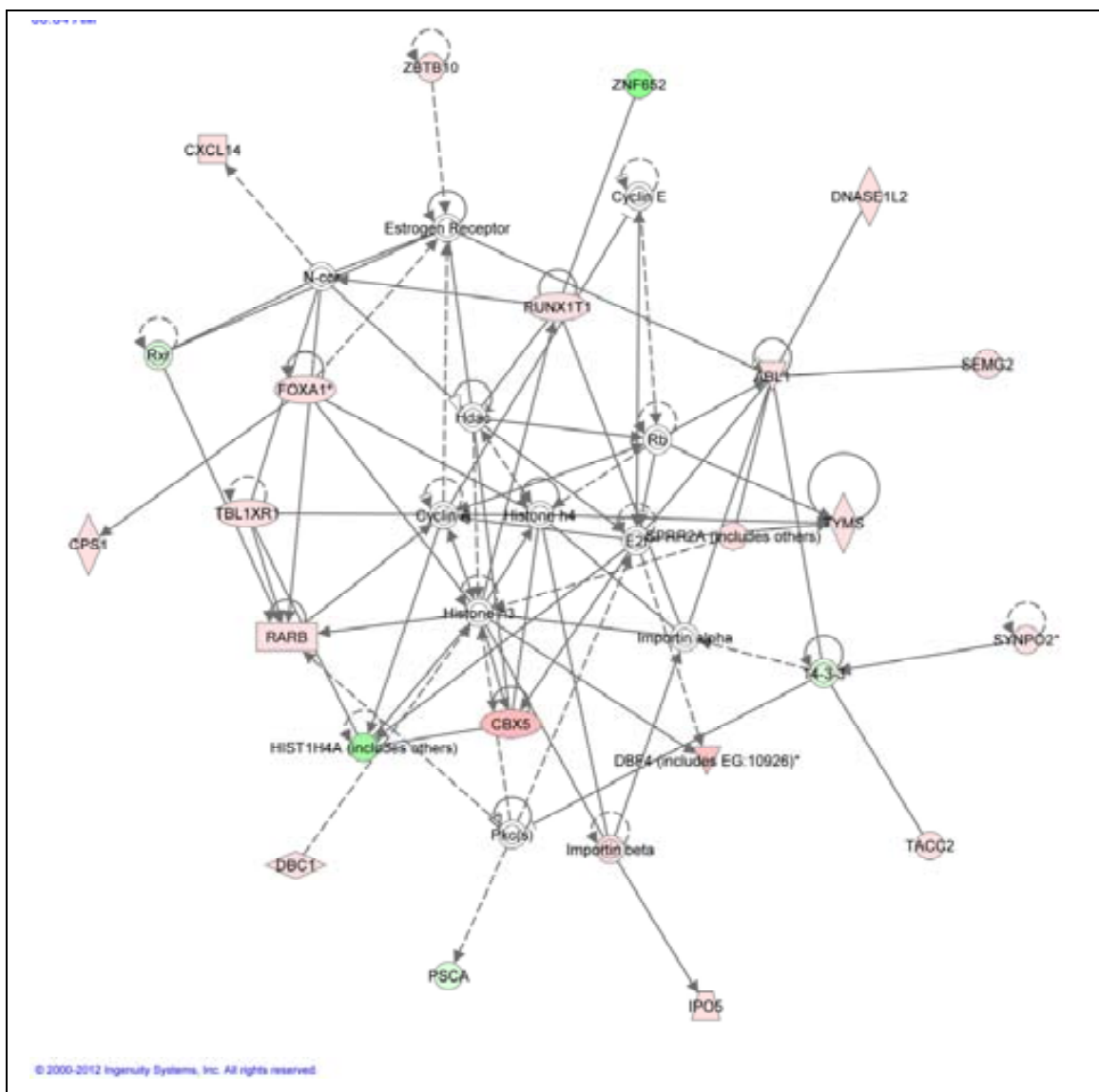
Interacció cèl·lula a cèl·lula i funció hematopoètica



Càncer i moviment cel·lular



Regulació del cicle cel·lular, creixement i proliferació



Identificació de factors de transcripció implicats en la trombocitèmia essencial

Utilitzant el programa IPA també es va indentificar un grup de 143 FT els gens diana dels quals estaven alterats en aquest grup de pacients. Entre ells destaquen l'activació del complex *NFkB* ($P < 0,0002$, *regulation z-score* 2,114) i del FT *RELA* ($P < 0,0006$, *regulation z-score* 2,236), el qual també forma part del complex *NFkB* (Figura R7).

El complex *NFkB* està regulat per, entre altres gens, el *TNF* i la *IL1A*, i interactuen per a exercir funcions antiapoptòtiques, d'activació cel·lular, creixement de colònies i de proliferació, entre d'altres. Actuen regulant diferents gens diana els quals s'ha detectat una sobreexpressió en el nostre treball, com el *CXCL2*, *ICAM* i *SOD2*.

Entre els altres FT identificats destaquem l'*NFE2L2* ($P < 0,003$, *regulation z-score* 1,053) i l'*ETS1* ($P < 0,007$, *regulation z-score* 0,564) i el *GATA3* ($P < 0,04$, *regulation z-score* 0,738), per la seva relació amb l'hematopoesi i per haver estat descrits en NMP en estudis previs d'expressió (Goertler i cols. 2005; Jones i cols. 2005; Gluglielmelli i cols. 2007; Irino i cols. 2011)

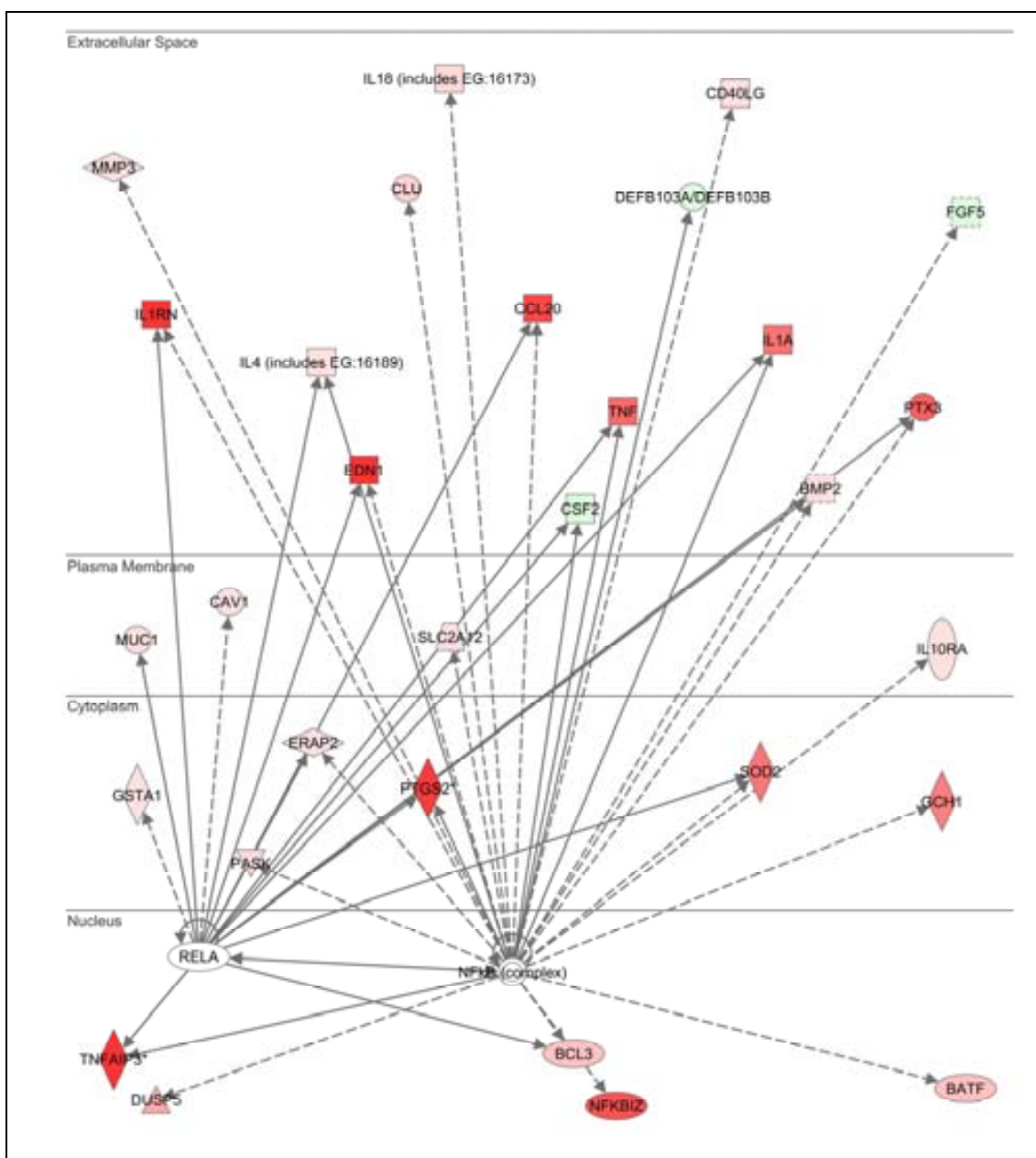


Figura R7. Esquema dels gens regulats pels factors de transcripció *RELA* i *NFkB* i els respectius valors d'expressió segons el color i la intensitat (**verd** significa infraexpressió i **vermell** sobreexpressió).

4.1.1.3. Validació dels resultats dels microarrays d'expressió

Amb l'objectiu de validar els resultats obtinguts amb els microarrays d'expressió es va seleccionar un grup de 96 gens que incloïa 81 dels 124 gens sobreexpressats i 9 dels 14 gens infraexpressats amb anotació funcional (contenia tots els gens referits anteriorment), junt amb 3 gens (*CD44*, *NFE2* i *ANKRD15*) descrits prèviament per altres autors (Pellagati i cols. 2003; Goerttler i cols. 2005b; Kralovics i cols. 2005c) com associats amb les NMP. Els gens 18S *rRNA*, *GAPDH* i *GUSB* es van utilitzar com a controls endògens. En la taula M8 (pàgina 104) es llisten els 96 assaigs escollits. Aquest grup de 96 gens es va validar mitjançant RQ-PCR, utilitzant la plataforma TLDA de 96 gens anomenada **plataforma TLDA 1**, en el mateix grup de 20 pacients amb TE (identificats com a pacients 1-20) estudiats prèviament pels microarrays d'expressió. En la figura R1 (pàgina 145) es mostra un esquema del disseny de l'estudi.

La concordança entre els resultats dels microarrays d'expressió i de RQ-PCR (plataforma TLDA1), calculada utilitzant el test de la correlació d'Spearman, va ser elevada en la majoria dels gens estudiats, amb una mitjana de coeficient de correlació en les 17 mostres de 0,76 (desviació estàndar, DS=0,06). Posteriorment, es va estudiar 20 una sèrie independent de pacients amb TE (identificats com a pacients 21-40) i utilitzant la mateixa plataforma TLDA 1. Es van eliminar de l'estudi aquells assaigs els quals no amplificaven correctament en cap dels pacients (corresponents als sis gens següents: *C1QC*, *CNGB1*, *HLA-G*, *LIMS1*, *MT1M* i *PHACTR1*), quedant un total de 90 gens analitzats els quals, considerant que tres eren controls endògens, el grup final de gens estudiats era de 87. També es van excloure puntualment els resultats d'aquells assaigs en els que la desviació estàndar dels duplicats era >0,2. Les dades d'expressió dels 87 gens de les 40 TE es van analitzar conjuntament.

Anàlisi d'agrupació de les dades dels 87 gens estudiats en les 40 TE mitjançant la plataforma TLDA1 i anàlisi dels gens amb expressió diferencial entre els subgrups de pacients

Es va realitzar una anàlisi d'agrupació de les dades d'expressió dels 87 gens, aplicant un *cluster* jeràrquic en el que s'utilitzava la distància euclídea i el mètode del màxim. El *cluster* va mostrar una classificació en dos grups principals de pacients (Figura R8). El primer grup (grup A) constava de 18 pacients i presentava el patró d'expressió observat en els resultats dels microarrays d'expressió (el qual es caracteritzava per 81 gens sobreexpressats i 9 gens infraexpressats, en relació als granulòcits control). Aquest grup incloïa 15 dels 20 pacients estudiats per microarrays d'expressió (TE 1-15). L'altre grup de pacients (grup B) incloïa 22 pacients, en el qual a la vegada s'observaven dos subgrups: un d'ells (B.1) estava compost per 9 pacients i l'altre grup (B.2) per 13 pacients. En aquest grup B hi trobem els tres pacients categoritzats com a *outliers* en les dades dels microarrays d'expressió (TE 18-20). Amb el test d'ANOVA d'un factor es va a estudiar l'expressió diferencial entre els diferents clusters de pacients (grups A, B.1 i B.2.) i es va observar una disminució progressiva dels nivells d'expressió de diferents gens al llarg dels 3 clusters respectius. De tots els gens els que presentaven un valor de ratio $F > 33$ eren: *ARL8*, *CCL3*, *CCL4*, *CD83*, *CXCL2*, *DUSP2*, *EDN1*, *ICAM1*, *IL1A*, *IL1RN*, *KLF10*, *MAFF*, *NFKBIZ*, *PLAU*, *PLEK*, *PLEKHG2*, *PLK2*, *PTX3*, *TNF*, *TNFAIP3*, *XBP1* i *ZFP36*. A més a més, el mateix test va confirmar que 8 dels 9 gens infraexpressats en l'anàlisi de microarrays (*AP3M1*, *ARRDC3*, *C4BPA*, *C1QC*, *DDX28*, *SOLH*, *SOX4*, *TBCC*, *ZNF217*) tenien uns valors d'expressió semblants en tots els pacients, així com altres gens estudiats com *B2M*, *CCL23*, *CD44*, *NBN*, *NFE2*, *RABGEF1* i *RBF600*. El novè gen infraexpressat, el gen *C1QC* no disposem de les dades d'expressió degut a que l'assaig d'aquest gen no ha amplificat.

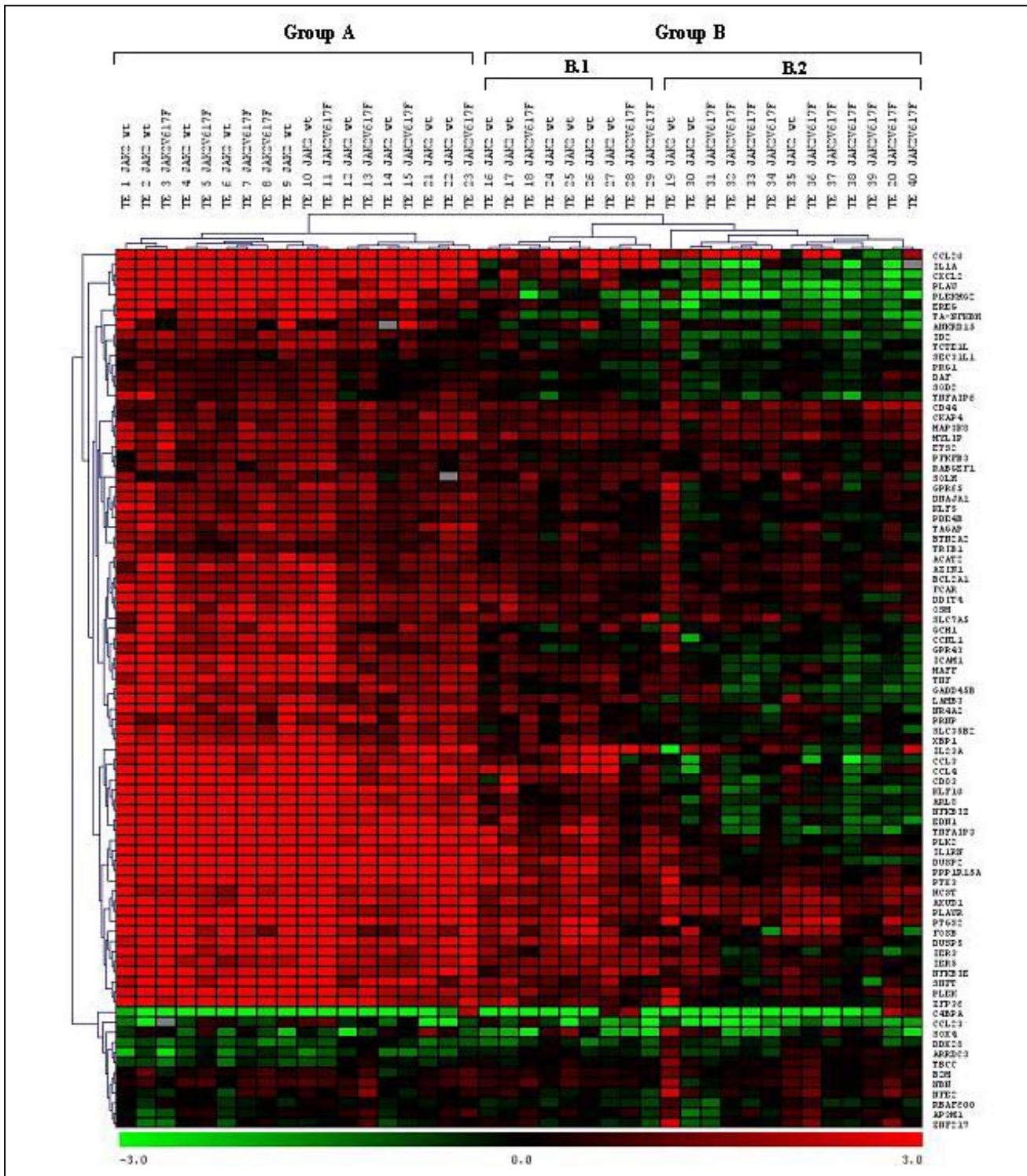


Figura R8. Patró d'expressió en 40 pacients amb TE utilitzant la plataforma TLDA 1. Es mostren les dades d'expressió de 87 dels 96 gens, ja que es van excloure 6 gens els quals no amplificaven en cap dels pacients (*C1QC*, *CNGB1*, *HLA-G*, *LIMS1*, *MT1M* i *PHACTR1*) i no es mostren els resultats dels tres gens utilitzats com a controls endògens (18S *rRNA*, *GAPDH* i *GUSB*). Les columnes representen els pacients i les files els gens. Els valors d'expressió corresponen al FC de cada pacient i el *pool* de controls. Els quadrats de color gris representen a assaigs dels quals no es disposa de dades.

Anàlisi de l'associació dels paràmetres clínic-biològics amb l'agrupació dels pacients

Es va analitzar la relació entre l'agrupació dels pacients (Figura R8) i els paràmetres clínic-biològics descrits a la taula R2 (pàgina 143), i no es va trobar cap associació estadísticament significativa amb els dos grups (A i B). No obstant, tres dels quatre pacients que havien patit complicacions trombòtiques es trobaven en el grup A. A més a més, el 76,9% (10/13) pacients del grup B.2 eren *JAK2V617F*-positius.

4.1.2. Patrons d'expressió gènica en relació a *JAK2V617F*

4.1.2.1. Anàlisi dels gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius estudiats per microarrays d'expressió

Es va realitzar una anàlisi supervisada de les dades de microarrays d'expressió dels 17 pacients amb TE, en el que es comparaven els patrons d'expressió dels pacients *JAK2V617F*-positius vs. *JAK2V617F*-negatius. L'anàlisi de t-test moderat Bayesià va mostrar 44 gens diferencialment expressats entre els dos grups de pacients i amb anotació funcional ($P < 0,017$). La majoria d'ells es trobaven sobreexpressats en els pacients *JAK2V617F*-positius però presentaven poques diferències d'expressió en relació amb els controls. Es va seleccionar un grup de 40 gens aplicant un punt de tall del $FC > 1,35$ o $< 1,35$ ($P < 0,017$) (Figura R1, pàgina 145). També es va implementar l'algorisme SAM, en el que s'aplica la correcció per tests múltiples FDR. El SAM va identificar els gens *CISH* i *ZDHHC20* com a diferencialment expressats ($FDR < 0,05$). Aquests 2 gens serien els que presenten una expressió diferencial més significativa dins el grup de 40 gens seleccionats.

En la figura R9 es mostra un dendrograma i un *heatmap* (elaborat utilitzant la distància euclídea i el mètode de la mitjana) que ens representen l'agrupació dels 17 pacients en funció de l'expressió dels 40 gens seleccionats. S'observen majoritàriament dues

agrupacions de pacients que correspondrien als *JAK2V617F*-positius i als *JAK2V617F*-negatius.

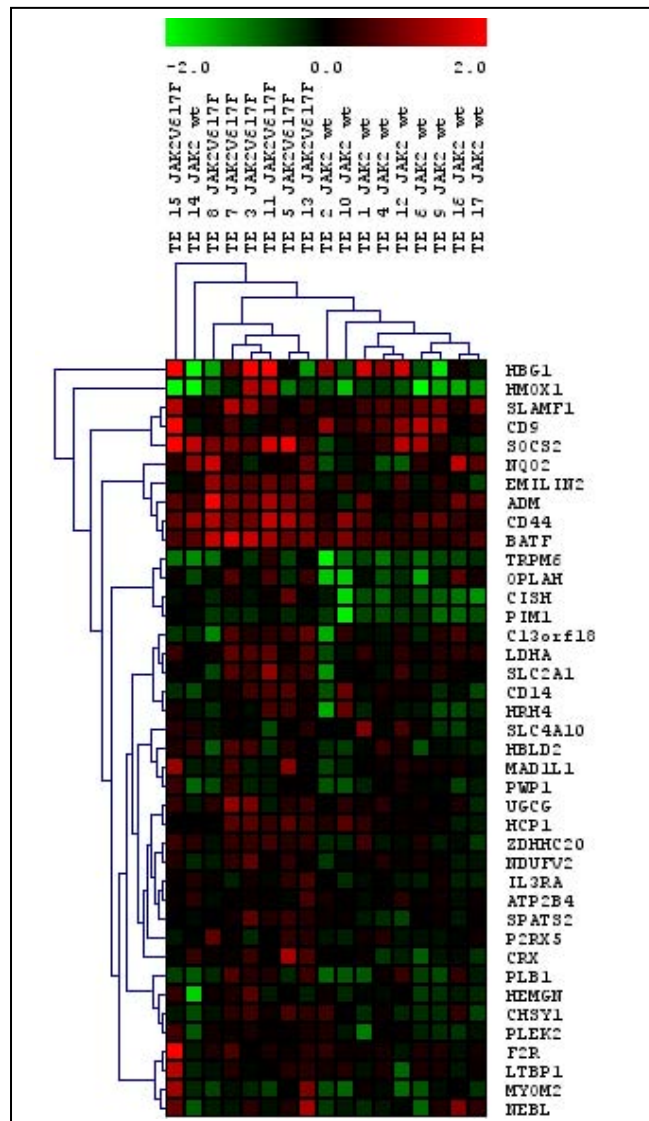


Figura R9. Patró d'expressió dels 40 gens diferencialment expressats entre els 7 pacients amb TE *JAK2V617F*-positius vs. els 10 pacients *JAK2V617F*-negatius, utilitzant la tècnica de microarrays d'expressió. Els valors d'expressió corresponen al FC entre cada pacient i el *pool* de controls. Les columnes representen els pacients i les files els gens.

4.1.2.2. Validació dels resultats dels microarrays d'expressió

Validació dels gens diferencialment expressats entre els pacients JAK2V617F-positius i JAK2V617F-negatius utilitzant la plataforma TLDA 2

A partir dels resultats anteriors es va dissenyar una nova plataforma TLDA, anomenada plataforma TLDA 2, composta per 48 gens que incloïen els 40 gens diferencialment expressats en els microarrays i els gens *SOCS1*, *SOCS3*, *CCND1* i *BCL2L1*, els quals es troben directament o indirectament relacionats amb la via de senyalització JAK-STAT. Els gens *18S rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* i *HPRT1* es van utilitzar com a controls endògens. En la taula M9 (pàgina 104) es llisten els 48 assaigs escollits. Emprant la tècnica de RQ-PCR es va estudiar el grup de 44 gens (junt amb els 4 controls endògens) en 19 dels 20 pacients estudiats anteriorment (no s'inclou el pacient TE 3) per microarrays d'expressió, i testat en 19 dels 20 pacients analitzats també amb la plataforma TLDA 1 (no s'inclou el pacient TE 40) (Figura R1, pàgina 145).

Per a l'anàlisi dels gens amb expressió diferencial l'anàlisi de t-test va confirmar que en els 19 pacients prèviament estudiats per microarrays, 12 dels 48 gens presentaven expressió diferencial entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius ($P < 0,052$). En el global de 38 pacients amb TE el nombre de gens amb expressió diferencial entre els dos grups es reduïa a 8 ($P < 0,052$), i eren els següents: *CISH*, *C13orf18*, *CD44*, *PIM1*, *SOCS2*, *SOCS3*, *HRH4* i *BATF*. En la taula R4 (pàgina 167) es llisten, entre altres, aquests gens i els seus valors d'expressió.

Entre aquests gens diferencialment expressats trobem els gens *CISH* (*cytokine inducible SH2-containing protein*), *SOCS2* (*suppressor of cytokine signaling 2*), *SOCS3* (*suppressor of cytokine signaling 3*) i *PIM1* (*PIM1 oncogene*), els quals formen part de la via JAK-STAT (Ward i cols. 2000). Els gens *SOCS2* i *SOCS3* es trobaven sobreexpressats en els pacients *JAK2V617F*-positius, mentre que la seva expressió era semblant entre els pacients *JAK2V617F*-negatius i els controls. Els nivells

d'expressió dels gens *CISH* i *PIM1* en els pacients portadors de la mutació eren semblants als controls, però es trobaven infraexpressats en els pacients *JAK2V617F*-negatius (Taula R4, pàgina 167).

Pel què fa als gens *BATF*, *CD44*, *C13orf18* i *HRH4*, es va detectar una sobreexpressió de *BATF* (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*) i de *CD44* en els pacients *JAK2V617F*-positius vs. *JAK2V617F*-negatius. Al contrari, els gens *C13orf18* (chromosome 13 open reading frame 18) i *HRH4* (histamine H4 receptor) es trobaven infraexpressats en els pacients *JAK2V617F*-negatius. Els nivells d'expressió de *C13orf18* eren el millor marcador per a discriminar les TE *JAK2V617F*-positives de les *JAK2V617F*-negatives i dels controls (Taula R4, pàgina 167).

Validació dels gens diferencialment expressats entre els pacients JAK2V617F-positius i JAK2V617F-negatius utilitzant la plataforma TLDA 1

Per altra banda també es va realitzar una anàlisi d'expressió diferencial dels resultats obtinguts en les 40 TE mitjançant la plataforma TLDA 1. L'anàlisi del t-test va mostrar un grup de 22 gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius ($P < 0,05$). Una dada interessant era el fet que aquest mateix grup de gens es trobava infraexpressat en el grup B.2, resultant del clustering no supervisat de les dades de la plataforma TLDA 1 en les 40 TE, en el qual la majoria de pacients eren portadors de la mutació *JAK2V617F*.

Anàlisi conjunt dels resultats de la plataforma TLDA1 i TLDA2

El grup de 22 gens identificat amb la plataforma TLDA 1, junt amb els 8 gens definits prèviament en la plataforma TLDA 2, conformen un grup de 30 gens que presenten expressió diferencial en relació amb l'estat de *JAK2V617F* (Taula R4, pàgina 167 i Figura R1, pàgina 145). Utilitzant l'algorisme SAM es va confirmar l'expressió diferencial de 24 dels 30 ($FDR < 0,05$). Els 6 gens que s'excloïen al fer al correcció FDR eren els següents: *TRIB1*, *KLF5*, *ID2*, *TAGAP*, *TA-NFKBH* i *DDIT4*.

En la figura R10 es mostra un dendrograma i un *heatmap* (elaborat utilitzant la distància euclídea i el mètode del màxim) que ens representen l'agrupació dels 38 pacients amb TE en funció de l'expressió dels 30 gens seleccionats. S'observen majoritàriament dues agrupacions de pacients que correspondrien als *JAK2V617F*-positius vs. *JAK2V617F*-negatius.

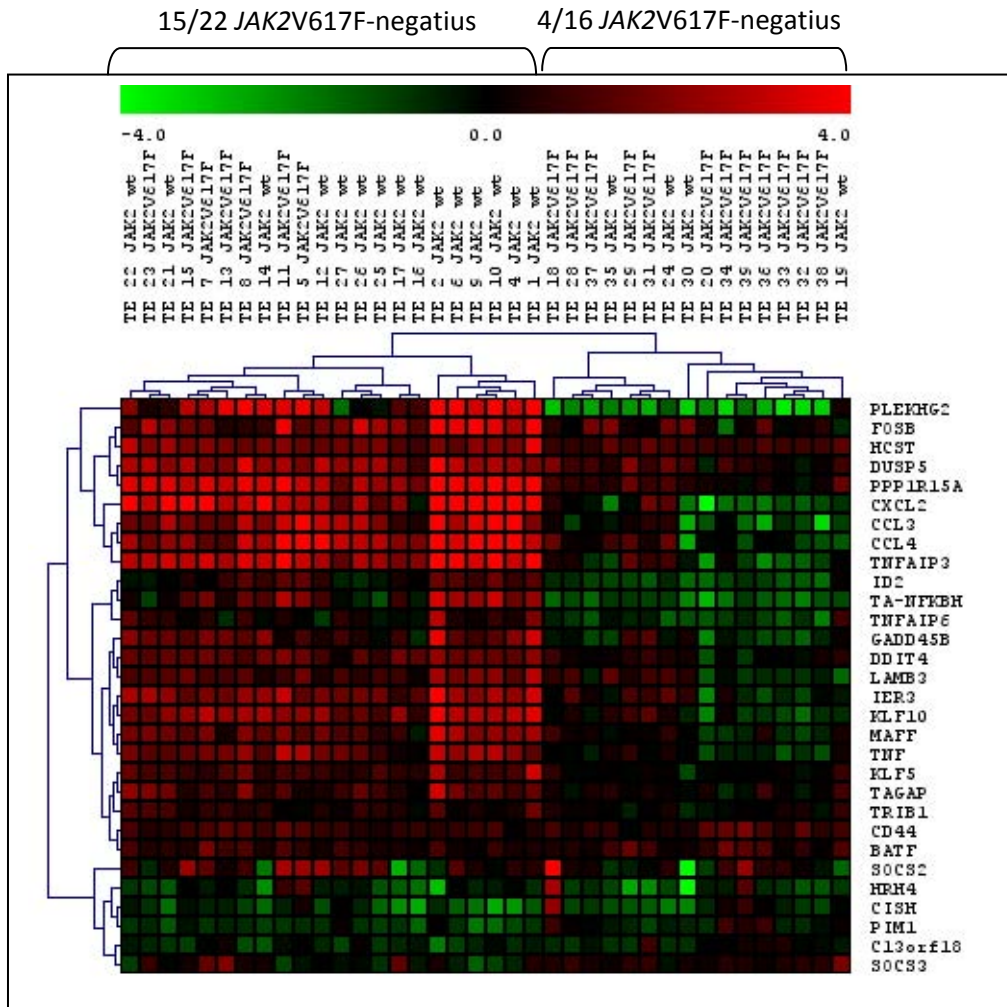


Figura R10. Patró d'expressió dels 30 gens diferencialment expressats entre els 19 pacients amb TE *JAK2V617F*-positius vs. els 19 pacients *JAK2V617F*-negatius, utilitzant la plataforma TLDA 1 i 2. Els valors d'expressió corresponen al FC de cada pacient i el *pool* de controls. Les columnes representen els pacients i les files els gens.

Taula R4. Gens diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius ($P < 0,052$). Els gens de la via JAK-STAT estan marcats en negreta i subratllats.

| Símbol | Descripció gen | Nº accés GenBank | Assaig Taqman | Fold change vs. pool controls | | FC <i>JAK2V617F</i> -positiu/ <i>JAK2V617F</i> -negatiu | P valor |
|---------------------|---|------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------|---|---------|
| | | | | <i>JAK2V617F</i> -positiu | <i>JAK2V617F</i> -negatiu | | |
| <u>CISH</u> | cytokine inducible SH2-containing protein | NM_013324 | Hs00367082_g1 | -1,33 | -2,79 | 2,08 | 0,00062 |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | NM_006732 | Hs00171851_m1 | 1,87 | 5,32 | 0,35 | 0,00204 |
| C13orf18 | chromosome 13 open reading frame 18 | NM_025113 | Hs00228336_m1 | -1,17 | -1,63 | 1,39 | 0,00447 |
| CD44 | CD44 molecule (Indian blood group) | NM_000610 | Hs00153304_m1 | 1,81 | 1,49 | 1,22 | 0,00500 |
| IER3 | immediate early response 3 | NM_003897 | Hs00174674_m1 | 1,64 | 3,80 | 0,43 | 0,00749 |
| HCST | hematopoietic cell signal transducer | NM_014266 | Hs00367159_m1 | 2,58 | 3,82 | 0,68 | 0,00803 |
| CCL3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | NM_002983 | Hs00234142_m1 | 1,27 | 3,94 | 0,32 | 0,01113 |
| <u>PIM1</u> | pim-1 oncogene | NM_002648 | Hs00171473_m1 | -1,28 | -1,77 | 1,37 | 0,01263 |
| MAFF | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) | NM_012323 | Hs00544822_m1 | 1,37 | 2,73 | 0,50 | 0,01352 |
| PPP1R15A | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | NM_014330 | Hs00169585_m1 | 3,09 | 7,06 | 0,44 | 0,01379 |
| KLF10 | Kruppel-like factor 10 | NM_005655 | Hs00194622_m1 | 1,55 | 3,68 | 0,42 | 0,01403 |
| <u>SOCS3</u> | suppressor of cytokine signaling 3 | NM_003955 | Hs00269575_s1 | 1,46 | -1,04 | 1,52 | 0,01823 |
| ID2 | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | NM_002166 | Hs00747379_m1 | -1,36 | 1,21 | 0,61 | 0,01891 |
| TNFAIP3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | NM_006290 | Hs00234713_m1 | 1,81 | 5,57 | 0,32 | 0,01914 |
| CCL4 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | NM_002984 | Hs99999148_m1 | 2,08 | 6,29 | 0,33 | 0,02024 |
| GADD45B | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | NM_015675 | Hs00169587_m1 | 1,10 | 2,15 | 0,51 | 0,02560 |
| TNFAIP6 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | NM_007115 | Hs00200180_m1 | -1,42 | 1,22 | 0,57 | 0,02565 |
| TA-NFKBH | T-cell activation NFKB-like protein | NM_139239 | Hs00262018_m1 | -1,40 | 1,57 | 0,45 | 0,02767 |
| CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | NM_002089 | Hs00601975_m1 | 1,60 | 6,98 | 0,23 | 0,02775 |
| KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | NM_001730 | Hs00156145_m1 | 1,38 | 1,98 | 0,70 | 0,03059 |
| TNF | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | NM_000594 | Hs00174128_m1 | 1,40 | 2,69 | 0,52 | 0,03283 |
| PLEKHG2 | pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2 | NM_022835 | Hs00293943_m1 | -1,51 | 2,79 | 0,24 | 0,03572 |
| DDIT4 | DNA-damage-inducible transcript 4 | NM_019058 | Hs00430304_g1 | 1,56 | 2,49 | 0,63 | 0,04051 |
| LAMB3 | laminin, beta 3 | NM_000228 | Hs00165078_m1 | 1,31 | 2,29 | 0,57 | 0,04114 |
| HRH4 | histamine receptor H4 | NM_021624 | Hs00222094_m1 | -1,32 | -2,28 | 1,73 | 0,04516 |
| TAGAP | T-cell activation GTPase activating protein | NM_138810 | Hs00299284_m1 | 1,43 | 2,22 | 0,65 | 0,04650 |

| | | | | | | | |
|--------------|---|-----------|---------------|------|-------|------|---------|
| BATF | basic leucine zipper transcription factor, ATF-like | NM_006399 | Hs00232390_m1 | 1,91 | 1,53 | 1,25 | 0,04701 |
| TRIB1 | tribbles homolog 1 (Drosophila) | NM_025195 | Hs00179769_m1 | 1,18 | 1,48 | 0,80 | 0,04993 |
| DUSP5 | dual specificity phosphatase 5 | NM_004419 | Hs00244839_m1 | 2,71 | 5,05 | 0,54 | 0,05023 |
| SOCS2 | suppressor of cytokine signaling 2 | NM_003877 | Hs00153304_m1 | 1,96 | -1,06 | 2,09 | 0,05126 |

4.1.3. Grup de gens predictors de l'estat mutacional de *JAK2V617F*

Es van agrupar els resultats de RQ-PCR obtinguts en els 38 pacients comuns de les plataformes TLDA 1 i 2, obtenint dades d'expressió d'un total de 137 gens i de 4 controls endògens per cada pacient. L'objectiu era definir una signatura d'expressió gènica que diferenciés les TE *JAK2V617F*-positives de les *JAK2V617F*-negatives (Figura R1, pàgina 145). Es va construir un model predictor amb el grup d'entrenament, anomenat *training data set*, compost per 26 mostres (13 *JAK2V617F*-positives i 13 *JAK2V617F*-negatives), i es va avaluar en un grup de pacients independent, anomenat *test data set*, format per 12 mostres (6 *JAK2V617F*-positives i 6 *JAK2V617F*-negatives). Es va realitzar una cerca seqüencial exhaustiva per tal de seleccionar els gens amb menor error de classificació en el *training set* i amb un poder predictor òptim en el *test set*. Es van aplicar diferents tandes de MiPP del paquet de R, utilitzant l'anàlisi discriminatiu linial i els paràmetres ($n.seq=20$, $n.split=100$, $n.fold=10$, $n.split.eval=100$) i canviant el nombre de gens preseleccionats (utilitzant el paràmetre $percent.cut$). Es van seleccionar dos models els quals presentaven una taxa d'error menor del 20% en el *test set*. El primer model era un predictor format pels 3 gens *CISH*, *FOSB* (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue B*) i *SOCS2*, amb una taxa d'error de validació del 15,38% en el *training set* i del 16,67% en el *test set* ($percent.cut=0,3$). El segon model, format per només els gens *CISH* i *FOSB*, presentava una taxa d'error de l'11,54% en el *training set* i del 16,67% en el *test set* ($percent.cut=0,02$). És destacable que els dos gens amb el valor predictiu més elevat apareixien en tots els models predictors (Figura R11). Aquests resultats emfatitzen el poder de *CISH* i *FOSB* per a discriminar els pacients amb TE segons l'estat de *JAK2V617F*.

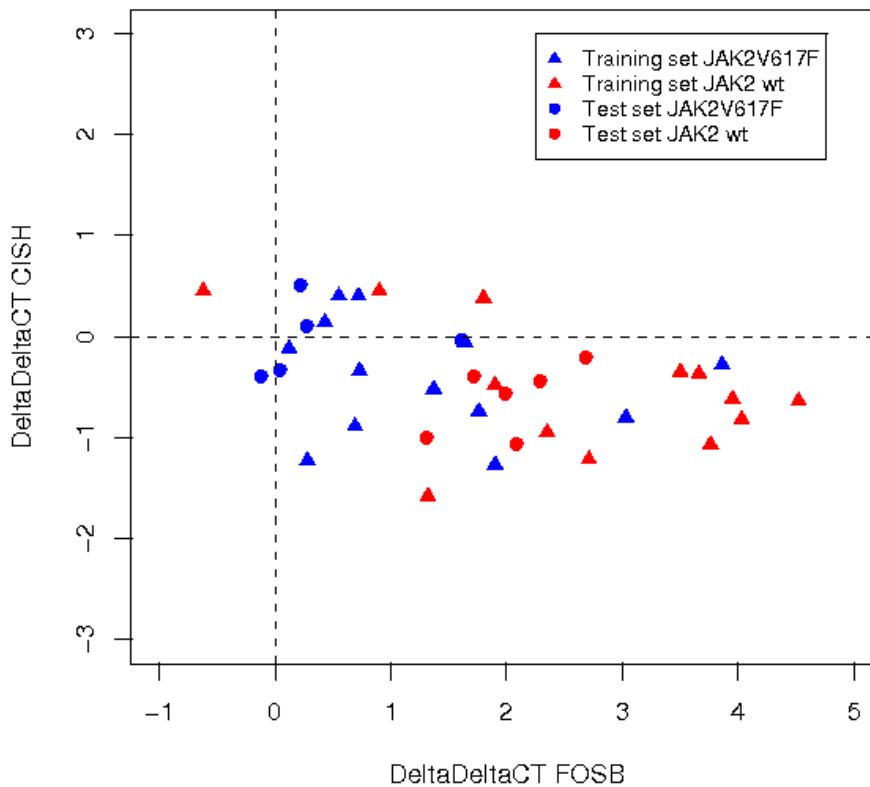


Figura R11. Diagrama que mostra l'expressió relativa dels gens *CISH* i *FOSB* en relació al *pool* de controls en el *training set* (26 mostres; 13 *JAK2V617F*-positives i 13 *JAK2V617F*-negatives) i en el *test set* independent (12 mostres; 6 *JAK2V617F*-positives i 6 *JAK2V617F*-negatives. Aquests gens mostren una bona separació entre els dos grups de l'estat de *JAK2*.

4.1.4. Signatura d'expressió gènica en els pacients *JAK2V617F*-negatius

Del total de 30 gens diferencials entre els pacients *JAK2V617F*-negatius vs. els *JAK2V617F*-positius, es va definir un grup de gens els quals també eren diferencials respecte als controls. Entre ells, els següents gens mostraven un patró d'expressió anormal (amb $FC > 1.5$ en relació als granulòcits control) en els pacients *JAK2V617F*-negatius: *CISH*, *C13orf18*, *CCL3*, *PIM1*, *MAFF*, *SOCS3*, *ID2*, *GADD45B*, *KLF5*, *TNF*, *LAMB3*, *HRH4*, *TAGAP* i *TRIB1* (Taula R4, pàgina 167). És destacable que l'expressió d'aquests gens no estava alterada ni en els pacients *JAK2V617F*-positius ni els controls.

4.2. VALIDACIÓ DELS RESULTATS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESENCIAL I COMPARACIÓ AMB LA POLICITÈMIA VERA

Pacients

Es van incloure un total de 98 pacients amb NMP diagnosticats segons els criteris de l'OMS del 2008 (Swerdlow i cols. 2008) i sense haver rebut tractament citorreductor. Aquest grup de NMP incloïa 57 TE: 23 *JAK2V617F*-negatives, 33 *JAK2V617F*-positives en heterozigosi i una *JAK2V617F*-positiva en homozigosi. D'aquestes 57 TE, 40 corresponien a les ja estudiades en l'apartat 4.1 (TE 1-40) i 17 era una sèrie independent de pacients (TE 41-57): quatre *JAK2V617F*-negatives, 12 *JAK2V617F*-positives en heterozigosi i una *JAK2V617F*-positiva en homozigosi. El grup de 41 pacients amb PV (PV 1-41) estava compost per: set *JAK2V617F*-negatives, 24 *JAK2V617F*-positives en heterozigosi, nou *JAK2V617F*-positives en homozigosi i una *JAK2* exó 12-positiva. També es van incloure sis pacients amb TR, que corresponien a cinc pacients amb neoplàsies i un amb artritis reumatoide, i un grup de 10 individus sans, aquests últims com a controls i que ja es van utilitzar en el treball descrit en l'apartat 4.1.

Entre els 98 pacients amb NMP, 83 presentaven almenys un dels següents marcadors de clonalitat: mutació *JAK2V617F* o mutació a l'exó 12 del *JAK2*, positivitat per l'assaig *HUMARA* o creixement endogen mieloide. Les dades clínico-biològiques dels pacients es detallen a la taula R5. De les 57 TE, 36 presentaven un cariotip normal, un pacient (TE 49) era portador de la del(11)(q13q23) i en els 20 pacients restants no es van obtenir metafases. De les 41 PV, 24 tenien un cariotip normal, tres (PV 4, 11 i 20) presentaven alteracions (cariotip complex, trisomia 9 i add(18)(p11), respectivament) i en la resta no es van obtenir metafases.

El treball es va aprovar pel comitè ètic local i es va obtenir un consentiment informat de tots els pacients, d'acord amb la Declaració de Helsinki.

Per a la validació proteica de l'expressió del *FOSB* es va incloure una sèrie independent de 12 pacients (cinc *JAK2V617F*-negatius i set *JAK2V617F*-positius), que no corresponien als estudiats per TLDA, diagnosticats de TE segons els criteris de l'OMS del 2008 (Swerdlow i cols. 2008) i sense haver rebut tractament citorreductor. Com a controls de l'estudi es van incloure cinc individus sans, junt amb la línia cel·lular K562 i una biòpsia de càncer de mama.

Taula R5. Principals dades clínic-biològiques al diagnòstic dels 98 NMP en relació a l'estat de *JAK2* i comparant els pacients amb TE i PV.

| | TE (n=57) | | | PV (n=41) | | | TE vs. PV | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | <i>JAK2V617F</i> -positiu (n=34) | <i>JAK2V617F</i> -negatiu (n=23) | P valor | <i>JAK2</i> -positiu (n=34)# | <i>JAK2</i> -negatiu (n=7) | P valor | TE(n=57) | PV (n=41) | P valor |
| Edat ^o | 56(+/-15) | 53(+/-16) | 0,470 | 64(+/-11) | 60(+/-12) | 0,405 | 55(+/-15) | 64(+/-11) | 0,001 |
| Sexe | 25D/9H | 17D/6H | 0,974 | 12D/22H | 0D/7H | 0,085 | 42D/15H | 12D/29H | <0,001 |
| Plaquetes, x10 ⁹ /L ^o | 714,9(+/-219,7) | 839,2(+/-240,7) | 0,051 | 497,5(+/-205,5) | 176,9(+/-33,7) | <0,001 | 763,8(+/-234,2) | 442,8(+/-223,5) | <0,001 |
| Leucòcits, x10 ⁹ /L ^o | 9,5(+/-2,9) | 8,2(+/-1,5) | 0,030 | 10,6(+/-4,5) | 8,4(+/-3,4) | 0,231 | 9,0(+/-2,5) | 10,2(+/-4,4) | 0,122 |
| Hemoglobina, g/dL ^o | 14,3(+/-1,7) | 13,4(+/-1,6) | 0,058 | 18,8(+/-1,2) | 17,2(+/-2,5) | 0,098 | 14,0(+/-1,7) | 17,5(+/-2,4) | <0,001 |
| LDH augmentada (>450) | 4/33 | 6/23 | 0,288 | 12/34 | 1/7 | 0,399 | 10/56 | 13/41 | 0,113 |
| Index FAG ^o | 80,0(+/-37,3) | 53,5(+/-16,9) | 0,003 | 125,8(+/-37,0) | 64,5(+/-33,7) | 0,004 | 69,5(+/-33,3) | 118,3(+/-41,5) | <0,001 |
| Esplenomegàlia | 2/33 | 3/23 | 0,330 | 12/33 | 1/7 | 1,000 | 5/57 | 13/40 | 0,004 |
| Episodis trombòtics | 2/34 | 3/23 | 0,384 | 8/34 | 2/7 | 1,000 | 5/57 | 10/41 | 0,034 |
| Episodis hemorràgics | 2/34 | 3/23 | 0,384 | 1/31 | 0/6 | 1,000 | 5/57 | 1/37 | 0,398 |
| Factors de risc cardiovascular | 20/34 | 10/23 | 0,255 | 18/34 | 6/7 | 0,207 | 30/57 | 24/41 | 0,562 |
| % <i>JAK2V617F</i> alleles* | 27,3%(22,5-32,2%) | NA | NA | 54,5%(31,1-125%) | NA | NA | 27,3%(22,5-32,2%) | 54,5%(31,1-125%) | <0,001 |
| Clonalitat <i>HUMARA</i> | 5/14 | 6/13 | 0,581 | 5/9 | NA | NA | 11/27 | 5/9 | 0,470 |
| Creixement endogen mieloide (eBFU-E i/o eCFU-MK) | 27/33 | 10/22 | 0,005 | 29/32 | 2/6 | 0,006 | 37/55 | 31/38 | 0,126 |
| eBFU-E | 26/33 | 1/22 | <0,001 | 28/31 | 1/6 | 0,001 | 27/55 | 29/37 | 0,005 |
| eCFU-MK | 21/33 | 10/22 | 0,183 | 13/31 | 1/6 | 0,376 | 31/55 | 14/37 | 0,081 |
| <i>PRV-1</i> augmentat (>15) | 14/25 | 1/23 | <0,001 | 28/30 | 1/2 | 0,181 | 15/48 | 29/32 | <0,001 |

*: es mostra la mediana (rang), ^o: es mostra la mitjana (±DS). #: Tots els casos presenten la mutació *JAK2V617F* excepte un pacient amb la mutació *JAK2*-exó 12.

Abreviatures: D:dona; H:Home; LDH: lactat dehidrogenasa; FAG: fosfatasa alcalina granulocítica; NS: no estadísticament significatiu; NA:no aplicable. En **negreta** els P valors<0,05.

Mètodes

En aquest apartat es utilitzar mostra d'ARN de granulòcits de SP de les 17 TE noves i de les 41 PV, obtingut i processat segons està descrit a l'apartat 2.1.1 i 2.1.2 Es va extreure l'ARN dels granulòcits (apartat 2.1.3) i es va valorar la seva puresa i integritat (apartat 2.1.4).

En la figura R12 es mostra un esquema del disseny de l'estudi. Es detallen les diferents plataformes TLDA utilitzades així com els resultats més rellevants obtinguts en cada anàlisi. En general es van realitzar dos tipus d'anàlisi: la cerca de gens diferencialment expressats entre les TE, les TR i les PV i els gens diferencials entre els pacients amb TE i PV *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius. Concretament, en una primera fase es van analitzar els 17 pacients nous amb TE i amb la plataforma TLDA 1, utilitzada en l'anterior treball (Taula M8, pàgina 101), i es van comparar els resultats amb els de les 40 TE ja estudiades. Amb la mateixa plataforma TLDA també es van estudiar 6 TR i 10 de les 41 PV incloses en l'estudi. Posteriorment, basant-se en els resultats de RQ-PCR en les 40 TE obtinguts en l'estudi anterior (Puigdecanet i cols. 2008) es va dissenyar un nou format de TLDA, anomenat **plataforma TLDA 3**, que contenia 96 assaigs per duplicat, els quals inclouen els gens més diferencialment expressats en les 40 TE en relació amb els controls (62 gens) i els gens més diferencialment expressats entre les 19 TE *JAK2V617F*-negatives i les 19 TE *JAK2V617F*-positives (30 gens). Els controls endògens corresponien als gens *18S rRNA*, *GUSB*, *GAPDH* i *HPRT1*, ja utilitzats en les TLDA anteriors. En la taula M10 (pàgina 106) es llisten els 96 assaigs escollits de la plataforma TLDA 3. Utilitzant aquesta plataforma es van analitzar 31 de les 41 PV incloses en l'estudi (veure la taula R1 (pàgina 141) on es resumeixen les plataformes utilitzades, les seves característiques i els pacients analitzats en cadascuna d'elles).

Els resultats de la plataforma TLDA 3 es van comparar amb els obtinguts en les 40 TE, estudiades prèviament mitjançant les TLDA 1 i 2, junt amb les dades de les 17 TE noves, de les 6 TR, de les 10 PV i del pool de 10 individus sans.

L'anàlisi de les dades de les TLDA es va realitzar segons es troba detallat en l'apartat 3.2.1.7. Utilitzant el mètode de Vandesompele (Vandesompele i cols. 2002) es va seleccionar el gen *GAPDH* com a millor control endogen.

En l'estudi de l'expressió proteica del *FOSB* es van emprar granulòcits de SP procedent de pacients amb TE no estudiats per TLDA, junt amb nous individus control, amb la línia cel·lular K562 estimulada amb TPA i una biòpsia de càncer de mama. L'anàlisi de l'expressió del *FOSB* s'ha realitzat segons es troba descrit en l'apartat 3.2.2.

40 TE



44K whole human genome (Agilent)

MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ I RQ-PCR (TLDA)



TLDA

Anàlisi 40 TE vs. Pool controls

Anàlisi 19 TE JAK2V617F-negatives vs. 19 TE JAK2V617F-positives

Plataforma TLDA 1 (96 gens):

- 81/124 dels gens més sobreexpressats i 9/14 dels més infraexpressats
- Gens associats a NMP: *CD44*, *NFE2* i *ANKRD15*
- Controls endògens: *18S rRNA*, *GAPDH* i *GUSB*

Plataforma TLDA 2 (48 gens):

- 40 gens diferencialment expressats
- Altres gens implicats en la via JAK-STAT: *SOCS1*, *SOCS3*, *CCND1* i *BCL2L1*
- Controls endògens: *18S rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* i *HPRT1*

17 TE*, 6 TR i 10 PV

31 PV

Plataforma TLDA 1

Anàlisi 57 TE vs. 6 TR

33 gens diferencialment expressats entre la TE i la TR (P<0,05)

Plataforma TLDA 3 (96 gens):

- 62 gens diferencialment expressats en TE vs. Controls (**Plataforma TLDA 1**)
- 30 gens diferencialment expressats entre TE JAK2V617F-positius i negatius (**Plataforma TLDA 2**)
- Controls endògens: *18S rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* i *HPRT1*

Anàlisi 57 TE vs. 41 PV

65 gens diferencialment expressats entre la TE i la PV (P<0,05)
-Tots sobreexpressats en la TE, excepte el *CD44*

Anàlisi 57 TE: 23 JAK2V617F-negatives vs. 34 JAK2V617F-positives

- 38 gens diferencialment expressats entre TE JAK2V617F-negatius i JAK2V617F-positius (P<0,05)
- 14 gens correlacionen amb la càrrega al·lèlica de JAK2V617F

Anàlisi 41 PV: 7 PV JAK2-negatives vs. 34 PV JAK2-positives

- 21 gens diferencialment expressats entre PV JAK2-negatives, PV JAK2-positives en heterozigosi i PV JAK2-positives en homozigosi (F ratio >5)

FOSB

Diferencialment expressat entre:

- 57 TE i 41 PV (P<0,001)
- 23 TE JAK2V617F-negatives i 34 TE JAK2V617F-positives (P=0,003)
- 7 PV JAK2-negatives, 25 PV JAK2-positives en heterozigosi i 9 PV JAK2-positives en homozigosi (F ratio >5)

Apartat 4.1

Apartat 4.2: validació resultats en TE i comparació amb. TR i PV

Figura R12. Esquema del disseny de l'estudi. Es ressalten els requadres que corresponen a les anàlisis realitzades i els resultats obtinguts.*Sèrie independent de pacients amb TE.

4.2.1. Anàlisi d'expressió en la trombocitèmia essencial

4.2.1.1. Confirmació dels patrons d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial

En l'anàlisi de les dades d'expressió de la sèrie independent de 17 pacients amb TE es van eliminar els assaigs corresponents als gens *C1QC*, *CNGB1*, *HLA-G*, *LIMS1*, *MT1M* i *PHACTR1*, els quals també s'havien eliminat en l'anàlisi anterior, juntament amb els assaigs dels gens *IL23A*, *AP3M1* i *ARRDC3* perquè tampoc amplificaven correctament en la majoria dels pacients. Així, dels 93 gens inicials queden un total de 84 gens estudiats en els 57 pacients amb TE. També es van excloure puntualment els resultats d'aquells assaigs en els que la desviació estàndar dels duplicats era $>0,2$.

Amb l'objectiu de confirmar el patró d'expressió observat en les 40 TE es va realitzar una anàlisi d'agrupació de les dades d'expressió dels 84 gens estudiats en les 57 TE. Es va aplicar un *cluster* jeràrquic en el que s'utilitzava la distància euclídea i el mètode del màxim. El *cluster* va mostrar una classificació en dos grups principals de pacients (Figura R13), que correspondria en part als grups A i B observats en l'anàlisi d'agrupació de les 40 TE. En el primer grup, que també anomenem A, s'inclouen tots els 19 pacients que ja trobaven en el grup A en l'anàlisi de les 40 TE junt amb 10 pacients nous, amb un total de 29 pacients. Com s'observava anteriorment el grup A es caracteritza per una sobreexpressió dels gens relacionats amb la resposta immunològica, confirmant el patró observat en els microarrays d'expressió i en les 40 TE. El segon grup identificat, que també anomenem grup B, conté 27 pacients i inclou els 22 pacients del grup B en les 40 TE. S'observen també dos subgrups, B.1 i B.2, però no es distribueixen com en els resultats anteriors. El que sí s'identifica és una expressió diferencial d'un subgrup de gens, que disminueix progressivament del grup A, al grup B.1 i al grup B.2. Com s'observa en la figura R13, sembla que existeix una relació entre l'agrupació i la presència de *JAK2V617F*, ja que continuem detectant una menor incidència de la *JAK2V617F* en el grup A (el 51,7% (15/29) dels pacients són

JAK2 wt, mentre que en el grup B el 26,9% (8/27) dels pacients són *JAK2 wt*.

Respecte a la incidència de la trombosi, els dos pacients nous analitzats que han patit accidents trombòtics es classificaven dins el grup B.1.

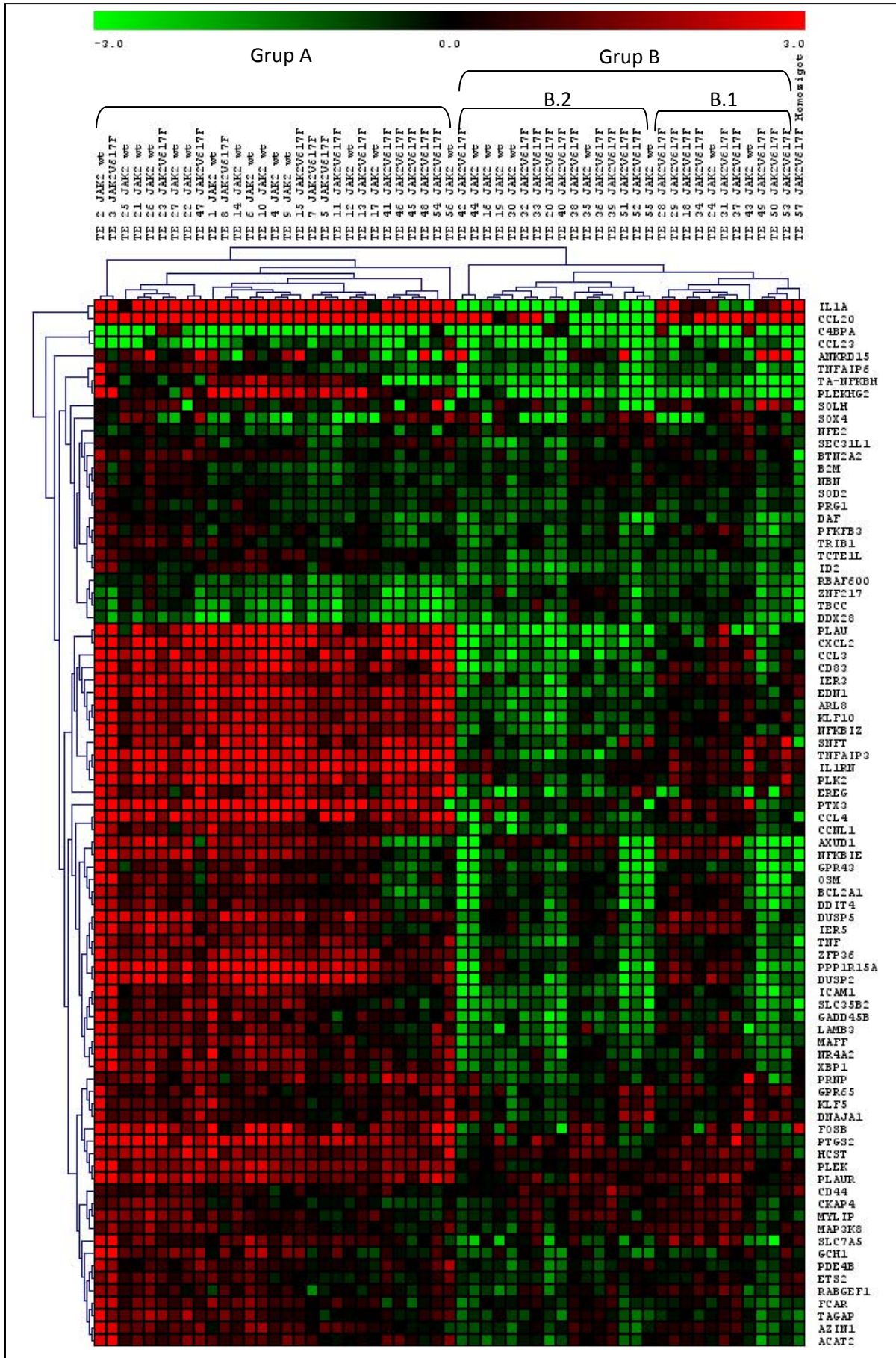


Figura R13. Patró d'expressió en 57 pacients amb TE utilitzant la plataforma TLDA 1. Es mostren les dades d'expressió de 84 dels 96 gens, ja que es van excloure 9 gens els quals no amplificaven en la majoria dels pacients (*C1QC*, *CNGB1*, *HLA-G*, *LIMS1*, *MT1M* i *PHACTR1*, *IL23A*, *AP3M1* i *ARRDC3*) i no es mostren els resultats dels tres gens utilitzats com a controls endògens (18S *rRNA*, *GAPDH* i *GUSB*). Les columnes representen els pacients i les files els gens. Els valors d'expressió corresponen al FC de cada pacient i el *pool* de controls.

4.2.1.3. Confirmació dels patrons d'expressió gènica en la trombocitèmia essencial en relació a *JAK2V617F*

En l'estudi anterior de les 40 TE utilitzant la plataforma TLDA 1 i 2 es van detectar 30 gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-negatius i *JAK2V617F*-positius. Vuit d'aquests gens es trobaven inclosos en la plataforma TLDA 2, i eren els gens *CISH*, *C13orf18*, *CD44*, *PIM1*, *SOCS2*, *SOCS3*, *HRH4* i *BATF*. En l'anàlisi de les noves 17 TE només s'ha utilitzat la plataforma TLDA 1, pel què no es disposa de dades de l'expressió dels vuit gens anteriors, ni dels gens restants de la plataforma TLDA 2. Així, els resultats dels gens diferencials en les 57 TE només corresponen als 84 gens comuns.

Anàlisi en les 57 TE dels gens diferencialment expressats entre els pacients JAK2V617F-positius i JAK2V617F-negatius utilitzant la plataforma TLDA 1

L'anàlisi supervisat de les dades d'expressió dels 84 gens en les 57 TE va identificar 38 gens diferencialment expressats entre els 23 pacients *JAK2V617F*-negatius i 34 *JAK2V617F*-positius ($P < 0,05$). Aquests grup de gens inclouen 20 dels 22 gens que ja es trobaven diferencialment expressats en les 40 TE (procedents de la TLDA 1) i identifiquem 18 nous gens, ampliant el nombre de gens diferencials a un total de 38 (Taula R6 i Figura R12, pàgina 176). Els gens en els quals no es confirma l'expressió diferencial són el *CD44*, *TNFAIP3* i *CCL4*. Utilitzant l'algorisme SAM es va confirmar l'expressió diferencial de 34 dels 38 gens ($FDR < 0,05$). Els quatre gens que s'excloïen

al fer la correcció FDR eren, a part dels tres gens ja detectats pel t-test, els següents:

TCTE1L, PRNP, RBAF600 i SOD2.

Tots els gens presentaven una major expressió en els pacients *JAK2V617F*-negatius, com ja s'havia observat en la majoria de gens diferencials en les 40 TE.

Taula R6. Llistat dels 38 gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-negatius i *JAK2V617F*-positius en les 57 TE. En **negreta** els gens que ja sortien diferencials en les 40 TE.

| Gen | Descripció gen | Nº accés GenBank | Assaig Taqman | FC <i>JAK2V617F</i>-negatiu/ <i>JAK2V617F</i>-positiu | P-valor |
|--------------|--|---|----------------------|--|----------------|
| HCST | hematopoietic cell signal transducer | NM_014266.3, NM_001007469.1 | Hs00367159_m1 | 1,45 | 0,0015 6 |
| BTN2A2 | butyrophilin, subfamily 2, member A2 | NM_181531.1,NM_006995.3 | Hs00272927_m1 | 1,49 | 0,0026 4 |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | NM_006732.1 | Hs00171851_m1 | 2,69 | 0,0030 1 |
| MAFF | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) | NM_152878.1,NM_012323.2 | Hs00544822_m1 | 2,91 | 0,0032 7 |
| TAGAP | T-cell activation GTPase activating protein | NM_054114.3,NM_138810.2, NM_152133.1 | Hs00299284_m1 | 1,37 | 0,0038 2 |
| NR4A2 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 | NM_173171.1,NM_173172.1, NM_173173.1,NM_006186.2 | Hs00428691_m1 | 2,50 | 0,0038 4 |
| ZFP36 | zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse) | NM_003407.2 | Hs00185658_m1 | 2,30 | 0,0048 9 |
| IER5 | immediate early response 5 | NM_016545.4 | Hs00275419_s1 | 2,33 | 0,0055 3 |
| TNF | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | NM_000594.2 | Hs00174128_m1 | 2,87 | 0,0058 9 |
| DUSP5 | dual specificity phosphatase 5 | NM_004419.3 | Hs00244839_m1 | 1,75 | 0,0064 2 |

| | | | | | |
|-----------------|---|---|---------------|------|---------|
| TA-NFKBH | T-cell activation NFKB-like protein | NM_139239.1 | Hs00262018_m1 | 3,78 | 0,00658 |
| DDIT4 | DNA-damage-inducible transcript 4 | NM_019058.2 | Hs00430304_g1 | 2,31 | 0,00813 |
| ID2 | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | NM_002166.4 | Hs00747379_m1 | 1,48 | 0,00886 |
| PPP1R15A | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | NM_014330.2 | Hs00169585_m1 | 3,48 | 0,00911 |
| TRIB1 | tribbles homolog 1 (Drosophila) | NM_025195.2 | Hs00179769_m1 | 1,41 | 0,00954 |
| PTGS2 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | NM_000963.1 | Hs00153133_m1 | 2,19 | 0,00992 |
| PLEKHG2 | pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2 | NM_022835.1 | Hs00293943_m1 | 9,06 | 0,01049 |
| GPR43 | G protein-coupled receptor 43 | NM_005306.2 | Hs00271142_s1 | 1,77 | 0,01226 |
| GADD45B | growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | NM_015675.2 | Hs00169587_m1 | 1,83 | 0,01351 |
| KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | NM_001730.3 | Hs00156145_m1 | 1,37 | 0,01474 |
| DUSP2 | dual specificity phosphatase 2 | NM_004418.2 | Hs00358879_m1 | 4,32 | 0,01556 |
| SOD2 | superoxide dismutase 2, mitochondrial | NM_001024465.1,NM_001024466.1,NM_000636.2 | Hs00167309_m1 | 1,35 | 0,01681 |
| FCAR | Fc fragment of IgA, receptor for | NM_002000.2,NM_133269.2,NM_133272.2,NM_133274.2,NM_133278.2,NM_133279.2 | Hs00370197_m1 | 1,28 | 0,01786 |
| MYLIP | myosin regulatory light chain interacting protein | NM_013262.3 | Hs00203131_m1 | 1,35 | 0,01850 |

| | | | | | |
|----------------|--|-----------------------------|---------------|------|-------------|
| ICAM1 | intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor | NM_000201.1 | Hs00164932_m1 | 2,04 | 0,0193 4 |
| TNFAIP6 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | NM_007115.2 | Hs00200180_m1 | 1,66 | 0,0211 2 |
| AXUD1 | AXIN1 up-regulated 1 | NM_033027.2 | Hs00263583_m1 | 1,75 | 0,0214 3 |
| BCL2A1 | BCL2-related protein A1, Gene hCG201186 Celera Annotation | NM_004049.2 | Hs00187845_m1 | 1,60 | 0,0243 9 |
| IER3 | immediate early response 3 | NM_003897.3 | Hs00174674_m1 | 2,06 | 0,0261 2 |
| CCL3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | NM_002983.2 | Hs00234142_m1 | 3,71 | 0,0267 8 |
| CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | NM_002089.3 | Hs00601975_m1 | 5,13 | 0,0330 0 |
| OSM | oncostatin M | NM_020530.3 | Hs00171165_m1 | 2,28 | 0,0335 9 |
| LAMB3 | laminin, beta 3 | NM_001017402.1, NM_000228.2 | Hs00165078_m1 | 2,27 | 0,0340 8 |
| KLF10 | Kruppel-like factor 10 | NM_005655.1 | Hs00194622_m1 | 3,27 | 0,0362 1 |
| RBAF600 | retinoblastoma-associated factor 600 | NM_020765.2 | Hs00378210_m1 | 1,35 | 0,0384 1 |
| NFKBIE | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon | NM_004556.2 | Hs00234431_m1 | 2,85 | 0,0395 1 |
| PRNP | prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia) | NM_000311.3 | Hs00175591_m1 | 2,28 | 0,0418 6 |
| TCTE1L | t-complex-associated-testis-expressed 1-like | NM_006520.2 | Hs00359622_m1 | 1,34 | 0,0486 4 |

Es va realitzar un cluster jeràrquic dels 38 gens diferencials en les 57 TE que es representa en el dendrograma i el *heatmap* (elaborat utilitzant la distància euclídea i el mètode del màxim) de la figura R14. S'observa majoritàriament dues agrupacions de pacients que correspondrien aproximadament als *JAK2V617F*-positius vs. *JAK2V617F*-negatius i que corresponen en part a l'agrupació que s'observava al realitzar l'anàlisi no supervisat dels 84 gens en els 57 pacients.

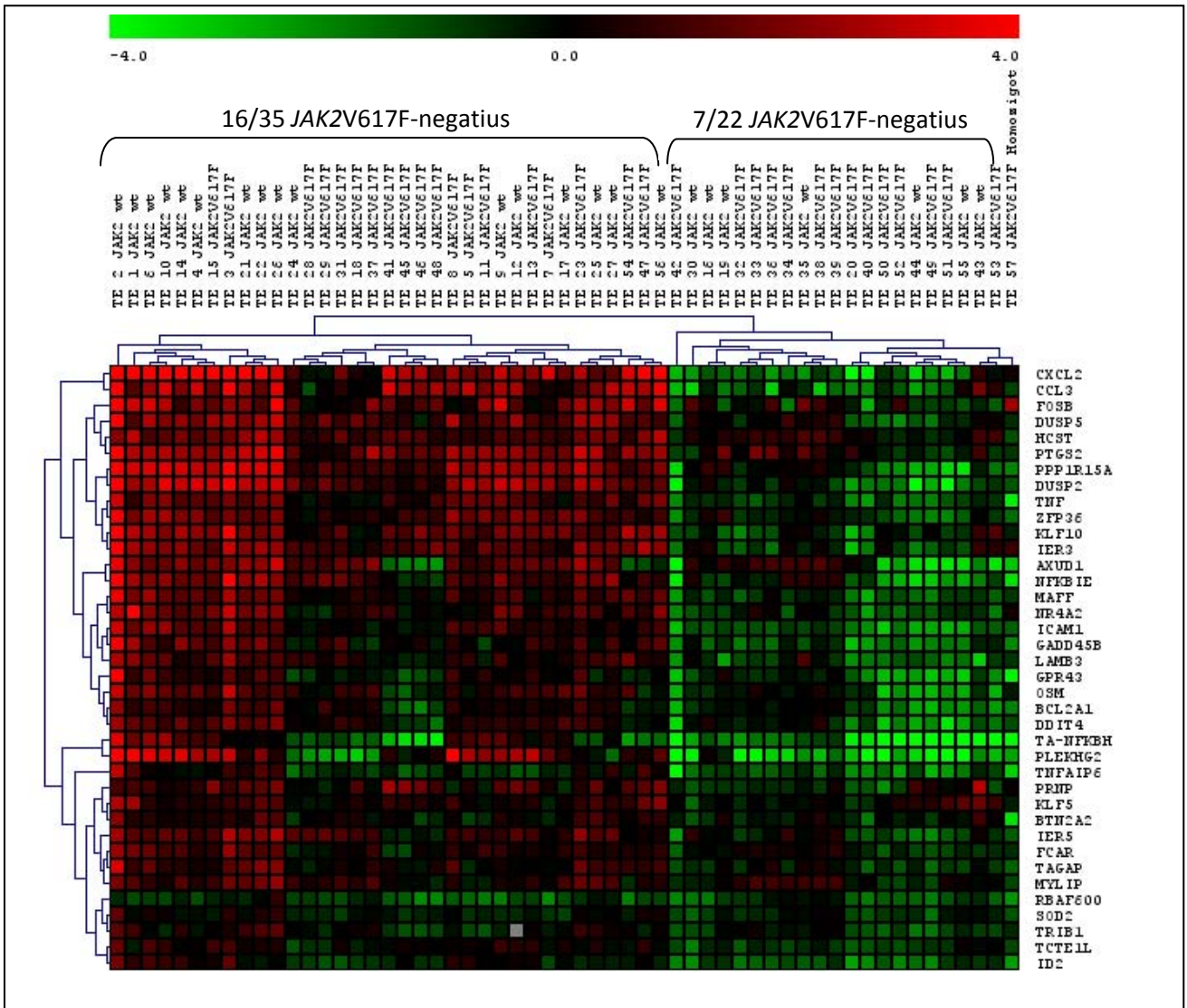


Figura R14. Patró d'expressió dels 38 gens diferencialment expressats entre els 23 pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius vs. els 34 pacients *JAK2V617F*-positius, utilitzant la plataforma TLDA 1. Els valors d'expressió corresponen al FC de cada pacient i el *pool* de controls. Les columnes representen els pacients i les files els gens. Els quadrats de color gris representen a assaigs dels quals no es disposa de dades.

4.2.1.4. Confirmació dels gens predictors de l'estat mutacional de *JAK2V617F*

Es van analitzar els resultats de RQ-PCR obtinguts de la plataforma TLDA 1 en les 57 TE, juntament amb els resultats de la plataforma TLDA 2 en les 38 TE, i es va cercar un model predictor segons els mateixos mètodes i paràmetres utilitzats en l'apartat 4.1.3 (pàgina 169). Es va obtenir un model predictor, format pels gens *CISH* i *FOSB*, amb una taxa d'error del 18,92%. Al afegir un tercer gen en el model, el *IER3*, la taxa d'error disminuïa al 13,51%. Aquests resultats confirmen el poder de *CISH* i *FOSB* per a discriminar els pacients amb TE segons l'estat de *JAK2V617F*.

4.2.1.5. Confirmació de la signatura d'expressió gènica en els pacients *JAK2V617F*-negatius

A partir de les dades d'RQ-PCR de la plataforma TLDA 1 en els 57 pacients es va definir un grup de 21 gens diferencialment expressats en els pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius vs. els *JAK2V617F*-positius i controls. Aquests gens mostraven un patró d'expressió anormal (amb $FC > 1.5$ en relació als granulòcits control) en els pacients *JAK2V617F*-negatius i no en els *JAK2V617F*-positius, i eren els següents: *PP1R15A*, *DUSP2*, *CCL3*, *IER3*, *ZFP36*, *AXUD1*, *NFKBIE*, *IER5*, *NR4A2*, *TNF*, *MAFF*, *MYLIP*, *KLF5*, *PRNP*, *TAGAP*, *FCAR*, *OSM*, *PLEKHG2*, *DDIT4*, *GADD45B* i *LAMB3*. Aquest grup de gens incloïa set dels 14 gens identificats en la mateixa comparativa anterior en les 40 TE. Els gens exclosos són *TRIB1* i *ID2* i els gens *CISH*, *C13orf18*, *SOCS3*, *PIM1* i *HRH4*. Aquest cinc últims gens, presents en la plataforma TLDA 2, no es van analitzar en les noves TE i, per tant, no es van incloure en aquest anàlisi.

4.2.1.6. Efecte de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* en l'expressió gènica de la trombocitèmia essencial

Utilitzant les dades d'expressió dels 44 gens dels 38 pacients amb TE (plataforma TLDA 2) i les dades dels 84 gens comuns en les 57 TE (plataforma TLDA 1), es va realitzar una anàlisi de correlació, amb el test d'Spearman, entre els nivells d'expressió

d'aquests gens i la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F*. Es va demostrar que 15 dels 128 gens estudiats s'alteraven depenent de la dosi de *JAK2V617F* ($P < 0,05$) (Taula R7 i Figura R12, pàgina 176). Aquests fets suggereixen que existeix un efecte de càrrega al·lèlica en l'expressió gènica dels granulòcits dels pacients amb TE. Entre els 15 gens amb correlació significativa, només el *BATF* i el *CD44* mostraven una correlació positiva (un augment d'expressió a l'incrementar la càrrega al·lèlica). Els 13 gens restants presentaven una correlació negativa (una disminució de l'expressió a l'augmentar la càrrega al·lèlica).

Taula R7. Llistat dels 15 gens amb correlació entre els nivells d'expressió i la càrrega al·lèlica de JAK2V617F ($P < 0,05$). R_s =coeficient de correlació d'Spearman.

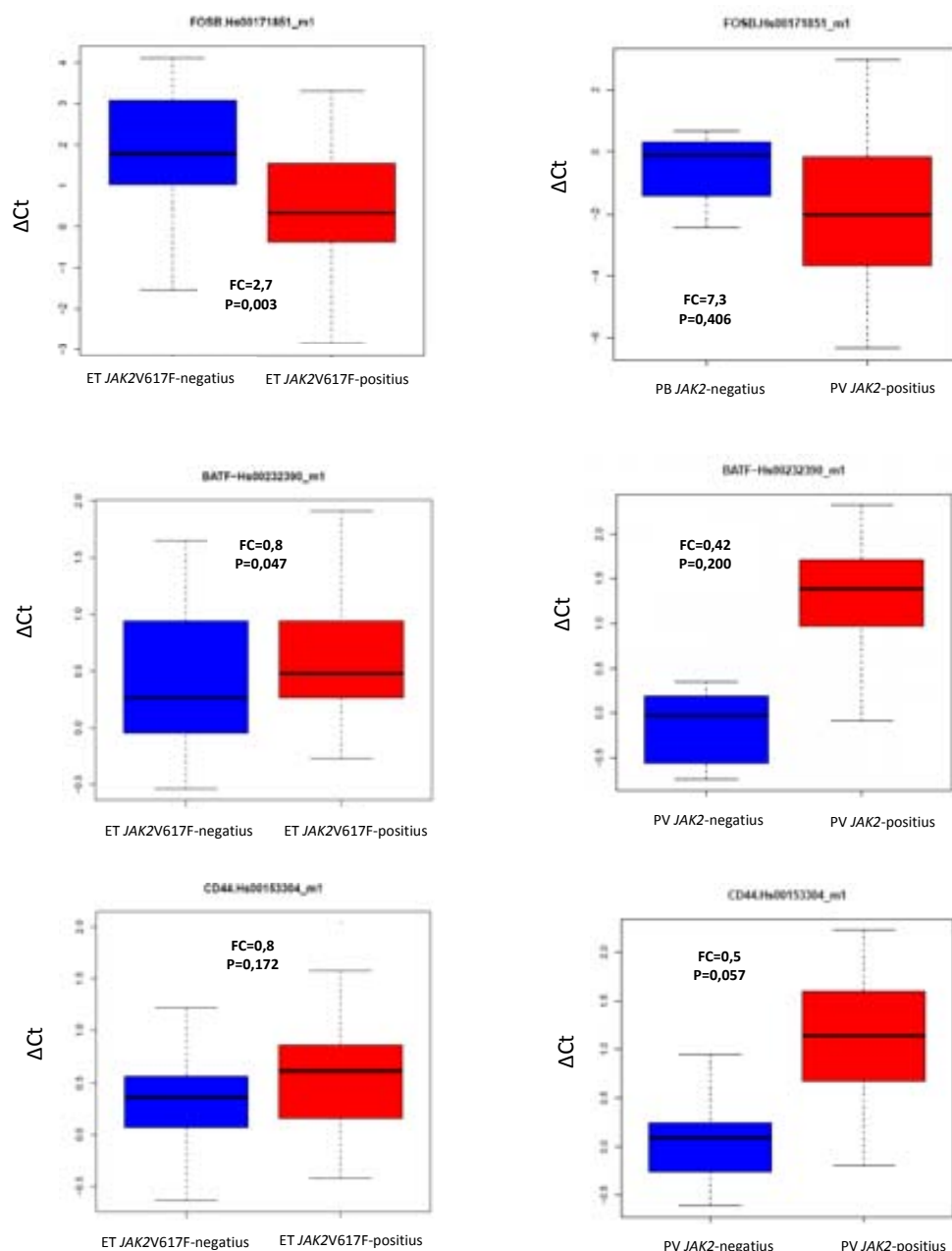
| Gen | Descripció gen | Nº accés GenBank | AssaigTaqman | R_s | P valor |
|----------------|--|--|----------------|-------|---------|
| DDX28 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 | NM_018380.3 | Hs00251087_s1 | -0,69 | 0,00054 |
| CKAP4 | cytoskeleton-associated protein 4 | NM_006825.3 | Hs00199135_m1 | -0,61 | 0,00333 |
| SEC31L1 | solute carrier family 35, member B2 | NM_014933.2, NM_016211.2 | Hs00274601_m1 | -0,56 | 0,00866 |
| ID2 | inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | NM_002166.4 | Hs00747379_m1" | -0,55 | 0,01061 |
| CD44 | CD44 antigen | NM_000610.3 | Hs00153304_m1 | 0,53 | 0,01426 |
| FOSB | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B | NM_006732.1 | Hs00171851_m1 | -0,52 | 0,01502 |
| RBAF600 | retinoblastoma-associated factor 600 | NM_020765.2 | Hs00378210_m1 | -0,51 | 0,01733 |
| HCST | hematopoietic cell signal transducer | NM_014266.3 | Hs00367159_m1 | -0,48 | 0,02778 |
| BATF | basic leucine zipper transcription factor, ATF-like | NM_006399.3 | Hs00232390_m1 | 0,60 | 0,03105 |
| PRG1 | proteoglycan 1, secretory granule | J03223.1, X17042.1, CB110512.1, BC015516.1 | Hs00160444_m1 | -0,46 | 0,03755 |
| TCTE1L | t-complex-associated-testis-expressed 1-like | NM_006520.2 | Hs00359622_m1 | -0,45 | 0,03836 |
| KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | NM_001730.3 | Hs00156145_m1 | -0,44 | 0,04362 |
| PDE4B | phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila) | NM_002600.2 | Hs00277080_m1 | -0,44 | 0,04722 |
| TBCC | tubulin-specific chaperone c | NM_003192.1 | Hs00268437_s1 | -0,44 | 0,04742 |
| B2M | beta-2-microglobulin | NM_004048.2 | Hs99999907_m1 | -0,44 | 0,04745 |

4.2.1.7. El *FOSB* en la trombocitèmia essencial

El gen *FOSB* es va trobar sobreexpressat en totes les TE en comparació amb els controls i era un dels més diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius, amb una major expressió en els *JAK2V617F*-negatius (FC=2,70; P=0,003) (Figura R15). A més a més, la seva expressió es redueix a l'augmentar la dosi de *JAK2V617F*, amb un coeficient de correlació d'Spearman de -0,73 (P<0,001) (Taula R7). A la vegada, juntament amb el *CISH* era un gen predictor de la presència de *JAK2V617F* (Figura R12, pàgina 176).

Per totes aquestes dades i per la funció oncogènica del *FOSB* es va considerar que l'expressió d'aquest gen era rellevant en la patogènesi de la TE. Es van realitzar diferents anàlisis d'associació amb les variables clínic-biològiques dels 57 pacients descrites a la taula R5 (pàgina 173). Entre elles, es va analitzar l'associació entre el eCFU-MK en els pacients *JAK2V617F*-negatius i l'expressió del gen *FOSB*. Aquest es trobava sobreexpressat tant en els pacients que presentaven eCFU-MK (10/22) com en els que no (12/22), sense trobar una associació entre la major expressió del *FOSB* i el eCFU-MK. També es va realitzar la mateixa anàlisi pel eBFU-E, en el que només un pacient *JAK2V617F*-negatiu presentava eBFU-E. En conseqüència, es va trobar una associació entre l'elevada expressió del *FOSB* i el eBFU-E (P<0,05), però estava clarament relacionada amb la presència de la mutació *JAK2V617F*. Per altra banda, es va detectar una associació entre una elevada expressió del *FOSB*, així com dels gens *CD44* i *PTGS2* entre altres, amb l'aparició de complicacions trombòtiques (P<0,05). També es detecta una associació de l'expressió del *FOSB*, i d'altres gens com el *CD44*, amb diferents variables clíniques, com el nombre de leucòcits (r=-0,38) i amb els nivells de fosfatasa alcalina granulocítica (FAG) (r=-0,69), entre altres, però conseqüència també de l'associació d'aquestes amb la presència de la mutació *JAK2V617F*. L'expressió dels gens *FOSB*, *BATF* i *CD44* es detallen a la Figura R15.

Figura R15. Nivells d'expressió de RQ-PCR dels gens *FOSB*, *BATF* and *CD44* en els granulòcits de pacients amb TE i PV *JAK2V617F*-positius i negatius. Les dades s'expressen com a valors ΔCt . Les caixes representen el rang interquartil, la línia horitzontal en la caixa indica la mediana, i les barres mostren el rang dels valors. Els nivells de significància de les diferències i els valors de FC entre les categories de pacients es detallen en el box-plot.



4.2.2. Comparació dels patrons d'expressió gènica de la trombocitèmia essencial i les trombocitosis reactives

Amb l'objectiu de comparar les dades d'expressió de la TE amb les d'un estat reactiu es va analitzar l'expressió de sis pacients amb TR utilitzant la plataforma TLDA 1. Del total de 84 gens estudiats, 33 presentaven una expressió diferencial entre les TE i les TR ($P < 0,05$) i la majoria amb més expressió en els pacients amb TR (Figura R12, pàgina 176). D'aquests gens, només cinc (*RBAF600*, *DAF*, *PPP1R15A*, *PFKFB3*, *PLAUR*) es trobaven alterats en les TE respecte als controls (amb $FC > 1,5$), pel que podrien ser marcadors diagnòstic de la TE respecte a estats normals i reactius.

Al comparar el patró d'expressió de les TR amb les TE segons l'estat del *JAK2* es va observar que entre les TR i els pacients *JAK2V617F*-negatius només cinc gens s'expressaven diferencialment ($P < 0,05$) i eren els següents: *IER5*, *CD44*, *RABGEF1*, *TNF* i *PFKFB3*. Per contra, en la comparació entre l'expressió de les TR i les TE *JAK2V617F*-positives el nombre de gens diferencialment expressats era molt més alt, de 48 gens, entre els que es trobava el *FOSB* ($P < 0,05$).

4.2.3. Anàlisi d'expressió en la policitèmia vera

4.2.3.1. Comparació dels patrons d'expressió gènica de la trombocitèmia essencial i la policitèmia vera

El perfil d'expressió dels 41 pacients amb PV es va estudiar utilitzant els dos formats de 96 gens de la següent manera: 10 pacients (PV 1-10, 2 *JAK2V617F*-negatius, 5 *JAK2V617F*-positius heterozigots i 3 *JAK2V617F*-positius homozigots) es van analitzar utilitzant la plataforma TLDA 1, emprada per les 57 TE (Taula M8, pàgina 101). La resta de 31 pacients (PV 11-41; 5 *JAK2V617F*-negatius, 19 *JAK2V617F*-positius heterozigots, una *JAK2* exó 12-positiva i 6 *JAK2V617F*-positius homozigots) es van analitzar amb el nou format de TLDA, la TLDA 3, la qual incloïa els gens més

diferencialment expressats en les 57 TE en relació amb els individus sans (62 gens) i els gens més diferencialment expressats entre les 19 TE *JAK2V617F*-negatives i les 19 TE *JAK2V617F*-positives (30 gens) (Taula M10, pàgina 106). En la figura R12 (pàgina 176) es mostra un esquema del disseny de l'estudi. En l'anàlisi dels gens estudiats en ambdues plataformes es va eliminar el gen *IL23A* perquè no amplificava correctament en la majoria dels pacients, quedant un total de 84 gens comuns en les 57 TE i 41 PV. La resta de 7 gens, que corresponen al *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3*, *HRH4*, *BATF*, *PIM1* i *C13orf18*, només eren comuns entre les 38 TE i les 31 PV, i també es van analitzar conjuntament.

Anàlisi dels gens diferencials entre la TE i la PV

L'anàlisi de t-test per a la cerca de gens diferencials entre les dues malalties va identificar un grup de 65 gens ($P < 0,05$), tots ells sobreexpressats en la TE respecte a la PV, excepte el gen *CD44* ($FC = 0,67$; $P = 0,014$) (Figura R15). Trenta dels 65 gens mostraven una sobreexpressió amb un FC superior a 3. Entre ells destaca el gen *LAMB3* per tenir la diferència d'expressió més elevada, amb un FC de 8,34 ($P < 0,001$), seguit dels gens *FOSB* ($FC = 6,54$; $P < 0,001$), *IER3* ($FC = 5,46$; $P < 0,001$) i *CCL4* ($FC = 5,41$; $P < 0,001$), entre altres. Cap dels set gens només analitzats en les 38 TE i 31 PV estava diferencialment expressat. Del grup de 65 gens només el *DAF* i el *PLAUR* són gens amb expressió diferencial de les TE respecte a les PV, a les TR i als controls. Ambdós gens presenten una major expressió en les TE en relació a les PV i el gen *DAF* també una sobreexpressió en les TE respecte a les TR.

L'anàlisi d'agrupació de les 57 TE i les 41 PV en funció de l'expressió dels 65 gens diferencialment expressats mostra dues agrupacions de pacients, una en la que predominen els pacients amb TE i l'altra amb PV, però sense ser una separació entre TE i PV clara (Figura R16). El primer grup inclou 31 TE i vuit PV (de les quals dues són PV *wt*, una PV *JAK2V617F*-positiva amb només 1,5% dels al·lels mutats, i cap PV

4.2.3.2. Patrons d'expressió gènica en la policitèmia vera en relació a *JAK2V617F*

Per a l'anàlisi de l'associació de l'expressió gènica amb l'estat de *JAK2* es van emprar les dades corresponents als 84 gens estudiats en les 41 PV junt amb els vuit gens únicament analitzats en 31 de les 41 PV, estudiant un total de 92 gens.

Es va aplicar un t-test en el que es comparaven les set PV *JAK2V617F*-negatives amb les 34 *JAK2*-positives (24 *JAK2V617F*-positives heterozigotes, una *JAK2* exó 12-positiva i nou *JAK2V617F*-positives homozigotes). Es van identificar només dos gens, *CISH* i *SOCS2*, l'expressió dels quals era diferencial amb la presència de mutacions en el gen *JAK2* ($P < 0,05$). Com ja es va trobar en la TE, aquests gens tenien una major expressió en els pacients *JAK2*-positius.

Posteriorment, pensant que tot i que les diferències entre els pacients *JAK2*-negatius i positius eren poques podia haver-hi un efecte de la càrrega al·lèlica de la mutació *JAK2* en l'expressió, es va aplicar el test ANOVA d'un factor en els grups de pacients *JAK2*-negatius (set pacients), *JAK2*-positius en heterozigosi (25 pacients) i *JAK2*-positius en homozigosi (nou pacients). Aquesta anàlisi va identificar 21 gens diferencialment expressats entre els tres grups amb una F ratio > 5, que corresponien als gens: *AZIN1*, *IER3*, *ZNF217*, *FOSB*, *NBN*, *NFE2*, *SOD2*, *PFKB3*, *ETS2*, *TBCC*, *PRG1*, *B2M*, *DNAJA1*, *RBAF600*, *KLF5*, *SEC31L1*, *CD44*, *BTN2A2*, *ID2*, *DDX28*, *CKAP4*. Es va aplicar la mateixa anàlisi en el grup de 31 PV de les quals es disposava de les dades d'expressió dels vuit gens addicionals. El test ANOVA d'un factor va mostrar els gens *SOCS3* i *BATF* diferencialment expressats en els tres grups de pacients (F ratio > 7). L'agrupació dels 41 pacients segons l'expressió dels 23 gens diferencials es mostra en la Figura R17.

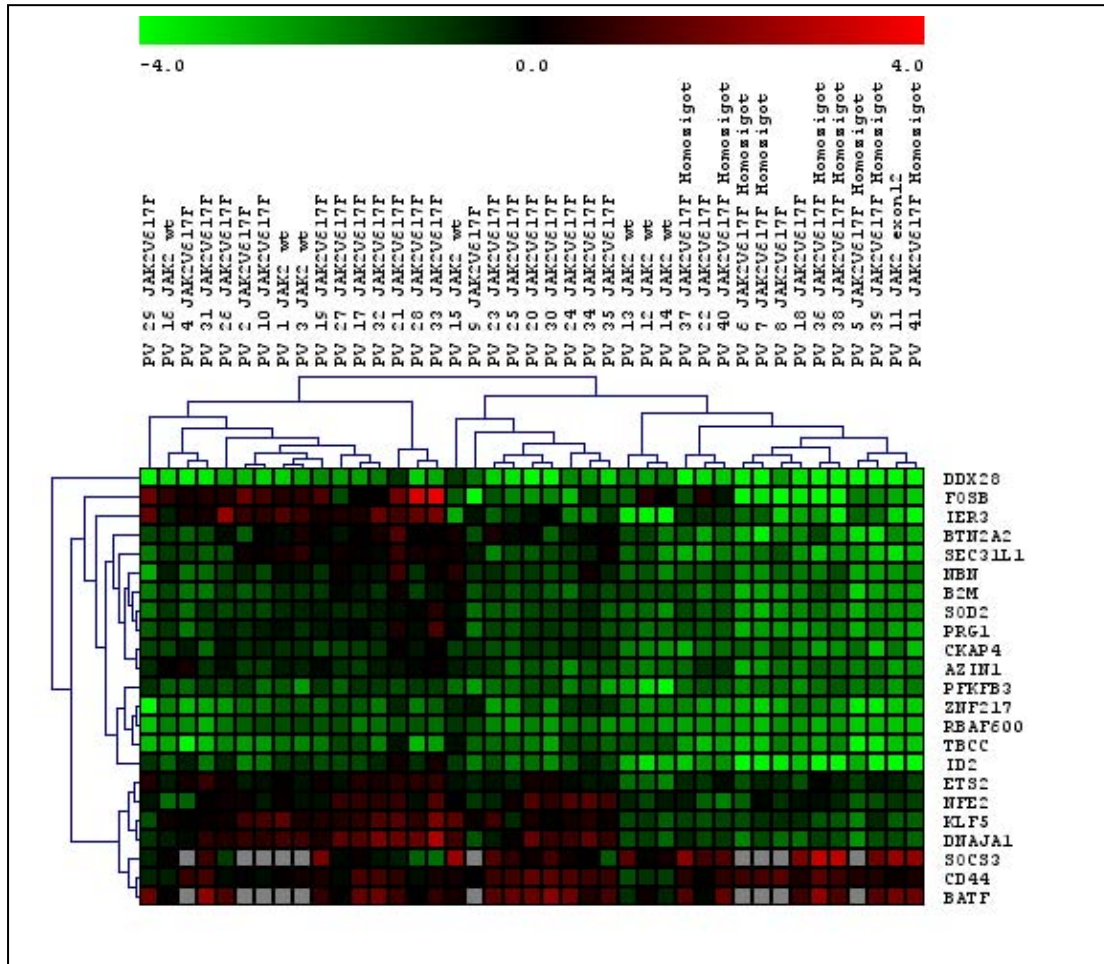


Figura R17. Dendrograma i heatmap (elaborat utilitzant la distància euclídea i el mètode del màxim) que ens representen l'agrupació dels 41 pacients amb PV segons l'expressió dels 23 gens diferencialment expressats entre els *JAK2*-negatius, *JAK2*-positius heterozigots i *JAK2*-positius homozigots. Els valors d'expressió corresponen al FC de cada pacient i el *pool* de controls. Les columnes representen els pacients i les files els gens. Els quadrats de color gris representen a assaigs dels quals no es disposa de dades.

4.2.3.3. Anàlisi comparativa de l'expressió en la trombocitèmia essencial i en la policitèmia vera en relació a les mutacions en el gen *JAK2*

Comparant els resultats anteriors de la PV en relació al gen *JAK2* amb els de la TE, en els que es van detectar un total de 35 gens diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius i positius, només coincideixen amb els trobats en els pacients amb PV els gens *IER3*, *FOSB*, *SOD2*, *RBAF600*, *KLF5* i *ID2*. Respecte

als vuit gens, els quals es trobaven diferencialment expressats en les 38 TE, només dos (*SOCS3* i *BATF*) ho eren en la PV. En la taula R8 es llisten alguns dels gens diferencials en alguna de les comparatives.

Taula R8. Expressió diferencial dels gens *FOSB*, *CD44*, *C13orf18*, *BATF*, *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1* entre els pacients TE i PV *JAK2V617F*-negatius (*JAK2wt*) i *JAK2V617F*-positius, i entre TE i PV. En **Blau** les comparatives amb un resultat estadístic significatiu ($P < 0,05$).

| | TE | | PV | | TE vs PV | |
|-----------------|--|---------|--|---------|-----------------|---------|
| | FC <i>JAK2 wt vs.</i> <i>JAK2V617F</i> | P valor | FC <i>JAK2 wt vs.</i> <i>JAK2V617F</i> | P valor | FC TE vs. PV | P valor |
| FOSB | 2,70 | 0,003 | 7,34 | 0,406 | 6,55 | <0,001 |
| CD44 | 0,84 | 0,172 | 0,46 | 0,057 | 0,67 | 0,014 |
| C13orf18 | 0,72 | 0,004 | 1,02 | 0,840 | 1,12 | 0,066 |
| BATF | 0,80 | 0,047 | 0,42 | 0,200 | 0,57 | 0,083 |
| CISH | 0,48 | 0,001 | 0,27 | 0,013 | 0,66 | 0,393 |
| SOCS2 | 0,48 | 0,051 | 0,07 | 0,005 | 0,54 | 0,434 |
| SOCS3 | 0,66 | 0,018 | 1,04 | 0,114 | 0,70 | 0,092 |
| PIM1 | 0,73 | 0,013 | 0,70 | 0,983 | 0,94 | 0,600 |

En la TE tots els gens, excepte el *FOSB* i el *CD44*, només s'han estudiat en 38 de les 57 TE

Tot i que la coincidència de gens entre la TE i la PV és baixa, sí que es detecta un comportament semblant de l'expressió d'aquests gens en relació a la càrrega al·lèlica de la mutació de *JAK2*. Aquest comportament es caracteritza per una major expressió dels gens en els pacients amb TE o PV *JAK2*-negatius, i una disminució progressiva en els *JAK2*-positius en heterozigosi i en homozigosi. En els gens de la via JAK-STAT aquest comportament està invertit. En la taula R9 es representen els nivells d'expressió dels gens *FOSB*, *CD44*, *BATF*, *C13orf18*, *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1*, en els pacients amb TE i PV segons l'estat de *JAK2*.

Taula R9. Expressió dels gens *FOSB*, *CD44*, *C13orf18*, *BATF*, *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1* entre els pacients TE i PV *JAK2V617F*-negatius (*JAK2 wt*) i *JAK2V617F*-positius. En **Blau** els gens diferencialment expressats ($P < 0,05$).

| | TE | | PV | | |
|------------------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------------|-----------|
| | <i>JAK2 wt</i> | <i>JAK2V617F</i> -positiu | <i>JAK2 wt</i> | <i>JAK2</i> -positiu | |
| | | | | heterozigot | homozigot |
| <i>FOSB</i> | ↑↑ | ↓ | ↑↑ | ↓ | ↓↓ |
| <i>CD44</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑↑ |
| <i>C13orf18</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |
| <i>BATF</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑↑ |
| <i>CISH</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |
| <i>SOCS2</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ |
| <i>SOCS3</i> | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑↑ |
| <i>PIM1</i> | ↓ | ↑ | — | — | — |

↑: gens sobreexpressats; ↓: gens infraexpressats, —: gen no alterat

A la vegada, utilitzant l'ANOVA d'un factor es van analitzar conjuntament les dades de les TE i les PV amb l'objectiu de trobar gens comuns relacionats amb l'estat de *JAK2*. Es van identificar 59 gens diferencials ($F \text{ ratio} > 5$), entre els pacients *JAK2*-negatius, *JAK2*-positius en heterozigosi i *JAK2*-positius en homozigosi. Entre aquest grup de gens s'hi troben el *FOSB*, el *CD44*, el *CISH*, el *SOCS2* i el *BATF*. Tots excepte el *SOCS2* ja ens sortien diferencials en la TE o en la PV independentment.

Per a determinar si existia una signatura gènica comuna en les TE i les PV *JAK2*-negatives es va realitzar un t-test entre aquests dos grups de pacients, el qual va mostrar molts gens diferencialment expressats (62 gens) i la majoria coincidents amb els 59 gens que ens diferenciaven els tres estats de *JAK2* de la comparativa anterior.

Entre els gens no diferencials entre les TE i les PV *JAK2*-negatives trobem el *CD44* i els gens de la via JAK-STAT excepte el *SOCS3*.

Paral·lelament es va crear un predictor de *JAK2V617F* conjunt pels pacients amb TE i PV el qual no contenia el gen *FOSB*, sinó que estava compost pels gens *CISH*, *SOCS3* i *LAMB3* amb una taxa d'error del 11,76% (Figura R18) i el model format només pel gen *CISH* amb una taxa d'error superior, del 17,65%.

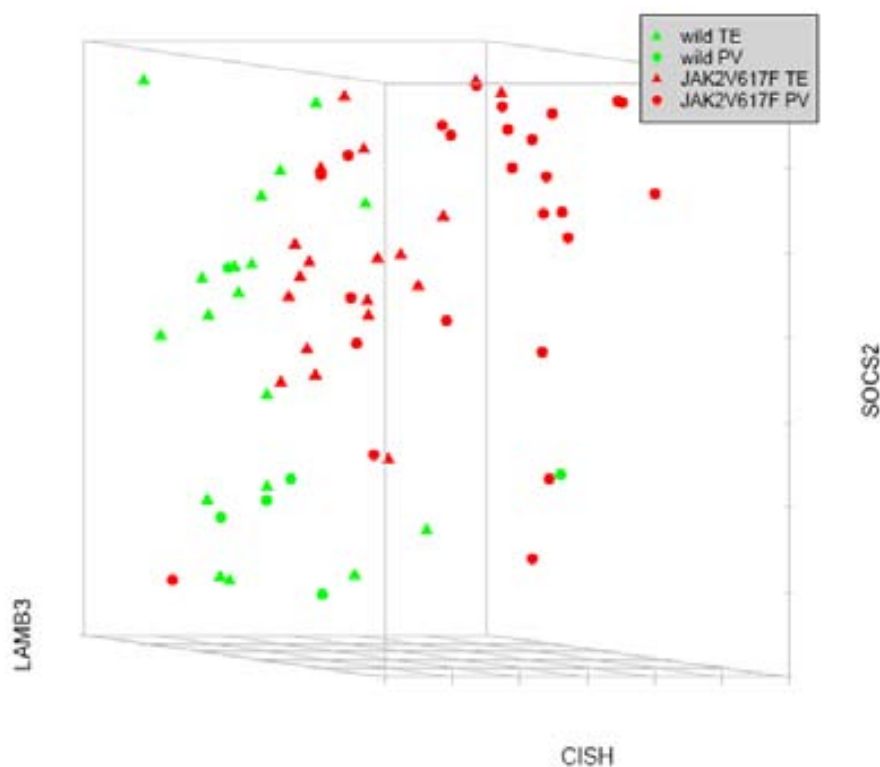


Figura R18. Diagrama que mostra l'expressió relativa dels gens *LAMB3*, *CISH* i *SOCS2* en relació al *pool* de controls. Aquests gens mostren una bona separació entre els dos grups de l'estat de *JAK2*.

4.2.3.4. El *FOSB* en la policitèmia vera

A l'analitzar l'expressió del *FOSB* en els pacients amb PV, els nivells d'expressió d'aquest gen eren també superiors en els pacients *JAK2*-negatius en comparació amb els *JAK2*-positius, tot i que les diferències no eren significatives (FC=7,34; P=0,406) (Figura R15, pàgina 189). Com en els pacients amb TE, els nivells d'expressió del *FOSB* eren superiors en els *JAK2*-negatius i disminuïen progressivament en els estats *JAK2*-positiu heterozigot i *JAK2*-negatiu homozigot, comparativa amb significància estadística. A més a més, l'expressió del *FOSB* ens permet no només discriminar els pacients *JAK2*-positius vs. *JAK2*-negatius, sinó que també ens diferencia entre la TE i la PV (Taula R8 i R9).

Es van realitzar diferents anàlisis d'associació amb variables clínic-biològiques de les 57 TE i les 41 PV. Es van obtenir resultats molt semblants als ja obtinguts només amb les 57 TE, entre els que es destaca l'associació de l'expressió del *FOSB*, junt amb l'expressió del *CD44* i el *PTGS2*, entre altres gens, amb els fenòmens trombòtics (P<0,05). Com en les TE, l'associació entre l'expressió del *FOSB* i de gens de la via JAK-STAT amb el eBFU-E estava clarament relacionada amb la presència de la mutació *JAK2V617F*, i no es detectava associació amb el eCFU-MK.

4.2.4. Anàlisi de l'expressió proteica del *FOSB* granulòcits de sang perifèrica de pacients amb trombocitèmia essencial

En l'anàlisi de l'expressió proteica del *FOSB* es van incloure 12 pacients amb TE (TE_FOSB 1-12), els quals no s'havien estudiat prèviament ni amb els microarrays d'expressió ni amb les TLDA. D'aquests pacients, cinc eren *JAK2V617F*-negatius (TE_FOSB 1-5) i set *JAK2V617F*-positius (TE_FOSB 6_12). També es van incloure cinc individus sans com a control de l'estudi (Control_FOSB 1-5), i la línia cel·lular K562 estimulada 24 i 48 hores amb TPA com a control positiu de l'expressió del *FOSB*.

4.2.4.1. Estudi del FOSB per immunocitoquímica

En l'estudi de l'expressió del *FOSB* en els neutròfils mitjançant la tècnica d'immunocitoquímica es va incloure també una biòpsia de mama com a control positiu de l'expressió del *FOSB*, junt amb la línia cel·lular K562 estimulada 48 hores amb TPA.

Es va valorar l'expressió del *FOSB* en els neutròfils de la SP segons tres nivells d'expressió: positivitat intensa, positivitat dèbil i no expressió i valorant 100 neutròfils. Una de les mostres control d'individu sa no era valorable per falta de mostra en l'extensió. Els resultats es mostren en la taula R11.

Taula R11. Resultats de l'expressió del *FOSB* en els neutròfils de sang perifèrica de pacients amb TE i en individus sans, segons tres nivells d'expressió i en relació a l'estat de *JAK2V617F*.

| | FOSB positiu intens | FOSB positiu dèbil | FOSB positiu | FOSB negatiu |
|--|---------------------|--------------------|--------------|--------------|
| TE <i>JAK2V617F</i> negatiu (n=5) | 0 (0-30) | 87 (0-100) | 16,5 (0-100) | 10 (0-100) |
| TE <i>JAK2V617F</i> positiu (n=7) | 0 (0-100) | 0 (0-60) | 0 (0-100) | 90 (0-100) |
| Controls (n=4) | 0 (0-0) | 10 (0-10) | 0 (0-10) | 90 (90-100) |

Els valors corresponen a la mediana del percentatge i el rang.

Els controls positius d'expressió del *FOSB* van mostrar una expressió elevada d'aquest gen. Concretament, la biòpsia de mama presentava una expressió nuclear del *FOSB* i una positivitat intensa en el 90% de les cèl·lules. Les cèl·lules K562 estimulades amb TPA presentaven una expressió citoplasmàtica i una positivitat del 90%, essent intensa en el 80% de les cèl·lules.

Respecte a l'expressió en els pacients amb TE i en els individus sans el *FOSB* s'expressava en el citoplasma. En els individus control l'expressió del *FOSB* era majoritàriament negativa. En els pacients amb TE l'expressió era molt variable, sobretot en els pacients *JAK2V617F*-positius. En els *JAK2V617F*-negatius la variabilitat dels resultats era elevada però perquè un dels cinc pacients estudiats no

expressava *FOSB* (TE_FOSB1) mentre que en la resta la positivitat era $\geq 90\%$. Així, tot i no ser estadísticament significatiu ($P > 0,05$) sí que s'observa una tendència a una major expressió del *FOSB* en els neutròfils dels pacients *JAK2V617F*-negatius. En la figura R19 es mostren les imatges de diferents mostres valorades.

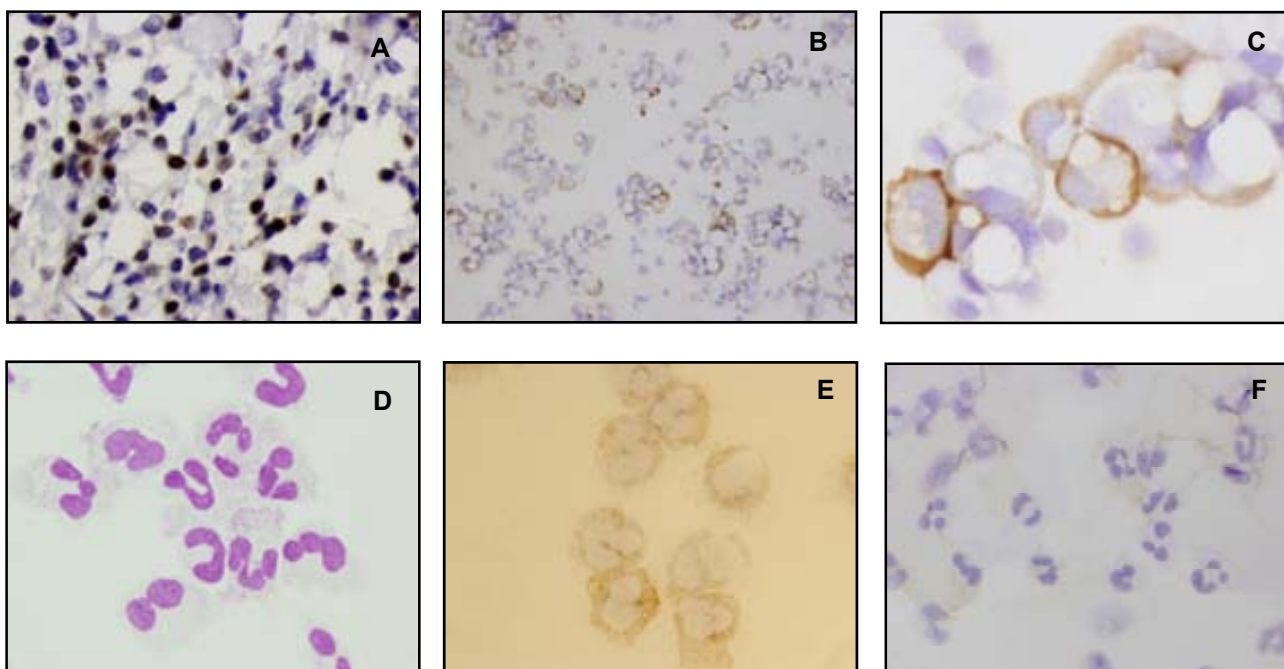


Figura R19. Imatges de l'expressió del *FOSB* en les diferents mostres estudiades. **A.** Biòpsia de càncer de mama (x500) amb positivitat del *FOSB* del 90%. **B.** Línia cel·lular K562 (x100) amb positivitat del *FOSB* del 90%. **C.** Línia cel·lular K562 a major augment (x1000). **D.** Tinció de May-Grünwald/Giemsa dels neutròfils del pacient TE_FOSB 5 (x1000). **E.** Neutròfils del pacient TE_FOSB 5 *JAK2V617F*-negatiu amb positivitat del *FOSB* del 90% (x1000). **F.** Neutròfils del pacient TE_FOSB 12 *JAK2V617F*-positiu sense expressió del *FOSB* (x1000).

4.2.4.2. Estudi del *FOSB* per Western Blot

En l'estudi de l'expressió del *FOSB* en els neutròfils mitjançant la tècnica de Western Blot es van incloure tres dels cinc controls (Control_FOSB 3-5) i tots els pacients estudiats per immunocitoquímica excepte els pacients TE_FOSB 6 i 11 *JAK2V617F*-positius per falta de mostra. Es van carregar diferents quantitats de proteïna de la

següent manera: 25 µg i 5 µg de la línia cel·lular K562, estimulada 24 hores amb TPA, i uns 75 µg dels controls i dels pacients. Es va analitzar també l'expressió de la proteïna ERK (ERK1 i ERK2), com a control d'expressió de proteïnes de la via de MAPK. Segons el treball de Blüml i cols. (2008) neutròfils en estat basal expressen ERK i quan els neutròfils s'estimulen amb TPA l'expressió d'ERK augmenta.

En la Figura R20 es mostren els resultats en els pacients i els individus control del FOSB i de l'ERK i de les proteïnes utilitzades com a controls endògens.

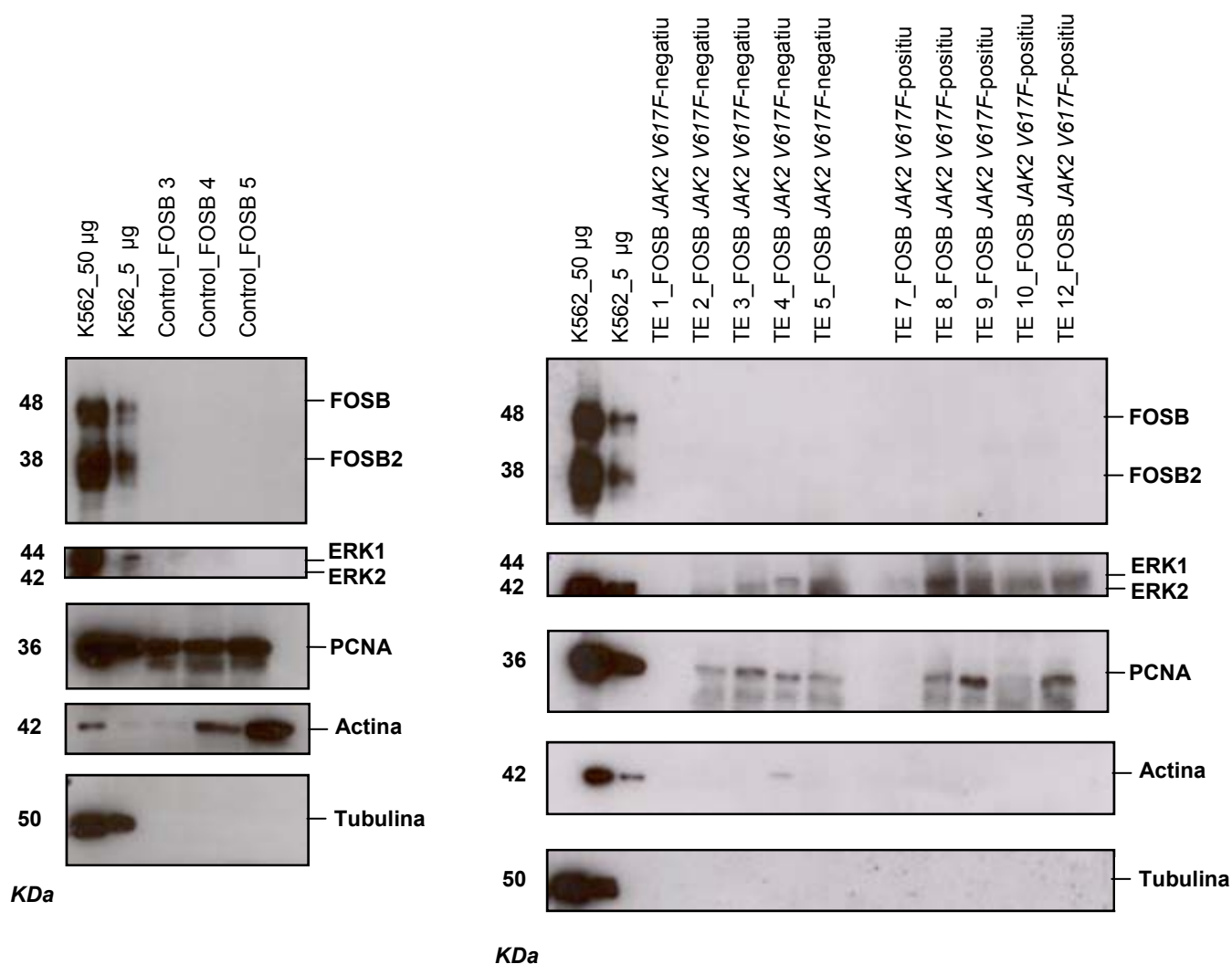


Figura R20. Resultats del Western Blot del gen *FOSB* i *ERK* i dels controls endògens PCNA, Tubulina i Actina, de la línia cel·lular K562 estimulada amb TPA, dels controls i dels pacients.

Com es pot observar en el Western Blot es detecta expressió del gen *FOSB* i de la seva forma d'*splicing* *FOSB2* en la línia cel·lular K562 estimulada amb TPA però no s'observa expressió d'aquesta proteïna ni en els controls ni en els pacients. L'expressió de l'ERK també només es detecta en la línia cel·lular K562 estimulada, però no en els pacients. A més a més, com s'observa en la figura R20, els nivells d'expressió d'ERK en les K562 diluïdes és molt menor. Al exposar més temps la membrana incubada amb ERK es detectava una lleugera expressió en el pacient TE 3_FOSB, que és l'únic pacient que mostra una banda definida corresponent al pes molecular de la proteïna.

Els controls endògens α -tubulina, α -actina i el PCNA utilitzats han mostrat expressió en la línia cel·lular K562 però en els pacients només s'ha observat expressió del PCNA. El fet que almenys el PCNA s'expressi en totes les mostres ens demostra que la tècnica s'ha realitzat correctament. La imatge del gel d'acrilamida, corresponent a les mostres dels pacients, tenyit amb la solució Ponceau confirma que la concentració de les proteïnes era correcta i que no estaven degradades (Figura R21).

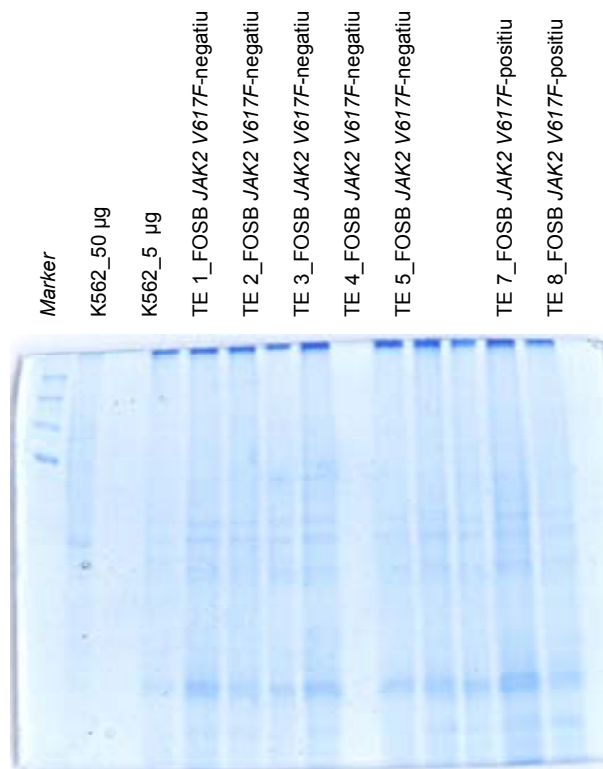


Figura R21. Gel d'acrilamida de la línia cel·lular K562 i dels pacients tenyit amb la solució de Ponceau. S'observen bandes definides que confirmen la integritat de les proteïnes.

5. DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha caracteritzat el perfil d'expressió gènica de la TE, utilitzant les tècniques de microarrays d'expressió i de RQ-PCR i els resultats obtinguts han aportat nous coneixements en la fisiopatologia d'aquesta malaltia. A més a més, l'anàlisi de la relació entre el patró d'expressió i la presència de la mutació *JAK2V617F* ha identificat mecanismes dependents i independents de la mutació. La comparació amb el perfil d'expressió de la PV i de TR ha permès identificar gens que podrien tenir una implicació en la patogènesi de la TE, especialment en les *JAK2V617F*-negatives.

5.1. PATRONS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL

5.1.1. La trombocitèmia essencial presenta un patró d'expressió caracteritzat per gens implicats en processos proinflamatoris

La signatura gènica descrita en el present treball correspondria al perfil d'expressió dels granulòcits dels pacients amb TE, ja que és el tipus cel·lular a partir del qual s'ha realitzat l'anàlisi. El fet que la TE tingui una naturalesa clonal heterogènia implica que en aquells pacients que tenen un marcador clonal conegut, com per exemple la mutació de *JAK2V617F*, només part dels granulòcits estaran afectats. Per aquest motiu, el patró d'expressió resultant és global i no específic de les cèl·lules clonals. A la vegada, pel fet que els pacients estudiats són no tractats, s'exclouen aquells canvis en l'expressió dels gens que poguessin estar induïts per la teràpia.

Els resultats obtinguts de l'estudi del transcriptoma dels granulòcits de SP en pacients amb TE, mitjançant microarrays d'expressió gènica, mostren un patró d'expressió homogeni en 17 dels 20 pacients analitzats, i clarament diferent del transcriptoma dels granulòcits d'individus control, suggerint que existeix una alteració de l'expressió gènica en tots els granulòcits dels pacients amb TE, tant si són clonals com si no.

L'anàlisi funcional dels gens diferencialment expressats respecte als individus control reflexa un perfil d'expressió de la TE caracteritzat principalment per gens implicats en la resposta inflamatòria, i aquesta dins un context d'activació cel·lular, de proliferació i d'antipoptosi característic de tot procés carcinogènic. Diferents autors (Coussens i cols. 2002; Mantovani i cols. 2010; Allavena i cols. 2011; Hasselbalch i cols. 2012) descriuen una relació entre inflamació i càncer, en la que el microambient de naturalesa inflamatòria afavoreix diferents processos relacionats amb la tumorigènesi. Els components inflamatoris del microambient inclouen leucòcits i citocines, la funció i l'expressió dels quals es troba desregulada i està dirigida per FT com l'NFkB. Aquest és el context en el que es defineix el perfil d'expressió detectat en el nostre grup de pacients amb TE.

A més a més, Hasselbalch i cols. (2012) suggereixen que l'estat d'inflamació crònica descrit en les NMP pot ser el responsable de la progressió de les NMP a un estadi avançat de mielofibrosi.

Estudis de microarrays d'expressió en neoplàsies mieloproliferatives

S'han realitzat diferents estudis del transcriptoma en pacients amb NMP, utilitzant microarrays d'expressió, en els que també s'ha descrit un perfil proinflamatori en aquest grup de malalties. Aquest perfil d'expressió s'ha detectat en diferents subtipus cel·lulars, com granulòcits i HSC procedents de la MO, i en totes les NMP Ph- (TE, PV i MP). Per a l'estudi de les HSC aquestes es separen utilitzant la positivitat d'expressió del marcador CD34, pel que s'anomenen cèl·lules CD34+. En la taula D1 es detallen els articles més rellevants realitzats en NMP utilitzant la tècnica de microarrays d'expressió.

Taula D1. Relació dels articles més rellevants en NMP utilitzant la tècnica de microarrays d'expressió. *Abreviatures:* GR: granulòcits; PQ: plaquetes.

| Publicació | Plataforma microarrays d'expressió | Nº gens o transcrits | Pacients | Tipus cel·lular o mostra | Anàlisis | Resultats |
|--------------------------------------|---|----------------------|--|---|---|--|
| Tenedini i cols. Blood 2004 | HGU133A (Affymetrix) | 18.400 | 5 TE | Megacariòcits derivats de cèl·lules CD34+ de MO | TE vs. Controls | Identificació de gens relacionats amb l'alteració de la megacariopoesi en la TE |
| Gnatenko i cols. Thromb Haemost 2005 | HGU133A (Affymetrix) | 18.400 | 20 TE | PQ | TE vs. Controls | Alteració de l'expressió dels gens <i>HSD17B3</i> i <i>HSD17B12</i> en la TE |
| Schwemmers i cols. Exp Hematol 2007 | Microarray d'ADNc no comercial | 7.497 | 16 TE (9 <i>JAK2V617F</i> i 7 <i>JAK2-wt</i>) | GR de SP | TE vs. <i>pool</i> controls TE <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | Gens diferencialment expressats entre pacients <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2-wt</i> |
| Puigdecanet i cols. Leukemia 2008 | Whole Genome 44K (Agilent Technologies) | >41.000 | 20 TE (10 <i>JAK2V617F</i> i 7 <i>JAK2-wt</i>) | GR de SP | TE vs. <i>pool</i> controls TE <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | Perfil proinflamatori en la TE Gens diferencialment expressats entre pacients <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2V617F</i> -negatius |
| Catani i cols. Leukemia 2009 | HGU133A (Affymetrix) | 18.400 | 16 TE (8 <i>JAK2V617F</i> i 8 <i>JAK2-wt</i>) | Cèl·lules CD34+ de MO | TE <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | No diferències d'expressió entre <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2-wt</i> en cèl·lules CD34+ de la TE |
| Gnatenko i cols. Blood 2010 | Microarray d'oligonucleòtids no comercial | 432 | 40 TE (24 <i>JAK2V617F</i> i 16 <i>JAK2-wt</i>) | PQ | TE vs. TR i controls <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | 11 gens diferencials TE vs. TR i controls 4 gens relacionats amb <i>JAK2V617F</i> |

| | | | | | | |
|---|--|---|---|--|---|---|
| Slezak i cols. J Transl Med 2009 | Human Genome Array-Ready Oligo Set v 4.0 (Operon) Microarray miRNAs no comercial | 39.600 trànscrits 827 miARNs madurs | 4 PV (3 <i>JAK2V617F</i> i 1 <i>JAK2-wt</i>) 2 TE (1 <i>JAK2V617F</i> i 1 <i>JAK2-wt</i>) | GR de SP i estimulació amb G-CSF | TE i PV vs. controls | Expressió diferencial de gens relacionats amb la inflamació (via NFkB) i infraexpressió miR-133a i miR-1. |
| Irino i cols. PLoS One 2011 | No microarrays, RQ-PCR (TLDA, Applied Biosystems) | 84 | 12 PV (9 <i>JAK2V617F</i> homozigot i 3 heterozigot) 14 TE (8 <i>JAK2V617F</i> i 6 <i>JAK2-wt</i>) | SP total | <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | Correlació expressió <i>SOCS3</i> i <i>SPI1</i> amb càrrega al·lèlica <i>JAK2V617F</i> |
| Boissinot i cols. Oncogene 2011 | Antibody cytokine arrays VI i VII (RayBiotech) | 120 | 58 PV (48 <i>JAK2V617F</i> i 10 <i>JAK2-wt</i>), 37 ES, 12 EI, 14 TE (5 <i>JAK2V617F</i> i 9 <i>JAK2-wt</i>) | Serum de SP i plasma de MO i eritroblastes de PV | PV vs. ES, EI i TE | Detecció en la PV de la sobreexpressió de citoquines inflamatòries proeritroides (<i>HGF</i> i <i>IL-11</i>) independentment de la mutació <i>JAK2V617F</i> |
| Pellagatti i cols. Cancer Res 2003 | Microarray d'ADNc no comercial | 6.000 | 11 PV | GR de SP | PV vs. Pool controls | Detecció de diferents funcions desregulades en la PV (inhibició apoptosi, activació neutròfil, etc.) |
| Goertler i cols. Br J Haematol 2005b | Microarray d'ADNc no comercial | 7.497 | 40 PV | GR de SP | PV vs. PS | 64 gens diferencials entre PV i PS. Sobreexpressió del gen <i>NFE2</i> en la PV |
| Steidl i cols. Ann NY Acad Sci 2005 | Atlas 1.2 I arrays (BD Biosciences Clontech) | 1.185 | 4 PV | Cèl·lules CD34+ de MO | PV vs. controls | Detecció de diferents funcions desregulades en les cèl·lules CD34+ de la PV (inhibició apoptosi, alteració de la via de l'àcid retinoic, etc.) |
| Kralovics i cols. Blood 2005 | HGU133A (Affymetrix) | 18.400 | 7 PV | GR de SP i estimulació amb G-CSF | PV vs. <i>Controls</i> PV <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | 15 gens diferencials entre PV i controls, amb alteració semblant a l'efecte per estimulació G-CSF Gens diferencialment expressats entre pacients <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2-wt</i> |

| | | | | | | |
|--|---------------------------------|---------|---|--|---|--|
| Laubach i cols. Exp Hematol 2009 | HGU133 Plus 2.0 (Affymetrix) | >47.000 | 14 PV (tots <i>JAK2V617F</i>) | Eritroblastes derivats de cèl·lules CD34+ de SP | PV vs. controls | Identificació de funcions alterades en l'eritropoesi de la PV (increment proliferació i resistència a l'apoptosi, activació via del RAS i PI3K) |
| Berkofsky-Fessler i cols. Clin Cancer Res 2010 | HGU133 Plus 2.0 (Affymetrix) | >47.000 | 9 PV (7 <i>JAK2V617F</i> i 2 <i>JAK2-wt</i>) | Cèl·lules CD34+ de MO LC amb sobreexpressió i inhibició <i>JAK2V617F</i> | PV vs. controls i <i>JAK2</i> PV <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | Gens dependents i independents de <i>JAK2V617F</i> |
| Jones i cols. Stem Cells 2005 | HGU95Av2 (Affymetrix) | 12.592 | 12 MP | Cèl·lules CD34+ de MO | MP vs. controls | Detecció de diferents gens amb expressió alterada en la MP (citoquines i factors de creixement i factors de creixement, entre altres) |
| Gluglielmelli i cols. Stem Cells 2007 | HGU133A (Affymetrix) | 18.400 | 15 MP | Cèl·lules CD34+ de MO i validat en GR de SP | MP vs. controls MP <i>JAK2V617F</i> vs. <i>JAK2-wt</i> | Identificació de gens relacionats amb la patogènesi de la MP i associació de l'expressió del gen <i>WT1</i> amb pronòstic Gens diferencialment expressats entre pacients <i>JAK2V617F</i> -positius i <i>JAK2-wt</i> |

En relació als diferents tipus cel·lulars en els quals s'han realitzat estudis de microarrays d'expressió cal destacar que pocs autors han estudiat el transcriptoma en les plaquetes (Gnatenko i cols. 2005 i 2010), tipus cel·lular que tindria molt d'interès especialment en la TE, per la seva implicació en la malaltia. Aquest fet és degut, segurament, a que és molt difícil treballar amb les plaquetes sense que aquestes s'activin. Llavors el transcriptoma que s'obtingria no seria real, sinó reflex de la seva manipulació.

En l'anàlisi dels granulòcits i de les cèl·lules CD34+, els diferents autors convergeixen en la identificació d'un perfil caracteritzat principalment per una sobreexpressió de diverses citocines, especialment interleucines i quimocines. Tenedini i cols. (2004) van ser els primers autors que van definir el transcriptoma de les cèl·lules progenitores CD34+ procedents de la MO de pacients amb TE, utilitzant la plataforma de microarrays d'Affymetrix HGU133A. Van detectar un increment d'expressió de diferents citocines que podien estar implicades en la proliferació i diferenciació megacariocítica. Steidl i cols. (2005) van estudiar per primera vegada el transcriptoma del mateix tipus cel·lular de pacients amb PV, utilitzant la plataforma Atlas 1.2 I de Clontech en la que s'analitzava un nombre reduït de gens (1.185). Aquests autors també van observar una sobreexpressió de citocines i factors de creixement, entre altres funcions rellevants, en les cèl·lules CD34+ de la PV. Posteriorment, Jones i cols. (2005) i Gluglielmelli i cols. (2007) van estudiar el mateix tipus cel·lular en pacients amb MP, detectant també una sobreexpressió d'un grup de citocines i factors de creixement. Gluglielmelli i cols. (2007) van validar els resultats en granulòcits de les MP. Així, en tots aquests estudis en els quals s'examina el perfil d'expressió de cèl·lules progenitores s'obtenen resultats semblants als nostres, obtinguts en cèl·lules madures.

Un estudi que es centra directament en l'anàlisi de les citocines dels pacients amb NMP és el realitzat per Boissinot i cols. (2011), en el que s'utilitza un microarray d'anticossos dirigit i en el que s'analitza el sèrum i el plasma procedent de la MO de

principalment pacients amb PV. Es detecta un perfil proinflamatori en aquest grup de pacients.

El perfil proinflamatori observat en les neoplàsies mieloproliferatives és independent de la presència de la mutació JAK2V617F

Altres treballs, juntament amb el nostre (Puigdecanet i cols. 2008), analitzen el transcriptoma global dels pacients amb NMP però també les diferències d'expressió entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius. En tots els estudis en que es realitza aquesta comparativa s'identifiquen gens l'expressió dels quals és dependent de la presència de *JAK2V617F* però també un grup important de gens que formen part del perfil proinflamatori prèviament descrit, l'expressió dels quals és independent de la mutació. El primer treball publicat és el de Kralovics i cols. (2005c) on detecten gens diferencialment expressats entre els granulòcits de SP de pacients amb PV i controls, alguns dels quals es correlacionen amb la presència de la mutació *JAK2V617F*. Posteriorment trobem el nostre treball (Puigdecanet i cols. 2008) i en paral·lel el realitzat per Schwemmers i cols. (2007), en el que també estudien l'expressió de granulòcits de SP de pacients amb TE. Aquests autors obtenen uns resultats molt semblants als nostres, també identificant una sobreexpressió de gens relacionats amb processos inflamatoris. En l'estudi de Boissinot i cols. (2011) el perfil proinflamatori observat en la PV tampoc es relaciona amb la presència de la mutació *JAK2V617F*. En un altre treball, en el qual utilitzen la plataforma d'Affymetrix HGU133A, Berkofsky-Fessler i cols. (2010) també investiguen els gens dependents i independents de *JAK2V617F* en cèl·lules CD34+ procedents de la MO de pacients amb PV. Dins el subgrup de gens amb comportament independent de la mutació s'inclouen aquells relacionats amb la resposta inflamatòria, creixement cel·lular i proliferació i amb el desenvolupament del sistema hematopoètic. Totes aquestes funcions són comunes amb les identificades en la nostra anàlisi, en granulòcits de pacients amb TE.

Implicació de la via NkB en el perfil proinflamatori observat en les neoplàsies mieloproliferatives

En el treball de Slezak i cols (2009), en el que analitzen el perfil gènic i de miARNs dels granulòcits de pacients amb PV i TE, és en el que es reflecteix més clarament la implicació de la via del gen *NFkB* en aquest grup de malalties. El nostre estudi també demostra una alteració de la via NFkB, i de manera semblant als resultats de Slezak i cols (2009), es detecta la sobreexpressió de gens activadors i inhibidors de la via. Tot i que l'expressió d'aquests gens no suggereixen una activació clara de la via NFkB, en l'anàlisi dels FT que podien estar afectats sí que es va confirmar aquesta activació. Així, aquests resultats apunten a que l'alteració de la via NFkB és important en la patogènesi de les NMP. Aquesta afirmació es recolza en el fet que aquesta via es desregula també durant la mobilització i activació dels granulòcits degut al tractament amb G-CSF (Slezak i cols. 2009) i amb la presència de la translocació *BCR/ABL* en estudis d'expressió en la línia cel·lular K562 (Hakansson i cols. 2008). Una altra evidència de la importància de la via NFkB en les NMP és l'estudi de Friedman i cols. (2007) en el que descriuen l'*NFkB* com a regulador de la resposta inflamatòria en granulòcits i monòcits i com a un element determinant, junt amb múltiples FT entre els que trobem el *FOS*, en la determinació de línia durant la diferenciació hematopoètica. Hasselbalch i cols. (2012) han descrit recentment que NFkB és una via de senyalització comú en els processos d'inflamació crònica i càncer. Aquest fet ens confirma la hipòtesi exposada anteriorment, en la que el perfil proinflamatori observat en les NMP, en el que trobem l'activació de la via NFkB entre altres, pot contribuir a la patogènesi d'aquestes malalties.

Inhibició de l'apoptosi en les neoplàsies mieloproliferatives

En alguns treballs s'observa també una desregulació de l'apoptosi, que explicaria l'acumulació de cèl·lules mieloides en els pacients amb NMP Ph-. Tot els estudis detecten una sobreexpressió de gens antiapoptòtics o infraexpressió de gens proapoptòtics que ocasiona una inhibició de l'apoptosi. La majoria són treballs realitzats en la PV, en cèl·lules CD34+ de MO (Steidl i cols. 2005) o de SP (Laubach i cols. 2009) i en granulòcits de SP (Pellagatti i cols. 2003). Tenedini i cols. (2004) són els únics autors que han descrit una alteració de l'apoptosi en pacients amb TE, detectant una inhibició de l'apoptosi en la megacariopoesi d'aquests pacients que explicaria l'acumulació de megacariòcits en la TE. En el nostre treball no s'evidencia una desregulació de l'apoptosi però sí que la detecció de l'activació de la via NFκB suggereix que també existeix una inhibició de l'apoptosi en els neutròfils dels pacients amb TE estudiats. (Hasselbalch i cols. 2012). Tot i així, en altres estudis ja citats no es descriu una alteració en l'apoptosi en pacients amb NMP Ph-.

La discrepància entre els diferents estudis de microarrays d'expressió és evident en tots els camps científics. Concretament, en l'estudi de les NMP Ph- la divergència dels resultats es pot justificar no només per les limitacions de la tècnica de microarrays com l'ús de plataformes de microarrays diverses, sinó també perquè en una mateixa malaltia s'estudien subtipus cel·lulars diferents i pacients en estadis clínics diferents, alguns dels quals havien rebut tractament.

No obstant, com ja s'ha exposat en relació als treballs realitzats en NMP Ph-, sí que s'observen alguns resultats molt semblants. En tots els estudis de microarrays s'observa un patró d'expressió comú i independent d'un marcador clonal (com *JAK2V617F*), de manera que tot apunta a que el perfil proinflamatori detectat en les NMP és independent, principalment, de l'adquisició de *JAK2V617F*. Probablement l'alteració genètica causant de la sobreexpressió de les citocines en les NMP no és l'esdeveniment iniciador però sí un esdeveniment paral·lel que apareix amb freqüència i independentment de la mutació *JAK2V617F*. Aquesta afirmació és consistent amb els

articles recents en els que fàrmacs anti-JAK2, particularment els que no són específics de JAK2, disminueixen d'una manera eficient els nivells de citocines i els símptomes associats a la inflamació, com esplenomegàlia, febre i pèrdua de pes, sense afectar a la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* (Tefferi i cols. 2011). Per tant, els efectes dels inhibidors de JAK2 reflexen més el potencial anti-inflamatori que no el seu efecte anti-tumoral.

Malgrat tot, l'alteració de l'expressió de les citocines observada en les NMP sí que pot ocasionar un efecte semblant a la *JAK2V617F*, provocant una desregulació de les seves vies de senyalització, com la via JAK-STAT, i originar la proliferació anormal de cèl·lules hematopoètiques característica d'aquestes malalties. Així, coneixent la relació entre inflamació i càncer, en el desenvolupament de fàrmacs dirigits a marcadors inflamatoris, les diferents citocines i FT identificats en el nostre estudi podrien representar bones dianes terapèutiques.

5.1.2. Comparació de l'expressió de gens concrets amb els descrits a la literatura

Si analitzem l'expressió de gens concrets, obtinguda en l'anàlisi dels gens en la TLDA en els 57 pacients amb TE, i els comparem amb els resultats descrits en la literatura alguns d'ells ja són coneguts i d'altres no.

Respecte als gens *NFE2* i *ANKRD15*, els quals es van afegir en el llistat de gens a estudiar amb les TLDA pel fet que s'havia descrit una sobreexpressió de *NFE2* (Goertler i cols. 2005; Guglielmelli i cols. 2007), en la PV i en la MP, i una infraexpressió d'*ANKRD15* (Kralovics i cols. 2005c) en la PV, no es va observar una expressió aberrant en la TE, amb valors d'expressió semblants als controls. No obstant, sí que es va detectar una alteració de l'expressió dels gens diana del FT *NFE2L2*.

Un resultat que confirma dades prèviament publicades en la PV per Pellagatti i cols. (2003) és la sobreexpressió del gen *CD44* en la nostra sèrie de TE. El *CD44* és una

molècula d'adhesió implicada en el contacte cèl·lula-cèl·lula entre les cèl·lules progenitores i les cèl·lules de l'estroma. En conseqüència, la seva funció pot ser important en l'hematopoesi, en la proliferació de cèl·lules progenitores i en la diferenciació mieloide (Moll i cols. 1998), així com en la fisiopatologia de la fibrosi de la MO (Rameshwar i cols. 1998).

Altres FT, *ETS1* i *GATA3*, els gens diana dels quals presentaven una expressió alterada en les dades dels microarrays d'expressió, són gens relacionats clarament amb l'hematopoesi. Tot i que no s'ha descrit l'alteració de la seva expressió en altres treballs en NMP sí que s'ha detectat una sobreexpressió de gens de la mateixa família, com són el gen *GATA2* en cèl·lules CD34+ procedent de SP de pacients amb MP (Jones i cols. 2005), i de la família dels *ETS*, el gen *PU.1* en SP de pacients amb NMP (Iriño i cols. 2011) i el gen *ETS2* en granulòcits de SP de pacients amb PV (Pellagatti i cols. 2003; Kralovics i cols. 2005c).

5.1.3. Detecció de subpatrons d'expressió en la trombocitèmia essencial

A l'estudiar l'expressió d'un grup reduït de gens, que corresponen als gens més diferencialment expressats en els microarrays d'expressió, en un grup més ampli de pacients i utilitzant la plataforma TLDA 1, es confirma el patró d'expressió observat per microarrays d'expressió. Aquest es caracteritza per la sobreexpressió de gens implicats en la resposta immunològica. A més a més, també s'ha confirmat l'expressió de gens relacionats amb funcions de granulòcits com la seva quimiotaxi, adhesió i activació. Aquests resultats suggereixen que existeix un fenotip d'activació de les funcions dels granulòcits en la TE, i són corroborats per diferents treballs en la TE i en la PV ens els que també estudien el transcriptoma o bé analitzen marcadors específics d'activació.

Detecció d'un fenotip d'activació en els granulòcits dels pacients amb neoplàsies mieloproliferatives

Entre els treballs d'estudi d'expressió global trobem el realitzat per Pellagatti i cols. (2003), un dels primers estudis de microarrays d'expressió en NMP. Aquest autor analitza l'expressió de 6.000 gens en granulòcits de SP de pacients amb PV i ho compara amb un *pool* d'individus control. En aquesta comparativa detecta un nombre important de gens sobreexpressats, part dels quals coincideixen amb els gens expressats en un neutròfil activat per G-CSF. Entre ells trobem els gens *CD44*, *CD48* i *ETS2*. Posteriorment, Kralovics i cols. (2005c) també han correlacionat el perfil d'expressió obtingut en granulòcits de SP de pacients amb PV amb el dels granulòcits activats, després de l'estimulació amb G-CSF.

Altres autors han observat un fenotip d'activació en granulòcits de pacients amb TE estudiant marcadors específics i ho han relacionat amb l'origen dels fenòmens trombòtics característics d'aquesta malaltia. El primer treball, desenvolupat per Falanga i cols. (2007), va descriure un fenotip d'activació de neutròfil en la TE i la PV, estudiant entre altres el marcador CD11b per citometria de flux. Aquests autors proposaven que els leucòcits exercien un paper en els processos trombòtics de la TE. Per altra banda, Arellano i cols. (2006 i 2009) també havien descrit un fenotip d'activació dels monòcits i les plaquetes en pacients amb TE que havien patit fenòmens trombòtics. Aquesta relació es podria explicar amb la hipòtesi que els leucòcits i les plaquetes activats poden participar en el reclutament de receptors d'adhesió i en l'alliberació de proteases o citocines que contribueixen a la lesió local de l'endoteli i en l'activació de la coagulació. A més, Falanga i cols. (2005) també van descriure una relació entre l'activació d'aquests tipus cel·lulars amb la formació de complexos leucòcit-plaqueta, fenomen que també contribueix a la trombosi en aquest grup de pacients.

Hasselbalch i cols. (2012) afirmen que l'estat d'inflamació crònic és el responsable de l'activació dels leucòcits, plaquetes i cèl·lules endotelials. Així, aquests autors

relacionen directament dues característiques de les NMP, la inflamació i el risc trombòtic.

Subpatrons d'expressió en la TE obtinguts en el nostre treball

Tot i confirmar-se el patró d'expressió homogeni observat en els microarrays d'expressió, l'anàlisi d'agrupació de les dades va mostrar una classificació en dos grups principals de pacients, anomenats grup A i grup B (Figura R8, pàgina 168 i Figura R14, pàgina 184). És destacable que alguns dels gens sobreexpressats en el grup A, en relació amb el grup B, estan implicats en la resposta immunològica i en el fenotip d'activació del neutròfil. En l'anàlisi d'agrupació de les 57 TE el grup A incloïa tres dels sis pacients que havien patit complicacions trombòtiques, i el grup B.1 la resta de 3 pacients. Així, considerant el què s'ha descrit a la literatura i que el grup A, i en menor grau el grup B.1, es caracteritza per un patró d'expressió de neutròfil activat podem hipotetitzar que aquest fenotip pot afectar els mecanismes de la trombosí. No obstant, el nombre de pacients que han patit complicacions trombòtiques és massa reduït i caldria validar aquests resultats analitzant l'expressió d'aquest grup de gens en una sèrie més àmplia de pacients

Per altra banda, el fet que existeixi un grup de pacients (grup B) amb un patró d'expressió lleugerament diferent fa pensar que existeixen altres mecanismes, que no poden ser descrits solament per una activació de les resposta immunològica descrita en els pacients del grup A, que també condicionen l'expressió de gens que condueixen a la manifestació de la mateixa malaltia. Un exemple clar és la disminució progressiva de l'expressió d'un grup de gens associats a la resposta immunològica, des de la seva sobreexpressió en el grup A fins a la infraexpressió en el grup B.2. És destacable que la gran majoria de pacients del grup B són portadors de la mutació *JAK2V617F* (el 70,4% (19/27) són *JAK2V617F*-positius), fet que apunta a un efecte d'aquesta mutació en l'expressió gènica, tema que tractarem en el següent apartat de la Discussió.

5.2. PATRONS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA TE EN RELACIÓ A *JAK2V617F*

5.2.1. La trombocitèmia essencial presenta un patró d'expressió dependent de l'estat de la mutació *JAK2V617F*

L'anàlisi supervisada de les dades de microarrays d'expressió i de les TLDA ha mostrat gens diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius. Diferents estudis del transcriptoma també han observat una expressió dependent de la presència de *JAK2V617F* en pacients amb NMP (Kralovics i cols. 2005c; Schwemmers i cols. 2007; Berkofsky-Fessler i cols. 2010; Irino i cols. 2011). L'expressió diferencial es detecta tant en granulòcits de SP (Kralovics i cols. 2005c; Schwemmers i cols. 2007), com en SP total (Irino i cols. 2011). No obstant, la detecció en cèl·lules CD34+ procedents de MO no és tan clara. Catani i cols. (2009) van realitzar una anàlisi de microarrays d'expressió en cèl·lules progenitores CD34+ procedents de pacients amb TE. En el seu estudi no van detectar diferències d'expressió gènica entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius. Els autors suggerien que la mutació *JAK2V617F* no altera l'expressió en el compartiment cel·lular CD34+ de la TE. Moliterno i cols. (2008) van detectar una càrrega al·lèlica menor en les cèl·lules CD34+ en comparació amb els granulòcits de SP dels mateixos pacients, en TE i PV. Per tant, com suggerien Catani i cols. (2009) es pot hipotetitzar que la menor càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* present en les cèl·lules CD34+ de la TE no és suficient per alterar l'expressió gènica, a diferència del que succeeix en els granulòcits, en les que es detecta una expressió diferencial segons l'estat de *JAK2V617F* (Kralovics i cols. 2005c; Schwemmers i cols. 2007, Puigdecanet i cols. 2008). No obstant, posteriorment Berkofsky-Fessler i cols. (2010) sí que van identificar grups de gens dependents i independents de *JAK2V617F*, en cèl·lules CD34+ de pacients amb PV. Es pot pensar que en les cèl·lules CD34+ de les PV la càrrega al·lèlica és major i en conseqüència afecta en major grau l'expressió gènica d'aquestes cèl·lules.

Concretament en el nostre treball, l'anàlisi supervisada de les dades de microarrays d'expressió juntament amb les dades de RQ-PCR segons les plataformes TLDA1 i TLDA2 i ampliant l'estudi amb més pacients amb TE, va identificar un total de 46 gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius.

En conjunt, aquests resultats corroboren la hipòtesi que existeix un efecte de l'estat mutacional de *JAK2V617F* en el patró d'expressió dels granulòcits dels pacients amb TE.

Afectació de l'expressió dels gens inhibidors de la via JAK-STAT

Entre el grup de gens diferencials trobem els gens *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1*, els quals es troben sobreexpressats en els pacients *JAK2V617F*-positius i actuen com a reguladors negatius de la via de senyalització JAK-STAT (Peltola i cols. 2004; Hakanson i cols. 2008). Diferents treballs han descrit també una sobreexpressió d'aquest grup de gens en els pacients amb TE i PV *JAK2V617F*-positius, principalment del *SOCS3* observat per Kralovics i cols (2005c) i per Irino i cols. (2011).

L'estudi de Schwemmers i cols. (2007) és un treball molt semblant al que hem realitzat nosaltres i el qual es va publicar pocs mesos abans que el nostre. Estudien un sèrie de 16 pacients amb TE (9 *JAK2V617F*-positius i 7 *JAK2V617F*-negatius) i analitzen el perfil d'expressió de granulòcits de SP, en comparació amb un pool de 50 individus sans. Utilitzen una plataforma no comercial de microarrays d'ADNc en la que analitzen un nombre reduït de gens (7.497 gens) en comparació amb el nostre estudi, en el que vam estudiar 41.000 trànscrips. Aquests autors descriuen un patró d'expressió diferencial de 27 gens en relació a l'estat de *JAK2V617F* amb una sobreexpressió dels gens inhibidors de la via JAK-STAT *SOCS2* i *PIM1*. El nostre treball confirma l'expressió diferencial de *SOCS2* i *PIM1* publicada per Schwemmers i cols. (2007) i és el primer que descriu una diferència d'expressió dels gens *CISH* i *SOCS3* entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius.

Els gens *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1*, els quals trobem diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius, formen part de la via JAK-STAT (Ward i cols. 2000). El *CISH*, *SOCS2* i *SOCS3* són membres de la família SOCS que s'activen per les STATs (*signal transducers and activators of transcription*). Aquests tres gens, junt amb el *PIM1*, actuen com a reguladors negatius de la via de senyalització JAK-STAT (Peltola i cols. 2004; Hakanson i cols. 2008).

La via JAK-STAT s'activa en resposta a la unió de les citocines als seus receptors, els quals dimertitzen i canvien la conformació. En el domini intracel·lular de cada receptor s'hi troba unit una molècula tirosin cinasa JAK2. La dimerització del receptor causa un canvi en la conformació també de la JAK2 exposant els dominis cinasa, els quals es transfosforilen i s'activen. Les JAK2 actives fosforilen residus del receptor en els que s'hi uniran les STATs, que estaven lliures al citoplasma. Les STATs dimeritzen i es transloquen al nucli, on actuen com a FT que activen l'expressió gènica de diversos gens. Entre els gens transcrits trobem els gens de la família SOCS, que exerceixen un paper inhibidor de la via per tal de regular la seva activació (O'Sullivan i cols. 2007).

Els membres de la família SOCS utilitzen diferents mecanismes per a inhibir la via JAK-STAT (Figura D1):

1. Unió als residus fosforilats del receptor, bloquejant el reclutament de transductors de senyal, com els STATs, al receptor. Aquest és el mecanisme del *CISH*.
2. Unió al JAK o als receptors per inhibir específicament l'activitat tirosin cinasa de la JAK. Aquest és el mecanisme del *SOCS1* i *SOCS3*. Ambdós gens s'uneixen al gen *JAK2*.
3. Participació en la ubiquitinització de la JAK i, probablement, dels receptors, facilitant la seva degradació pel proteasoma.

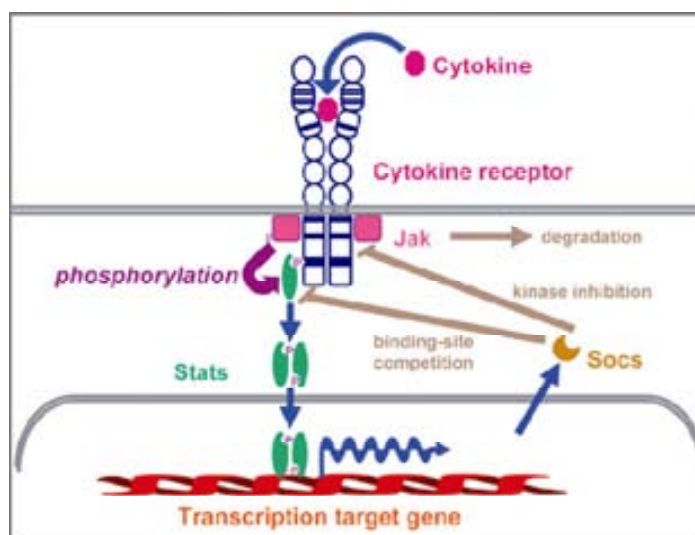


Figura D1. Esquema de la via JAK-STAT-SOCS (O'Sullivan i cols. 2007).

La mutació *JAK2V617F* ocasiona una activació constitutiva de la via de JAK-STAT en les cèl·lules hematopoètiques (Baxter i cols. 2005; James i cols. 2005; Kralovics i cols. 2005a; Levine i cols. 2005a) i en conseqüència activa diferents sistemes de *feedback* negatiu, principalment els que inclouen membres de la família SOCS. Aquests actuen com a supressors tumorals, intentant inhibir l'efecte oncogènic de la *JAK2V617F* (Cooney i cols. 2002), però sembla que el sistema de regulació és ineficient i no aconsegueixen controlar la sobreactivació de la via JAK-STAT.

L'activació del *feedback* negatiu en la via JAK-STAT explicaria l'augment d'expressió dels gens *SOCS2* i *SOCS3* detectada en els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius. L'expressió disminuïda d'aquests mateixos gens en les TE *JAK2V617F*-negatives confirmaria que la via JAK-STAT no es troba sobreactivada en aquests pacients. Els resultats d'expressió dels gens *CISH* i *PIM1* són més difícils d'explicar. El fet que l'expressió d'aquests dos gens és similar en les TE *JAK2V617F*-positives i en els controls podria ser conseqüència d'una alteració en l'expressió o en l'equilibri del sistema de *feedback* negatiu de la via JAK-STAT. Amb tot, s'han descrit altres mecanismes que poden alterar els nivells d'expressió dels gens inhibidors de la via JAK-STAT i que podrien explicar l'expressió disminuïda dels gens *CISH* i *PIM1*

detectada en el nostre treball. Entre els mecanismes descrits destaquem la hipermetilació de les regions promotores d'aquests gens, que en bloqueja la seva transcripció i expressió. Existeixen nombrosos estudis que detecten hipermetilació d'aquesta família de gens en diferents malalties hematològiques i majoritàriament de la línia mieloide. Concretament, en les NMP diferents autors han descrit una hipermetilació dels gens *SOCS1*, *SOCS2* i *SOCS3* (Jost i cols. 2007; Capello i cols. 2008; Teofili i cols. 2008; Barrio i cols. 2011), tant en els pacients portadors de la mutació *JAK2V617F* com en els *wt*. En conseqüència, aquests autors suggereixen que la hipermetilació d'aquests gens pot ser un mecanisme complementari a les mutacions en el gen *JAK2*, en aquells pacients que són portadors de la mutació, o bé que la hipermetilació és el mecanisme responsable de la desregulació de la via JAK-STAT, amb efectes similars als que ocasionen les mutacions en *JAK2*, en aquells pacients que no presenten la mutació.

Per últim, cal tenir en compte que existeixen altres mecanismes que també poden condicionar l'expressió o la funcionalitat dels gens inhibidors de la via JAK-STAT, tant de la família SOCS com d'altres famílies inhibidores de la via, com la de les *protein inhibitor of activated STAT* (PIAS) i la de les fosfotirosines fosfatases (SHP, CD45, PTP1B/TC-PTP). Un dels mecanismes és la presència de mutacions en diferents gens descrites recentment en les NMP, com les de *SH2B3* (*LNK*) que inactiven la funció inhibidora del gen (Oh i cols. 2010). L'altre mecanisme descrit és la hiperfosforilació d'aquests components, com la descrita per Hookham i cols. (2007) en el gen *SOCS3*, que és causada per les mutacions a *JAK2* i que impedeix l'efecte inhibidor de la via.

L'alteració de la regulació de la via JAK-STAT es relaciona amb l'origen de diferents tipus de càncer (Slattery i cols. 2011) i clarament en la patogènesi d'algunes neoplàsies hematològiques. Com s'ha descrit en aquest apartat, es coneix que la desregulació d'aquesta via pot ser causada no només per les mutacions descrites en el gen *JAK2*, sinó també per alteracions presents en els inhibidors de la via JAK-STAT.

Aquestes alteracions poden ser de diversos tipus i afectar a diferents components, però totes deriven en una activació constitutiva de la via amb un efecte proliferatiu comú. Aquesta consideració és especialment rellevant en els pacients no portadors de mutacions en el gen *JAK2*.

Afectació de l'expressió de gens independents de la via JAK-STAT

A part dels gens inhibidors de la via JAK-STAT, en el nostre estudi s'han identificat altres gens diferencials entre els pacients *JAK2V617F*-positius vs. *JAK2V617F*-negatius (Taula R3, pàgina 149 i Taula R5, pàgina 173). Entre ells trobem part dels gens implicats en la resposta immunològica i en l'hematopoesi, els quals ja es trobaven sobreexpressats en l'anàlisi de microarrays d'expressió i TLDA. Curiosament, la majoria d'aquests gens presentaven una major expressió en els pacients no portadors de *JAK2V617F*. Aquest fet es correlaciona amb el patró d'expressió observat en el grup B, en el qual gran part dels pacients eren *JAK2V617F*-positius, i es caracteritzava per una expressió disminuïda d'alguns dels gens, en relació amb el grup A.

Aquests resultats demostren que la mutació *JAK2V617F* no només afecta a membres de la via JAK-STAT, sinó també a altres gens que formen part d'altres vies de senyalització les quals es coregulen i participen en processos cel·lulars similars, com serien principalment la resta de vies de senyalització de les citocines.

5.2.2. Correlació de la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* amb l'expressió gènica de la trombocitèmia essencial

L'anàlisi de correlació de les dades de TLDA de les 57 TE va identificar 14 gens l'expressió dels quals s'alteraven depenent de la dosi de *JAK2V617F* (Taula R6, pàgina 180). Aquests fets suggereixen que existeix un efecte de càrrega al·lèlica en l'expressió gènica dels granulòcits dels pacients amb TE.

En paral·lel, com ja s'havia observat en l'anàlisi dels gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2V617F*-negatius i *JAK2V617F*-positius, els pacients no portadors de la mutació presenten un grup de gens amb més sobreexpressió, excepte els gens de la via JAK-STAT, els quals es troben sobreexpressats en els *JAK2V617F*-positius. D'aquesta manera, tots els gens amb correlació significativa respecte a la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* mostren una correlació negativa, excepte pels gens de la via JAK-STAT (com el *BATF*) i el gen *CD44* en els quals la correlació és positiva. En el cas del gen *CD44*, aquest es detectava diferencialment expressat en les 40 TE però no en les 57 TE. El fet que la seva expressió es correlaciona amb la càrrega al·lèlica reforça la relació d'aquest gen amb la *JAK2V617F*.

5.2.3. Signatura d'expressió gènica en els pacients *JAK2V617F*-negatius

A partir de les dades d'expressió de plataformes TLDA utilitzades, en les que s'estudiava un total de 84 gens comuns en 57 pacients amb TE, es va definir un grup de 21 gens (*PP1R15A*, *DUSP2*, *CCL3*, *IER3*, *ZFP36*, *AXUD1*, *NFKBIE*, *IER5*, *NR4A2*, *TNF*, *MAFF*, *MYLIP*, *KLF5*, *PRNP*, *TAGAP*, *FCAR*, *OSM*, *PLEKHG2*, *DDIT4*, *GADD45B* i *LAMB3*.) diferencialment expressats en els pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius vs. els *JAK2V617F*-positius i controls. A part, en la mateixa comparativa de les 40 TE també es va identificar l'expressió alterada només en les TE *JAK2V617F*-negatives dels gens *CISH*, *C13orf18*, *SOCS3*, *PIM1* i *HRH4*.

Entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius (els quals representen aproximadament el 50% de les TE), una proporció no presenta cap marcador clonal, com la clonalitat del gen *HUMARA* o el creixement endogen mieloide. La identificació d'una signatura d'expressió gènica característica en aquest grup de pacients és important per identificar altres vies de senyalització, a part de la via JAK-STAT, implicades en la patogènesi de la TE. Aquestes dades poden proporcionar nous marcadors biològics que caracteritzen els pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius.

5.2.4. Sobreexpressió del gen *FOSB* en les TE *JAK2V617F* negatives

Un dels gens més rellevant del treball és el *FOSB*, sobreexpressat en totes les TE en comparació amb els individus sans i un dels més diferencialment expressats entre els pacients amb TE *JAK2V617F*-positius i *JAK2V617F*-negatius, amb una major expressió en els *JAK2V617F*-negatius (Figura R15, pàgina 189 i Taula R7, pàgina 187). A més a més, la seva expressió es redueix a l'augmentar la dosi de *JAK2V617F*. Juntament amb el *CISH* és un gen predictor de la presència de *JAK2V617F* i aquest model predictor, compost pels gens *CISH* i *FOSB*, s'ha confirmat tant en ambdós anàlisis del predictor realitzats.

El *FOSB* és un oncogen implicat en la regulació de la progressió en el cicle cel·lular. És un membre de la família de proteïnes FOS, les quals heterodimeritzen amb les proteïnes JUN per a generar els complexos de FT *adaptor-related protein complex 1* (AP1). El *FOSB* actua com a FT que estimula la proliferació cel·lular, la diferenciació i la transformació de cèl·lules hematopoètiques en resposta als estímuls de citocines i factors de creixement, a través de la via de senyalització Ras-Raf-MEK-ERK. L'estudi del transcriptoma realitzat per Georgantas i cols. (2004) en cèl·lules progenitores hematopoètiques de la MO d'un adult demostra que el *FOSB* es troba sobreexpressat en cèl·lules progenitores sanes i, a la vegada, diferents estudis han descrit el paper del gen *FOSB* en les leucèmies i en diversos càncers no hematopoètics. Bergerson i cols. (2012) van demostrar en un model murí que el *FOSB* era un gen essencial en l'origen i manteniment de les leucèmies mieloides. Així, podem hipotetitzar que el *FOSB* té un paper en la proliferació i diferenciació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques, i que una sobreexpressió persistent durant el procés de maduració de la cèl·lula hematopoètica podria ocasionar una proliferació cel·lular anormal com la present en les NMP. En relació amb la mutació *JAK2V617F* podem suposar que la sobreexpressió del *FOSB* és un esdeveniment previ a l'adquisició de la mutació (Figura D2). Aquesta hipòtesi és recolzada per la sobreexpressió de *BATF* que es

troba en els pacients *JAK2V617F*-positius. El gen *BATF* és un FT que heterodimeritza amb la família de proteïnes JUN i regula negativament la transcripció dirigida per AP-1, competint amb el FOS per a la dimerització amb JUN. El *BATF* només s'expressa en teixits hematopoètics, fet que suggereix un paper en el desenvolupament de la línia mieloide i/o limfoide (Echlin i cols. 2000). La transcripció de *BATF* s'activa per la via JAK-STAT. Considerant totes aquestes dades, el *FOSB* podria trobar-se sobreexpressat en tots els pacients com a estadi primari de la malaltia i, en cas que apareixi la *JAK2V617F*, s'activa la via JAK-STAT i, en conseqüència, s'expressa el gen *BATF* i competeix amb el *FOSB* pel pool intracel·lular de JUN. Aquest mecanisme explicaria la menor expressió del *FOSB* detectada en els pacients *JAK2V617F*-positius.

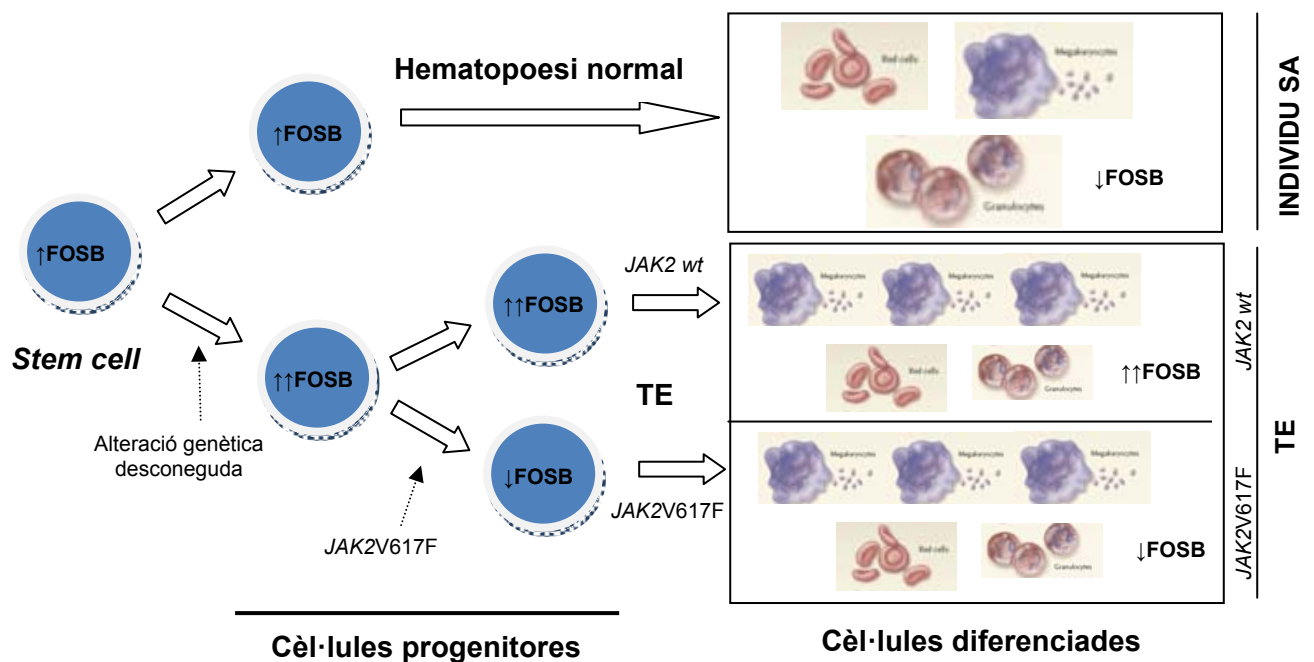


Figura D2. Hipòtesi de la implicació del *FOSB* en l'origen de la trombocitèmia essencial.

La relació directa de la sobreexpressió del *FOSB* amb la patogènesi de la TE la trobem en el treball de Limb i cols. (2009), en el que van demostrar que el *FOSB* regula la diferenciació megacariocítica de les cèl·lules K562 a través de la via MEK-ERK. Els

autors van detectar una forta inducció del *FOSB* quan diferenciaven les cèl·lules mieloides K562 a megacariòcits mitjançant estimulació amb *Phorbol-12-myristate 13-acetate* (TPA). A més a més, quan inhibien l'expressió del *FOSB* utilitzant ARNs d'interferència (iRNA) bloquejaven la diferenciació megacariocítica. Prèviament, Tenedini i cols (2004) en l'estudi de megacariòcits diferenciats a partir de cèl·lules CD34+ de MO de pacients amb TE ja havien detectat una elevada expressió del gen *v-FOS*. Aquests resultats suggereixen un possible paper del *FOSB* en la proliferació megacariocítica anòmala, que pot ocasionar creixement endogen sense la presència de *JAK2V617F*. No obstant, en la nostra sèrie de pacients, al analitzar la correlació de l'expressió del *FOSB* amb el eCFU-MK no es va trobar una associació entre la major expressió del *FOSB* i el eCFU-MK. Tot i així, el fet que alguns pacients *JAK2V617F*-negatius amb valors de *FOSB* elevats no presentin eCFU-MK podria explicar-se per la hipòtesi de que es requereixen altres alteracions moleculars, a part de la sobreexpressió del *FOSB*, per induïr una proliferació aberrant de megacariòcits. Pel què es refereix a la línia eritroide, sí que es va detectar una associació entre l'elevada expressió del *FOSB* i eBFU-E, però estava clarament relacionada amb la presència de la mutació *JAK2V617F*.

Des del punt de vista clínic cal destacar l'associació de l'expressió del *FOSB*, així com dels gens *CD44* i *PTGS2* (més conegut com a *COX2*) entre altres, amb fenòmens trombòtics. No obstant, en el nostre estudi el nombre de pacients que han patit fenòmens trombòtics és limitat (5 de 57 pacients), així que cal validar aquests resultats en sèries de pacients més àmplies. També es va identificar una associació de l'expressió del *FOSB*, junt amb la del *CD44* i d'altres gens, amb altres variables clíniques, com el nombre de leucòcits i els nivells de FAG, però eren variables que, com ja passava amb el eBFU-E, es trobaven relacionades amb la presència de la mutació *JAK2V617F*.

Tots els resultats exposats en relació al gen *FOSB* apunten a la implicació de la sobreexpressió d'aquest gen en la patogènesi de la TE i, per tant, a ser un gen diana en la teràpia d'aquests pacients.

En la validació de l'expressió del *FOSB* a nivell de proteïna, en neutròfils de SP de pacients amb TE, no es van obtenir resultats concloents. En l'anàlisi d'immunocitoquímica es va detectar una major expressió del gen *FOSB* en els pacients *JAK2V617F*-negatius però els resultats no eren estadísticament significatius, tant pel nombre reduït de pacients estudiats com per la divergència dels resultats. A més, el fet que l'expressió del *FOSB* es detectés a nivell citoplasmàtic i no nuclear no permet confirmar que aquest gen pugui tenir un efecte funcional en aquestes cèl·lules. Mitjançant la tècnica de Western Blot no es van confirmar els resultats obtinguts per immunocitoquímica, ja que no es va detectar expressió del *FOSB* en cap dels pacients analitzats. Aquests resultats es podrien explicar pel fet que els nivells d'expressió del *FOSB* eren massa reduïts per a ser detectats en l'anàlisi de l'extracte proteic total o bé per la degradació d'aquesta proteïna durant la manipulació en la tècnica de Western Blot. No obstant, caldria estudiar més pacients utilitzant ambdues tècniques per a confirmar aquests resultats. Els resultats obtinguts per immunocitoquímica suggereixen un lleuger increment de l'expressió proteica del *FOSB* en granulòcits dels pacients *JAK2V617F*-negatius però no confirmen un efecte funcional del gen.

5.3. COMPARACIÓ DELS PATRONS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I EN LES TROMBOCITOSIS REACTIVES

La comparativa del perfil d'expressió entre les TE i les TR va revelar que la majoria dels gens presentaven una major expressió en les TR. Malgrat que el nombre de pacients amb TR era molt reduït (sis pacients) així com també el nombre de gens estudiats (84 gens), es pot suggerir que el perfil proinflamatori observat en la TE és similar al present en un estat no clonal, com seria en les TR. Així, l'alteració gènica causant de la TE, prèvia a l'aparició de la *JAK2V617F* o d'altres alteracions moleculars, ocasiona un efecte similar i en menor grau que en un estat de trombocitosi no clonal. Si apareix la mutació *JAK2V617F* aquesta confereix un perfil d'expressió diferent i relacionat amb la desregulació de la via JAK-STAT i d'altres xarxes gèniques. El fet que entre els pacients TE *JAK2V617F*-negatius i les TR les diferències són mínimes i que entre els *JAK2V617F*-positius i les TR les diferències són molt més importants, confirma aquesta hipòtesi. En consonància amb aquests resultats l'expressió del FOSB no discriminava les TE de les TR però sí les TE *JAK2V617F*-positives de les TR. Així, el FOSB no seria un marcador diagnòstic de les TE respecte les TR, però sí que podrien ser-ho els gens *RBAF600*, *DAF*, *PPP1R15A*, *PFKFB3*, *PLAUR* els quals presentaven una expressió diferencial en relació a les TR i als controls. En la literatura existeixen pocs articles en els que analitzen el perfil d'expressió de pacients amb TE i el comparen amb TR. Entre ells trobem el treball de Gnatenko i cols. (2010), en el que utilitzen un microarray dissenyat específicament per a l'anàlisi de gens expressats en plaquetes. Comparen el perfil d'expressió de pacients amb TE respecte a les TR i controls, i detecten un nombre elevat de gens diferencialment expressats, el qual es redueix a un grup d'11 gens en la validació en una sèrie independent de pacients.

5.4. COMPARACIÓ DELS PATRONS D'EXPRESSIÓ EN LA TROMBOCITÈMIA ESSENCIAL I EN LA POLICITÈMIA VERA

5.4.1. La trombocitèmia essencial i la policitèmia vera presenten patrons d'expressió diferencials

En l'anàlisi comparatiu entre la TE i la PV es van detectar 65 gens diferencialment expressats entre aquests dos grups de pacients. La diferència d'expressió entre els pacients amb TE i amb PV era molt elevada, amb 30 gens amb un FC>3, i tots ells, excepte el gen *CD44*, amb major expressió en la TE. Un dels gens més diferencialment expressat era el *FOSB*. Aquest resultat suggereixen que la PV no comparteix el perfil proinflamatori detectat en la TE. No obstant, l'anàlisi d'agrupació dels pacients segons l'expressió dels gens diferencials entre les dues malalties no mostra una separació clara entre els pacients amb TE i PV. Sembla que les diferències d'expressió entre la TE i la PV no són tant clares i s'observen pacients amb PV amb un perfil proinflamatori, semblant a les TE, i algunes TE amb una infraexpressió dels gens proinflammatoris, amb un perfil semblant a la PV. El fet que en la comparativa s'inclouen una majoria de pacients amb PV portadors de mutacions en el gen *JAK2* amb una elevada càrrega al·lèlica comporta que probablement la diferència d'expressió estigui també influenciada per l'efecte de les mutació.

En la cerca dels gens diferencials en les comparatives de les TE respecte a les PV, a les TR i als controls es van identificar els gens *DAF* i *PLAUR* com als únics que podien discriminar la TE de la resta de condicions. Per tant, l'expressió d'aquests dos gens podria ser un marcador diagnòstic de la TE.

5.4.2. Patrons d'expressió gènica en la policitèmia vera en relació a les mutacions en el gen *JAK2* i comparació amb la trombocitèmia essencial

Per a identificar els gens amb expressió dependent de la presència de mutacions en el gen *JAK2* es van analitzar un total de 92 gens. En la comparativa de les PV *JAK2*-negatives amb les *JAK2*-positives només es van detectar dos gens diferencials, el *CISH* i el *SOCS2*, un nombre molt més reduït de gens en comparació amb els 46 observats entre les TE *JAK2*-negatives amb les *JAK2*-positives. Una explicació seria el fet que el nombre de pacients PV *JAK2*-negatius estudiats era molt baix, ja que són pacients molt poc freqüents, pel què la comparativa pot estar esbiaxada.

Amb l'objectiu d'identificar gens afectats per la càrrega al·lèlica de les mutacions de *JAK2* es van analitzar els gens diferencialment expressats entre les PV *JAK2*-negatives, les *JAK2*-positives en heterozigosi i les *JAK2*-positives en homozigosi. Es van detectar 23 gens diferencialment expressats entre els tres grups, entre els que apareixien el *FOSB* i el *CD44*. Així podem confirmar que en la PV també existeix un efecte de la càrrega al·lèlica de la mutació de *JAK2* en l'expressió dels gens dels granulòcits. Entre els gens diferencials només vuit coincideixen amb els diferencials en la TE (Taula R7, pàgina 187). No obstant, sí que el comportament d'aquests gens era molt semblant al de les TE, amb una disminució progressiva de l'expressió a l'augmentar la càrrega al·lèlica de la mutació de *JAK2* de la majoria de gens i un comportament invers en els gens de la via JAK-STAT i dels gens *CD44* i el *BATF* (Taula R8, pàgina 195).

En un intent de trobar un patró d'expressió comú en les TE i PV en relació a l'estat de *JAK2* es va realitzar una comparativa conjunta en la que es van identificar 59 gens diferencialment expressats entre els pacients *JAK2*-negatius, *JAK2*-positius en heterozigosi i *JAK2*-positius en homozigosi. Gairebé tots els gens coincidien amb els diferencials entre les TE i PV i entre les TE i les PV *JAK2*-negatives. Se'n pot deduir que no existeix una signatura gènica homogènia ni en relació a la presència de

mutacions en el gen *JAK2* ni en les TE i PV negatives, segurament degut a que el nombre de PV *JAK2*-negatives és molt reduït i per les grans diferències d'expressió observades entre les TE i les PV en general.

5.4.3. Sobreexpressió del *FOSB* en la policitèmia vera

En la PV també es detecta una sobreexpressió del gen *FOSB* en els pacients *JAK2*-negatius respecte als *JAK2*-positius, tot i que sense ser una diferència significativa. Paral·lelament, en la generació del predictor tampoc apareix el *FOSB*. Tot i així, sí que la comparativa entre els pacients *JAK2*-negatius, *JAK2*-positiu heterozigot i *JAK2*-positiu homozigot era significativa, amb una disminució de l'expressió del gen amb l'increment de la càrrega al·lèlica de la mutació. A més, l'expressió del *FOSB* ens permet distingir entre la TE i la PV, i s'associa la sobreexpressió del *FOSB*, junt amb l'expressió del *CD44* i el *PTGS2*, entre altres gens, amb els fenòmens trombòtics.

Per tots aquests resultats, es pot hipotetitzar que el *FOSB* pot estar implicat en la patogènesi no només dels pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius, sinó també en els pacients amb PV *JAK2*-negatius. Aquestes dades recolzen la nostra hipòtesi en la que el *FOSB* juga un paper en la proliferació de les cèl·lules hematopoètiques característic de la TE i PV a part de *JAK2V617F*, i podria explicar la proliferació mieloide de la TE, especialment en els pacients *JAK2V617F*-negatius. Seria interessant identificar les alteracions en la via de senyalització Ras-Raf-MEK-ERK que ocasionen la sobreexpressió del *FOSB*, per conèixer nous marcadors moleculars que puguin explicar els mecanismes implicats en la patogènesi dels pacients amb TE i PV *JAK2*-negatius.

6. CONCLUSIONS

1. El perfil d'expressió gènica dels granulòcits de sang perifèrica de pacients amb TE es caracteritza principalment per una sobreexpressió de gens que codifiquen per citocines i per altres gens implicats en la resposta immunològica. Aquest conjunt de gens defineix un perfil d'expressió proinflamatori que és independent de la presència de la mutació *JAK2V617F*.

2. Aquests resultats han estat validats mitjançant la tècnica de RQ-PCR amb la plataforma TLDA en els casos estudiats per microarrays i en una sèrie independent de pacients amb TE. L'anàlisi d'un conjunt concret de gens ha confirmat el patró d'expressió proinflamatori. Dins d'aquest conjunt s'han identificat 2 subpatrons d'expressió: un es caracteritza per tenir una major expressió dels gens implicats en la resposta immunològica i en l'activació del neutròfil, fenotip que podria afavorir els fenòmens trombòtics. L'altre subpatró es defineix per una menor expressió dels mateixos gens i es detecta majoritàriament en un grup de pacients portadors de la mutació *JAK2V617F*.

3. L'anàlisi del perfil d'expressió obtingut per microarrays i TLDA en relació a la presència de la mutació *JAK2V617F* ha mostrat que existeixen gens diferencialment expressats entre les TE *JAK2V617F*-positives i *JAK2V617F*-negatives.

3.1. El patró d'expressió en les TE *JAK2V617F*-positives es caracteritza per una sobreexpressió dels gens *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* i *PIM1*, inhibidors de la via JAK-STAT, que demostra l'activació constitutiva de la via per la mutació *JAK2V617F* en aquest grup de pacients.

3.2. El patró d'expressió en les TE *JAK2V617F*-negatives es caracteritza per una sobreexpressió de gens relacionats amb la resposta inflamatòria, que participen en vies de senyalització de citocines. La signatura d'expressió gènica característica dels pacients *JAK2V617F*-negatius ha permès identificar altres mecanismes, independents de la via JAK-STAT, implicats en la patogènesi de

la TE. Aquestes dades poden proporcionar nous marcadors biològics que caracteritzen aquests pacients.

3.3. S'ha identificat un grup de 15 gens l'expressió dels quals es relaciona amb la càrrega al·lèlica de la mutació *JAK2V617F*. En la majoria d'aquests gens (*DDX28*, *CKAP4*, *SEC31L1*, *ID2*, *FOSB*, *RBAF600*, *HCST*, *PRG1*, *TCTE1L*, *KLF5*, *PDE4B*, *TBCC* i *B2M*), l'expressió augmenta a mesura que la càrrega al·lèlica de *JAK2V617F* disminueix.

3.4. De tots els gens diferencialment expressats entre TE *JAK2V617F*-positives i *JAK2V617F*-negatives destaca el *FOSB*. Aquest gen és un oncogen relacionat amb proliferació que està implicat en la diferenciació megacariocítica i presenta una major expressió en les TE *JAK2V617F*-negatives, fet que podria explicar part dels mecanismes patogènics d'aquest grup de pacients.

4. La comparació del perfil d'expressió de les TE i les TR suggereix que el perfil proinflamatori observat en la TE és similar al que s'observa en la TR. Es pot postular que les alteracions moleculars que tindrien lloc en la TE, prèvies a l'aparició de la mutació *JAK2V617F* o a d'altres alteracions moleculars menys freqüents (com les mutacions dels gens *MPL* i *TET2*, entre d'altres), ocasionarien un efecte similar a un estat de trombocitosi no clonal.

5. L'anàlisi comparativa de les dades d'expressió gènica dels pacients amb TE i amb PV mostra un patró diferencial. La majoria de gens es troben infraexpressats en la PV, fet que suggereix que aquesta malaltia no comparteix el perfil proinflamatori detectat en la TE. L'anàlisi de l'expressió d'aquest grup de gens en relació a la presència de mutacions de *JAK2* identifica gens diferencialment expressats entre les PV *JAK2*-negatives, les *JAK2*-positives en heterozigosi i les *JAK2*-positives en homozigosi. La sobreexpressió del *FOSB* en pacients *JAK2*-negatius recolza la hipòtesi de la implicació d'aquest gen en la patogènesi de les NMP, especialment en les *JAK2*-negatives.

6. La validació de l'expressió del gen *FOSB* a nivell de proteïna, utilitzant les tècniques d'immunocitoquímica i de Western Blot, no ha aportat resultats conclouents. Amb la tècnica d'immunocitoquímica els resultats obtinguts són heterogenis però s'observa una tendència a una major expressió de *FOSB* en els neutròfils dels pacients amb TE *JAK2V617F*-negatius. Amb la tècnica de Western Blot no s'ha detectat expressió proteica en cap dels pacients estudiats.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70:447-452.

Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*. 1976;295:913-916.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511.

Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* 2006;M7:55-65.

Allavena P, Germano G, Marchesi F, Mantovani A. Chemokines in cancer related inflammation. *Exp Cell Res*. 2011;317:664-673. Review.

Arboix A, Besses C. Cerebrovascular disease as the initial clinical presentation of haematological disorders. *Eur Neurol* 1997;37:207-211.

Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91:169–175.

Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, Cervantes F. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol*. 2009;84:102-108.

Atallah E, Nussenzveig R, Yin CC, Bueso-Ramos C, Tam C, Manshour T, Pierce S, Kantarjian H, Verstovsek S. Prognostic interaction between thrombocytosis and JAK2 V617F mutation in the WHO subcategories of myelodysplastic/myeloproliferative disease-unclassifiable and refractory anemia with ringed sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2008;22:1295-8129.

Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* 2000;96:3310-3321.

Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007;26:6724-6737. Review.

Barbui T, Finazzi G. Risk factors and prevention of vascular complications in polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:455-461.

Barrio S, Gallardo M, Albizua E, Jimenez A, Arpad I, Ayala R, Gilsanz F, Martin-Subero JI, Martinez-Lopez J. Epigenomic profiling in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia shows low levels of aberrant DNA methylation. *J Clin Pathol*. 2011;64:1010-1013.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1064.

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;112:141-149.

Beer PA, Jones AV, Bench AJ, Goday-Fernandez A, Boyd EM, Vaghela KJ, Erber WN, Odeh B, Wright C, McMullin MF, Cullis J, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Green AR. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *Br J Haematol* 2009;144:904-908.

Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2010;115:2891-2900.

Bellosillo B, Besses C, Florensa L, Sole F, Serrano S. JAK2V617F mutation, PRV-1 overexpression and endogenous erythroid colony formation show different coexpression patterns among Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006;102:18962-18967.

Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Bailliere's Clin Haematol* 1998;11:819-847.

Bennett M, Stroncek DF. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *Transl Med* 2006;4:41.

Bergerson RJ, Collier LS, Sarver AL, Been RA, Lugthart S, Diers MD, Zuber J, Rappaport AR, Nixon MJ, Silverstein KA, Fan D, Lamblin AF, Wolff L, Kersey JH, Delwel R, Lowe SW, O'Sullivan MG, Kogan SC, Adams DJ, Largaespada DA. An insertional mutagenesis screen identifies genes that cooperate with Mll-AF9 in a murine leukemogenesis model. *Blood*. 2012;Mar 16 (Epub ahead of print).

Berkofsky-Fessler W, Buzzai M, Kim MK, Fruchtman S, Najfeld V, Min DJ, Costa FF, Bischof JM, Soares MB, McConnell MJ, Zhang W, Levine R, Gilliland DG, Calogero R, Licht JD. Transcriptional profiling of polycythemia vera identifies gene expression patterns both dependent and independent from the action of JAK2V617F. *Clin Cancer Res* 2010;16:4339-4352.

Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol* 1975;12:339-351.

Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, Woessner S, Sans-sabrafen J, Rozman C, Montserrat E. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia* 1999;13:150-154.

Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene*. 2011;30:990-1001.

Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia Rubra Vera. *Semin Oncol* 1995;22:307-326.

Blüml S, Rosc B, Lorincz A, Seyerl M, Kirchberger S, Oskolkova O, Bochkov VN, Majdic O, Ligeti E, Stöckl J. The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes. *J Immunol* 2008;181:4347-4353.

Borze I, Mustjoki S, Juvonen E, Knuutila S. Oligoarray comparative genomic hybridization in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93:1098-1100. Erratum in: *Haematologica* 2008;93:1760.

Bøyum, A., Separation of leucocytes from blood and bone marrow, *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 1968;21.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-254.

Briere J, el-Kassar N. Clonality markers in polycythaemia and primary thrombocythaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:787-801. Review.

Broseus J, Florensa L, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Richebourg S, Lippert E, Cermak J, Evans J, Mounier M, Raya JM, Bailly F, Gattermann N, Haferlach T, Garand R, Allou K, Besses C, Germing U, Haferlach C, Travaglino E, Luno E, Pinan MA, Arenillas L, Rozman M, Perez Sirvent ML, Favre B, Guy J, Alonso E, Ahwij N, Jerez A, Hermouet S, Maynadie' M, Cazzola M, Girodon F. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2012; [Epub ahead of print].

Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, Bardy PG, D'Andrea RJ. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia* 2008;22:870-873.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1945-1953.

Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006a;355:2542-2566. Review.

Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, Erber WN, Kusec R, Larsen TS, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Griesshammer M, Reilly JT, Cheung BY, Harrison CN, Green AR. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood* 2006b;108:3548-3555.

Capello D, Deambrogi C, Rossi D, Lischetti T, Piranda D, Cerri M, Spina V, Rasi S, Gaidano G, Lunghi M. Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2008;141:504-511.

Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009;23:2183-2186.

Catani L, Zini R, Sollazzo D, Ottaviani E, Vannucchi AM, Ferrari S, Baccarani M, Vianelli N, Lemoli RM, Manfredini R. Molecular profile of CD34+ stem/progenitor cells according to JAK2V617F mutation status in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2009;23:997-1000.

Cervantes F, Álvarez-Larrán A, Talarn C, Gómez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol* 2002;118:786-790.

Cervantes F. Management of essential thrombocythemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:215-221.

Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women: implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1997;97:920-926.

Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 2007;110:1411-1419.

Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sorà F, Giordano G, Urbano R, Mazzucconi MG, De Stefano V, Leone G, Sica S. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2001;29:670-676.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581-585.

Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17:83–90.

Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood.*1994;83:99-112.

Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990;8:556-562.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867. Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:208-214.

Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992;80:891-899.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360:2289-2301.

Díez-Martín JL, Graham DL, Pettit RM, Dewald GW. Chromosome studies in 104 patients with polycythemia vera. *Mayo Clin Proc* 1991;66:287-299.

Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004;103:4198-4200.

Draghici S. Data analysis tools for DNA microarrays. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, USA, 2003.

Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, et al. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 2007;1:218-229.

Echlin DR, Tae HJ, Mitin N, Taparowsky EJ. B-ATF functions as a negative regulator of AP-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by Ras and Fos. *Oncogene* 2000;30:1752-1763.

El-Kassar N, Hetet G, Li Y, Brière J, Grandchamp B. Clonal analysis of haemopoietic cells in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol.* 1995;90:131-137.

El-Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997;89:128-134.

Elis A, Amiel A, Manor Y, Tangi I, Fejgin M, Lishner M. The detection of trisomies 8 and 9 in patients with essential thrombocytosis by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;92:14-17.

Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2004;128:275-290.

Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2005;33:523-530.

Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007;35:702-711. Erratum in: *Exp Hematol* 2007;35:1476.

Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 1981;58:916-919.

Fielder PJ, Hass P, Nagel M, Stefanich E, Widmer R, Bennett GL, Keller GA, de Sauvage FJ, Eaton D. Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood* 1997;89:2782-2788.

Florensa L, Besses C, Almancha J, Lafuente R, Palou L, Pedro C, Sans-Sabrafen J, Woessner S. Circulating erythroid and megakaryocytic progenitors en polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 1989;43:417-422.

Florensa L, Besses C, Woessner S, Solé F, Acín P, Pedro C, Sans-Sabrafen. Endogenous megakaryocyte colony formation from blood in essential thrombocythaemia. *Leukemia* 1995;9:271-273.

Florensa L, Besses C, Zamora L, Bellosillo B, Espinet B, Serrano S, Woessner S, Solé F. Endogenous erythroid and megakaryocytic circulating progenitors, HUMARA clonality assay and PRV-1 expression are useful tools for diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2004;103:2427-2428.

Florensa L, Bellosillo B, Besses C, Puigdecenet E, Espinet B, Perez-Vila E, Longarón R, Vilà RM, Solé F, Serrano S. JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. *Leukemia* 2006;20:1903–1905.

Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007;26:6816-6828. Review.

Garçon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V, Lecluse Y, Bennaceur-Griscelli A, Vainchenker W. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006;108:1551-1554.

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.

Georgantas RW 3rd, Tanadve V, Malehorn M, Heimfeld S, Chen C, Carr L, Martinez-Murillo F, Riggins G, Kowalski J, Civin CI. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Res* 2004;64:4434-4441.

Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN. miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood* 2010;116:437-445.

Gnatenko DV, Cupit LD, Huang EC, Dhundale A, Perrotta PL, Bahou WF. Platelets express steroidogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Distinct profiles predict the essential thrombocytopenic phenotype. *Thromb Haemost* 2005;94:412-421.

Gnatenko DV, Zhu W, Xu X, Samuel ET, Monaghan M, Zarrabi MH, Kim C, Dhundale A, Bahou WF. Class prediction models of thrombocytosis using genetic biomarkers. *Blood* 2010;115:7-14.

Goerttler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel H, Pahl HL. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005a;106:2862-2864.

Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, Marz E, Rumberger B, Sparna T, Schmitt-Gräff A, Wilpert J, Timmer J, Walz G, Pahl HL. Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol* 2005b;129:138–150.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.

Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. *PLoS One* 2007;2:e1225.

Griesshammer M, Bangerter M, Van Vliet HHDM, Michiels JJ. Aspirin in essential thrombocythemia: status quo an quo vadis. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:371-377.
Gruppo Studio Policitemia. Polycythemia vera: the natural history of 1.213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995;123:656-664.

Guglielmelli P, Zini R, Bogani C, Salati S, Pancrazzi A, Bianchi E, Mannelli F, Ferrari S, Le Bousse-Kerdilès MC, Bosi A, Barosi G, Migliaccio AR, Manfredini R, Vannucchi AM. Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *Stem Cells* 2007;25:165-173.

Gunz FW. Hemorrhagic thrombocythemia: a critical review. *Blood* 1960;15:706-723.

Hakansson P, Nilsson B, Andersson A, Lassen C, Gullberg U, Fioretos T. Gene expression analysis of BCR/ABL1-dependent transcriptional response reveals enrichment for genes involved in negative feedback regulation. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:267–275.

Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999a ;93:417-424.

Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999b;107:139-147.

Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood* 2012;119:3219-3225.

Hernández-Boluda JC, Pereira A, Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Collado M, Such E, Arilla MJ, Boqué C, Xicoy B, Maffioli M, Bellosillo B, Marugán I, Amat P, Besses C, Guillem V. A polymorphism in the XPD gene predisposes to leukemic transformation and new nonmyeloid malignancies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2012 Apr 11 [Epub ahead of print].

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology* 1992;10:413-417.

Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W, Percy MJ, McMullin MF, Constantinescu SN, Johnston JA. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 2007;109:4924-4929.

Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997;90:4031-4038.

Hou Y, Song L, Zhu P, Zhang B, Tao Y, Xu X, Li F, Wu K, Liang J, Shao D, Wu H, Ye X, Ye C, Wu R, Jian M, Chen Y, Xie W, Zhang R, Chen L, Liu X, Yao X, Zheng H, Yu C, Li Q, Gong Z, Mao M, Yang X, Yang L, Li J, Wang W, Lu Z, Gu N, Laurie G, Bolund L, Kristiansen K, Wang J, Yang H, Li Y, Zhang X, Wang J. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 2012;148:873-885.

Hussein K, Bock O, Theophile K, Seegers A, Arps H, Basten O, Grips KH, Franz-Werner J, Büsche G, Kreipe H. Chronic myeloproliferative diseases with concurrent BCR-ABL junction and JAK2V617F mutation. *Leukemia* 2008;22:1059-1062.

Iland Hj, Laszlo J, Peterson P, Murphy S, Brière J, Weinfeld A, Rosenthal DS, Landaw SA, Ellis JT, Silverstein MN, *et al.* Essential thrombocythemia: clinical and laboratory characteristics at presentation. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:165-174.

Inami M, Yamaguchi H, Hasegawa S, Mitamura Y, Kosaka F, Kobayashi A, Kimura S, Dan K, Inokuchi K. Analysis of the exon 12 and 14 mutations of the JAK2 gene in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia* 2008;22:216.

Irino T, Uemura M, Yamane H, Umemura S, Utsumi T, Kakazu N, Shirakawa T, Ito M, Suzuki T, Kinoshita K. JAK2 V617F-dependent upregulation of PU.1 expression in the peripheral blood of myeloproliferative neoplasm patients. *PLoS One* 2011;6:e22148.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249-264.

Jabaily J, Iland HJ, Laszlo J, Massey EW, Faguet GB, Brière J, Landaw SA, Pisciotta AV. Neurologic manifestations of essential thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1983;99:513-518.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 3rd edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2001.

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

James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, *et al.* The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* 2008;112:2429-2438.

Jones LC, Tefferi A, Vuong PT, Desmond JC, Hofmann WK, Koeffler HP. Detection of aberrant gene expression in CD34+ hematopoietic stem cells from patients with agnogenic myeloid metaplasia using oligonucleotide microarrays. *Stem Cells* 2005;23:631-637.

Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:446-449.

Jost E, do O N, Dahl E, Maintz CE, Jousten P, Habets L, Wilop S, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2007;21:505-510.

Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantification PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001;25:402-408.

Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, Bass A, Marubayashi S, Heguy A, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Offit K, Stone RM, Gilliland DG, Klein RJ, Levine RL. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:455-459.

Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, Li CY, Wu W, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer* 2007;109:2279-2284.

Klippel S, Pahl HL. Molecular markers for the diagnosis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Pathol Biol* 2004;52:267-274.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95-125. Review.

Martínez-Avilés L, Besses C, Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007;92:1717-1718.

Kota J, Caceres N, Constantinescu SN. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008;22:1828-1840.

Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30:229-236.

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

Kralovics R, Skoda RC. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev* 2005b;19:1-13.

Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005c;106: 3374–3376.

Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC. 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.

Kuo WP, Whipple ME, Epstein JB, Jenssen TK, Santos GS, Ohno-Machado L, Sonis ST. Deciphering gene expression profiles generated from DNA microarrays and their applications in oral medicine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:584-591. Review.

Laubach JP, Fu P, Jiang X, Salter KH, Potti A, Arcasoy MO. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 2009;37:1411-1422.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005a;7:387-397.

Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005b;106:3377-3379.

Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107:4139-4141.

Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* 2008;111:3863-3866.

Li J, Spensberger D, Ahn JS, Anand S, Beer PA, Ghevaert C, Chen E, Forrai A, Scott LM, Ferreira R, Campbell PJ, Watson SP, Liu P, Erber WN, Huntly BJ, Ottersbach K, Green AR. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood* 2010;116:1528-1538.

Limb JK, Yoon S, Lee KE, Kim BH, Lee S, Bae YS, Jhon GJ, Kim J. Regulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells by FosB, a member of the Fos family of AP-1 transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1962-1973.

Lozano JJ, Soler M, Bermudo R, Abia D, Fernandez PL, Thomson TM, Ortiz AR. Dual activation of pathways regulated by steroid receptors and peptide growth factors in primary prostate cancer revealed by Factor Analysis of microarray data. *BMC Genomics* 2005;6:109.

Lozzio, C.B.; Lozzio, B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321–334.

Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18962-18967.

Lu X, Huang LJ, Lodish HF. Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. *J Biol Chem* 2008;283:5258-5266.

Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* 2010;10:369-373. Review.

Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, Marilus R, Villegas A, Tognoni G, Barbui T. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2005;23:2224-2232.

Margalit O, Somech R, Amariglio N, Rechavi G. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Rev* 2005;19:223-234.

Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Torres E, Serrano S, Bellosillo B. TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2012;91:533-541.

Marty C, Lacout C, Martin A, Hasan S, Jacquot S, Birling MC, Vainchenker W, Villeval JL. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 2010;116:783-787.

Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Möller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 2006;20:157-158.

Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. *Leukemia* 1991;5:214-220.

Mesa RA, Hanson CA, Li CY, Yoon Sy, Rajkumar Sv, Schroeder G, Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-MPL expression in essential thrombocythemia. *Blood* 2002;99:4131-4137.

Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105:973-977.

Michiels JJ, Ten Kate FJW. Erythromelalgia in thrombocythemia of various myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1992;39:131-136.

Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH, Van Vliet HHDM. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993;43:1107-1110.

Mitterbauer G, Winkler K, Gisslinger H, Geissler K, Lechner K, Mannhalter C. Clonality analysis using X-chromosome inactivation at the human androgen receptor gene (Humara). Evaluation of large cohorts of patients with chronic myeloproliferative diseases, secondary neutrophilia, and reactive thrombocytosis. *Am J Clin Pathol.* 1999;112:93-100.

Moliterno AR, Hankins D, Spirak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:572-580.

Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 1999;94:2555-2561.

Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Exp Hematol* 2008;36:1486–1492.

Moll J, Khaldoyanidi S, Sleeman JP, Achtnich M, Preuss I, Ponta H et al. Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1024–1034.

Murphy S. Polycythemia Vera. *Disease-a-Month* 1992;38:157-212.

Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszo Y. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29-39.

Najean Y, Rain J-D. The very long-term evolution of polycythemia vera: an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or 32P between 1969 and 1981. *Semin Hematol* 1997;34:6-16.

Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtman S. Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridization: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected. *Br J Haematol* 2002;119:558-566.

Najfeld V, Fuchs S, Merando P, Lezon-Geyda K, Fruchtman S. Fluorescence in situ hybridization analysis of the PRV-1 gene in polycythemia vera: implications for its role in diagnosis and pathogenesis. *Exp Hematol* 2003;31:118-121.

O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 2007;44:2497-2506.

Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Gotsev Y, Gibbs Kd, Jr., Merker JD, Zehnder JL, Nolan GP, Gotlib J. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010;116:988-992.

Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009a;41:450-454.

Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D et al. The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* 2009b;23:1924-1926.

Ozer FL, Truass WE, Miesch DC, Levin WC. Primary hemorrhagic thrombocythemia. *Am J Med* 1960;28:807-823.

Palandri F, Ottaviani E, Salmi F, Catani L, Polverelli N, Flacchini M, Martinelli G, Baccarani M, Vianelli N. JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma* 2009;50:247-253.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472-3476.

Pardanani A, Lasho TL, Finke C, et al. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356:459-468.

Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93:385-395.

Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Lazzarino M, Cazzola M. JAK2 (V617F) mutation in healthy individuals. *Br J Haematol* 2007;136:678-679.

Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L et al. Relationship between granulocyte JAK2 (V617F) mutant allele burden and risk of progression to myelofibrosis in polycythemia vera: a prospective study of 338 patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009;114:751.

Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, Kiladjian JJ, McMullin MF, Ruggeri M, Besses C, Vannucchi AM, Lippert E, Gisslinger H, Rumi E, Lehmann T, Ortmann CA, Pietra D, Pascutto C, Haferlach T, Cazzola M. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011;117:2813-2816.

Pearson TC. Diagnosis and classification of erythrocytoses and thrombocytoses. *Baillière's Clin Haematol* 1998;11:695-720.

Pellagatti A, Vetrie D, Langford CF, Gama S, Eagleton H, Wainscoat JS, Boulwood J. Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology. *Cancer Res* 2003;63:3940-3944.

Peltola KJ, Paukku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood* 2004;103:3744-3750.

Picardi M, Martinelli V, Ciancia R et al. Measurement of spleen volume by ultrasound scanning in patients with thrombocytosis; a prospective study. *Blood* 2002;99:4428-44230.

Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:1686-1689.

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;3:e270.

Pitcher L, Taylor K, Nichol J, Selsi D, Rodwell R, Marty J, Taylor D, Wright S, Moore D, Kelly C, Rentoul A. Thrombopoietin measurement in thrombocytosis: Dysregulation and lack of feedback inhibition in essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 1997;99:929.

Plo I, Nakatake M, Malivert L, de Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L, Vainchenker W. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;112:1402-1412.

Puigdecenet E, Espinet B, Villa O, Florensa F, Besses C, Serrano S, Solé F. Detection of abnormalities of abnormalities of PRV-1, TPO and c-MPL genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:39-42.

Puigdecenet E, Espinet B, Lozano JJ, Sumoy L, Bellosillo B, Arenillas L, Alvarez-Larrán A, Solé F, Serrano S, Besses C, Florensa L. Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008;22:1368-1376.

Rameshwar P, Chang VT, Gasco'n P. Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis. *Br J Haematol* 1996;93:22-29.

Raya JM, Arenillas L, Domingo A, Bellosillo B, Gutiérrez G, Luño E, Piñán MA, Barbón M, Pérez-Sirvent ML, Muruzábal MJ, Yáñez L, García L, Lemes A, Navarro JT, Elozegi A, Cortés MA, Villegas A, Durán MA, Ardanaz M, Florensa L; Grupo Español de Citología Hematológica, Working Group into the Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with thrombocytosis: comparative analysis of marked with non-marked thrombocytosis, and relationship with JAK2 V617F mutational status. *Int J Hematol* 2008;88:387-395.

Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, Terriou L, Crinquette A, Laï JL, Cossement C, Lionne-Huyghe P, Rose C, Bauters F, Preudhomme C. High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2006;20:2067-2070.

Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, Panelatti G, Dupont S, James C, Plo I, Bordessoule D, Chomienne C, Delannoy A, Devidas A, Gardembas-Pain M, Isnard F, Plumelle Y, Bernard O, Vainchenker W, Najman A, Bellanné-Chantelot C; French Group of Familial Myeloproliferative Disorders. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114:1628-1632.

Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons J.L. *Hematología Clínica*. 5ena edició. Harcourt, Barcelona, Espanya. 2006.

Santos FP, Verstovsek S. JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? *Blood Rev* 2011;25:53-63. Review.

Schafer AI. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Blood* 1994;64:1-9.

Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for JAK2-V617F. *Blood* 2009;113:2022-2027.

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;115:2003-2007.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470.

Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108:2435-2437.

Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356:459-468.

Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol* 2011;86:668-676.

Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A, Reinecke P, Germing U, Skoda RC. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2008;93:34-40.

Schwemmers S, Will B, Waller CF, Abdulkarim K, Johansson P, Andreasson B, Pahl HL. JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling. *Exp Hematol* 2007;35:1695-1703.

Sedlacek SM, Curtis JL, Weintraub J, Levin J. Essential thrombocythemia and leukemic transformation. *Medicine* 1986;65:353-364.

Shih LY, Lin TL, Dunn P, Wu JH, Tseng CP, Lai CL, Wang PN, Kuo MC. Clonality analysis using X-chromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol* 2001;29:202-208.

Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernández-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:564-571.

Slattery ML, Lundgreen A, Kadlubar SA, Bondurant KL, Wolff RK. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. *Mol Carcinog* 2011;doi:10.1002/mc.21841.

Slezak S, Jin P, Caruccio L, Ren J, Bennett M, Zia N, Adams S, Wang E, Ascensao J, Schechter G, Stroncek D. Gene and microRNA analysis of neutrophils from patients with polycythemia vera and essential thrombocytosis: down-regulation of micro RNA-1 and -133a. *J Transl Med* 2009;7:39.

Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2004;3:Article 3.

Soukup M, Cho H, Lee JK. Robust classification modeling on microarray data using misclassification penalized posterior. *Bioinformatics* 2005;21:i423–i430.

Staal FJ, Cario G, Cazzaniga G, Haferlach T, Heuser M, Hofmann WK, Mills K, Schrappe M, Stanulla M, Wingen LU, van Dongen JJ, Schlegelberger B. Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia* 2006;20:1385-1392.

Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106:1207-1209.

Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, DeWald GW, Kaufmann SH. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006;20:971-978.

Stegelmann F, Bullinger L, Griesshammer M, Holzmann K, Habdank M, Kuhn S, Maile C, Schauer S, Döhner H, Döhner K. High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica* 2010;95:666-669.

Steidl U, Schroeder T, Steidl C, Kobbe G, Graef T, Bork S et al. Distinct gene expression pattern of malignant hematopoietic stem and progenitor cells in polycythemia vera. *Ann NY Acad Sci* 2005;1044: 94–108.

Stein BL, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL, Moliterno AR. Disease burden at the progenitor level is a feature of primary myelofibrosis: a multivariable analysis of 163 JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasm patients. *Exp Hematol* 2011;39:95-101.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008.

Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood* 1988;72:386-395.

Szpurka H, Gondek LP, Mohan SR, Hsi ED, Theil KS, Maciejewski JP. UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation. *Leukemia* 2009;23:610-614.

Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with hemopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996;93:783-788.

Tefferi A, Strand JJ, Lasho TL, Knudson RA, Finke CM, Gangat N, Pardanani A, Hanson CA, Ketterling RP. Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera. *Leukemia* 2007;21:2074-2075.

Tefferi A, Sirhan S, Sun Y, Lasho T, Finke CM, Weisberger J, Bale S, Compton J, LeDuc CA, Pardanani A, Thorland EC, Shevchenko Y, Grodman M, Chung WK. Oligonucleotide array CGH studies in myeloproliferative neoplasms: comparison with JAK2V617F mutational status and conventional chromosome analysis. *Leuk Res* 2009;33:662-664.

Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009;23:905-911.

Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH1, IKZF1. *Leukemia* 2010;24:1128-1138.

Tefferi A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2011;86:292-301. Review.

Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Röder S, Lübbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer H-E, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000;95:2569-2576.

Tenedini E, Fagioli ME, Vianelli N, Tazzari PL, Ricci F, Tagliafico E, Ricci P, Gugliotta L, Martinelli G, Tura S, Baccharani M, Ferrari S, Catani L. Gene expression profiling of normal and malignant CD34-derived megakaryocytic cells. *Blood* 2004;104:3126-3135.

Teofili L, Pierconti F, Di Febo A, Maggiano N, Vianelli N, Ascani S, Rossi E, Pileri S, Leone G, Larocca LM, De Stefano V. The expression pattern of c-MPL in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002a;100:714-717.

Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *Blood* 2002b;20:4249-4254.

Teofili L, Martini M, Cenci T, Guidi F, Torti L, Giona F, Foà R, Leone G, Larocca LM. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer* 2008;123:1586-1592.

Theocharides A, Boisiinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007;110:375-379.

Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Zankovich R, Diehl V: Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): A retrospective clinicopathological study of 120 patients. *Am J Hematol* 70:283-291, 2002.

Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Report on essential thrombotythemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981;4:138-142.

Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008;111:3931-3940.

Van Genderen PJJ, Michiels JJ. Erythromelalgic, thrombotic and haemorrhagic manifestations of thrombocythaemia. *Presse Med* 1994;23:73-77.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:Research0034.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21:1952-1959.

Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008;22:1299-1307.

Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *ASH Education Book* 2009;1:636-64.

Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010;363:117-127.

Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;95:19–29.

Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Acción Médica, Madrid, 2000.

Xing S, Wanting TH, Zhao W, Ma J, Wang S, Xu X, Zhao ZJ. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood* 2008;111:5109-5117.

Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol* 2000;65:170-174.

Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Salido M, Solé F. Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythaemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence in situ hybridization. *Haematologica* 2003;88:110-111.

Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Bellosillo B, Sole F. Clonality analysis by HUMARA assay in Spanish females with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Haematologica* 2005;90:259-261.

8. ANNEXOS: Publicacions



Detection of abnormalities of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes detected by fluorescence in situ hybridization in essential thrombocythemia

Eulàlia Puigdecamet^{a,b,*}, Blanca Espinet^{a,c,e}, Olaya Villa^a,
 Lourdes Florensa^{b,c,e}, Carles Besses^{d,e}, Sergi Serrano^{a,b,e}, Francesc Solé^{a,c,f}

^aLaboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, ^bLaboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia,

^cEscola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, ^dServei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Pg. Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain

^eUnitat de Recerca de Neoplàsies Hematològiques-Parc de Biomèdica de Barcelona, C/Dr. Aiguader, 88, Barcelona 08003, Spain

^fUnitat de Recerca Translacional de Tumors Sòlids-Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, C/Dr. Aiguader, 88, Barcelona 08003, Spain

Received 29 April 2005; received in revised form 8 August 2005; accepted 16 August 2005

Abstract

No specific diagnostic markers have been described in essential thrombocythemia (ET). *PRV-1* (polycythemia rubra vera-1), *TPO* (thrombopoietin), and *c-MPL* (myeloproliferative leukemia virus oncogene) genes are candidate ET molecular markers because of their implication in the pathogenesis of ET. We have studied the status of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes in 30 ET patients by a fluorescence in situ hybridization (FISH) technique using three noncommercial, locus-specific probes for *PRV-1* (BAC RP11-160A19, located at 19q13.2), *TPO* (BAC RP11-45NP16, located at 3q27), and *c-MPL* (BAC RP11-297L5, located at 1p34). FISH study showed no *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* cytogenetic abnormalities in any of the analyzed cases. Our results suggest a lack of structural and numerical rearrangements (deletions, translocations, or amplifications) of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes in ET patients. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Essential thrombocythemia (ET) is a chronic myeloproliferative disorder (CMPD) with heterogeneous features and no specific diagnostic markers. As a result, its diagnosis is based on the exclusion of other CMPD and secondary thrombocytosis. The study of molecular alterations has focused on the *PRV-1* (polycythemia rubra vera-1), *TPO* (thrombopoietin), and *c-MPL* (myeloproliferative leukemia virus oncogene) genes because of their implication in ET pathogenesis [1].

The *PRV-1* gene is a cell-surface receptor that belongs to the Ly-6/uPAR superfamily [2]. Several groups have published *PRV-1* gene overexpression in granulocytes from polycythemia vera (PV) and in some ET patients, but not in secondary erythrocytosis (SE), in chronic myeloid leukemia (CML), nor in healthy individuals. Therefore, the quantification of *PRV-1* mRNA represents a specific molecular marker for PV (it discriminates between PV and SE), but not for ET [3]. *TPO* and its receptor, *c-MPL*, regulate

megakaryocytic proliferation and differentiation. *c-MPL* expression in megakaryocytes and platelets is generally decreased in ET but it may be also decreased in reactive thrombocytosis [4] and in hereditary thrombocythemia [5]. Its diagnostic value is limited but it would be useful as a prognostic marker for its correlation with thrombotic events [6,7].

Regarding gene status studies, the absence of *PRV-1* anomalies detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) has been reported in PV [8], but there are no results for *PRV-1*, *TPO* and *c-MPL* genes in ET patients.

The aim of this study was to analyze the status of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes by FISH to find molecular markers in ET patients.

2. Patients and methods

2.1. Patients

Thirty bone marrow samples from patients diagnosed with ET following the Polycythemia Vera Study Group (PVSG) criteria [9] and 10 bone marrow samples from healthy individuals, which were used as assay validation

* Corresponding author. Tel.: +34-93-248-35-21; fax: +34-93-248-31-31.

E-mail address: eulalia.puigdecamet01@campus.upf.es (E. Puigdecamet).

controls, were included in the study. All patients (7 males and 23 females) came from Hospital del Mar in Barcelona, and the diagnoses were established between 1988 and 2004.

2.2. FISH technique

FISH studies were performed on fixed nuclei from bone marrow samples proceeding from conventional cytogenetics cultures. Chromosome analyses had been performed previously on hematologic cells from 24-hour bone marrow cultures, and all cases showed a normal karyotype [10]. All samples were studied using three noncommercial, locus-specific probes (BAC) for *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes as follows: (1) *PRV-1* gene [BAC RP11-160A19, 157 kilobases (Kb), located at 19q13.2] labeled in SpectrumRed-dUTP cohybridized with the 19p telomeric probe (D19S238E; Vysis, Downers Grove, IL) labeled in SpectrumGreen (Fig. 1A); (2) the *TPO* gene (BAC RP11-

45NP16, 183 Kb, located at 3q27) labeled in SpectrumGreen-dUTP cohybridized with the centromeric probe for chromosome 3 (D3Z1; Vysis) labeled in SpectrumRed (Fig. 1B); and (3) the *c-MPL* gene (BAC RP11-297L5, 190 Kb, located at 1p34) labeled in SpectrumGreen-dUTP cohybridized with the centromeric probe for chromosome 1 (D1Z5; Vysis) labeled in SpectrumOrange (Fig. 1C).

The selected BACs were obtained from the CHORI BAC/PAC resource (<http://bacpac.chori.org>). Clones were grown using standard procedures and BAC DNA was extracted using standard alkaline lysis techniques (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Probe DNA was labeled by nick translation (Vysis) as indicated by the manufacturer. The cytogenetic localization of all probes was verified by hybridization to normal metaphase chromosomes (G-banding with inverted DAPI).

Regarding the hybridization process, slides were denatured for 5 minutes at 70°C in a 70% formamide solution

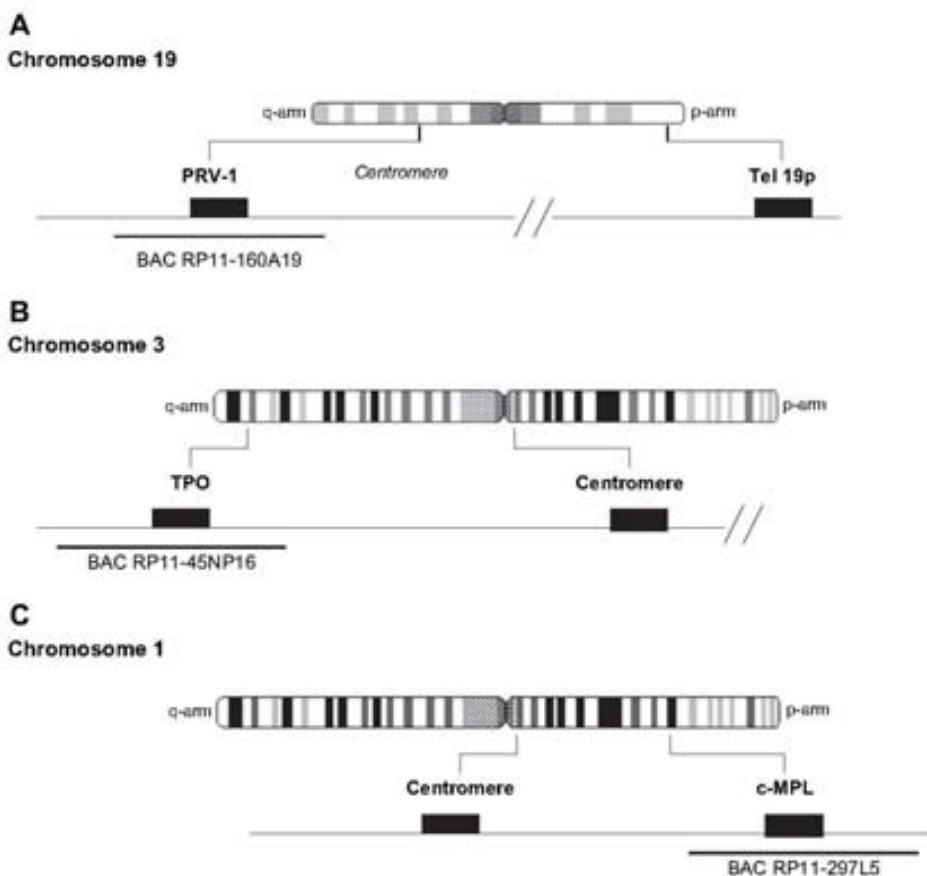


Fig. 1. Physical maps for the DNA probes used in this project. (A) Probe for the *PRV-1* gene (BAC RP11-160A19, 157 Kb), located at 19q13.2, labeled in SpectrumRed-dUTP cohybridized with the 19p telomeric probe (D19S238E; Vysis), labeled in SpectrumGreen. (B) Probe for the *TPO* gene (BAC RP11-45NP16, 183 Kb), located at 3q27, labeled in SpectrumGreen-dUTP cohybridized with the centromeric probe for chromosome 3 (D3Z1; Vysis), labeled in SpectrumRed. (C) Probe for *c-MPL* gene (BAC RP11-297L5, 190 Kb), located at 1p34, labeled in SpectrumGreen-dUTP cohybridized with the centromeric probe for chromosome 1 (D1Z5; Vysis), labeled in SpectrumOrange. Map not drawn to scale

Table 1
PRV-1 (BAC RP11-160A19), *TPO* (BAC RP11-45NP16) and *c-MPL* (BAC RP11-297L5) FISH results in ET patients
 (a minimum of 300 nuclei were analyzed)

| Patient | PRV-1 (BAC RP11-160A19) | | | TPO (BAC RP11-45NP16) | | | c-MPL (BAC RP11-297L5) | | |
|---------|----------------------------|----------|--------|--------------------------|----------|--------|---------------------------|----------|--------|
| | % Loss | % Normal | % Gain | % Loss | % Normal | % Gain | % Loss | % Normal | % Gain |
| 1 | 0.7 | 97 | 2.3 | 0.8 | 96.9 | 2.3 | 0.7 | 98.3 | 1 |
| 2 | 0 | 99.3 | 0.7 | 0.7 | 98 | 1.3 | 1.3 | 98 | 0.7 |
| 3 | 0.3 | 99.7 | 0 | 2.5 | 96.5 | 1 | 0 | 100 | 0 |
| 4 | 1 | 98.7 | 0.3 | 1 | 98 | 1 | 1.7 | 97 | 1.3 |
| 5 | 0.7 | 97.6 | 1.7 | 3.3 | 95.7 | 1 | 0.3 | 99.7 | 0 |
| 6 | 2 | 98 | 2 | 1.5 | 96.7 | 1.8 | 0.3 | 99.4 | 0.3 |
| 7 | 1.7 | 98 | 0.3 | 2.8 | 96.4 | 0.8 | 0.7 | 99.3 | 0 |
| 8 | 2.7 | 96.6 | 0.7 | 1.8 | 97.4 | 0.8 | 0.7 | 98.6 | 0.7 |
| 9 | 1.3 | 98 | 0.7 | 2.5 | 95 | 2.5 | 0.7 | 98.6 | 0.7 |
| 10 | 0 | 100 | 0 | 0 | 99 | 1 | 0.7 | 99 | 0.3 |
| 11 | 0.7 | 98.6 | 0.7 | 3 | 93.7 | 3 | 1.3 | 98 | 0.7 |
| 12 | 1 | 98 | 1 | 0 | 98 | 2 | 2.3 | 97.7 | 0 |
| 13 | 2.7 | 96.6 | 0.7 | 3.3 | 95.2 | 1.5 | 1.3 | 97.7 | 1 |
| 14 | 2.3 | 97.4 | 0.3 | 1.8 | 96.8 | 1.4 | 3 | 96.7 | 0.3 |
| 15 | 1.3 | 98.4 | 0.3 | 0.3 | 97.4 | 2.3 | 1.3 | 99.7 | 0 |
| 16 | 2.3 | 97 | 0.7 | 0.7 | 97.6 | 1.7 | 0.3 | 99.4 | 0.3 |
| 17 | 0.7 | 98.3 | 1 | 1 | 98.3 | 0.7 | 1.3 | 98 | 0.7 |
| 18 | 1 | 98 | 1 | 1.7 | 96 | 2.3 | 0.7 | 98 | 1.3 |
| 19 | 1.3 | 98 | 0.7 | 2.3 | 97.4 | 0.3 | 2 | 97 | 1 |
| 20 | 1.3 | 97.7 | 1 | 1 | 99 | 0 | 1.7 | 98 | 0.3 |
| 21 | 1 | 98.7 | 0.3 | 2 | 95 | 3 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 2.3 | 97.7 | 0 | 1.3 | 98.4 | 0.3 | 2 | 97.7 | 0.3 |
| 23 | 1 | 97.7 | 1.3 | 0.3 | 99.7 | 0 | 1 | 98 | 1 |
| 24 | 1.3 | 97 | 1.7 | 1.3 | 97.7 | 1 | 1 | 98.7 | 0.3 |
| 25 | 2.7 | 3.4 | 0.7 | 1 | 96.7 | 2.3 | 4.3 | 94.4 | 1.3 |
| 26 | 0.7 | 98.3 | 1 | 0.7 | 99.3 | 0 | 0.3 | 98.4 | 1.3 |
| 27 | 2.7 | 96.3 | 1 | 1 | 97.3 | 1.7 | 0.3 | 99.4 | 0.3 |
| 28 | 0.3 | 98.4 | 1.3 | 3.3 | 95.4 | 1.3 | 2.3 | 96.7 | 1 |
| 29 | 1.3 | 97.7 | 1 | 0.7 | 98.6 | 0.7 | 0 | 99 | 1 |
| 30 | 3.3 | 94 | 2.7 | 1 | 96.7 | 2.3 | 3 | 97 | 0 |

and then dehydrated in a series of ethanols. Probes were denatured for 5 minutes at 75°C and then placed onto the slides, which were covered with a coverslip and sealed with rubber cement. Hybridization took place at 37°C for 16 hours in a humid chamber. The coverslips were gently floated off in a 50% formamide solution, and the slides were washed three times in a 50% formamide solution

for 10 minutes each, once in 2× standard saline citrate (SSC) solution for 10 minutes and once in 2× SSC 0.1% NP-40 solution for 5 minutes. Finally, the slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI II; Vysis). Only intact, nonoverlapping nuclei were scored. A minimum of 300 interphase nuclei were analyzed.

Table 2
PRV-1 (BAC RP11-160A19), *TPO* (BAC RP11-45NP16) and *c-MPL* (BAC RP11-297L5) FISH results in healthy individuals
 (a minimum of 400 nuclei were analyzed).

| Patient | PRV-1 (BAC RP11-160A19) | | | TPO (BAC RP11-45NP16) | | | c-MPL (BAC RP11-297L5) | | |
|---------|----------------------------|----------|--------|--------------------------|----------|--------|---------------------------|----------|--------|
| | % Loss | % Normal | % Gain | % Loss | % Normal | % Gain | % Loss | % Normal | % Gain |
| 1 | 1.3 | 98.4 | 0.3 | 3.3 | 95.2 | 1.5 | 0.5 | 96.7 | 2.8 |
| 2 | 1 | 95 | 4 | 1.5 | 97.7 | 0.8 | 1.8 | 95.4 | 2.8 |
| 3 | 1 | 96 | 3 | 1 | 97 | 1 | 0.3 | 98.7 | 1 |
| 4 | 1.8 | 96.9 | 1.3 | 1 | 97 | 2 | 0.8 | 98.2 | 1 |
| 5 | 3.8 | 95.7 | 0.5 | 2 | 96.7 | 1.3 | 3.5 | 96.2 | 0.3 |
| 6 | 4 | 95.5 | 0.5 | 1.8 | 96.2 | 2 | 2.3 | 97.7 | 0 |
| 7 | 4.8 | 95.2 | 0 | 0.5 | 99.2 | 0.3 | 3.8 | 95.9 | 0.3 |
| 8 | 2.3 | 96.7 | 1 | 0.8 | 97.9 | 1.3 | 1.8 | 98.2 | 0 |
| 9 | 2 | 97.2 | 0.8 | 1.8 | 96.4 | 0.8 | 0.8 | 98.4 | 0.8 |
| 10 | 2.5 | 97.2 | 0.3 | 1.5 | 98 | 0.5 | 2 | 97.5 | 0.5 |

3. Results and Discussion

FISH study showed no *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* cytogenetic abnormalities in any of the analyzed cases. The monosomy and trisomy thresholds (mean, +3 SD) were 6.4 and 5.1% for *PRV-1*, 3.9 and 2.9% for *TPO*, and 5.4 and 4.1% for *c-MPL*, respectively (Tables 1 and 2).

To our knowledge, this is the first FISH study analyzing not only the *PRV-1* gene status, but also *TPO* and *c-MPL* in ET patients. Chromosomal abnormalities in ET detected by conventional cytogenetics are rare (5–10% of cases), being trisomies of chromosomes 8 and 9, and 13q14 and 20q12 are the regions most commonly affected with deletions [11]. There are no published data on recurrent abnormalities affecting chromosome bands 1p34, 3q27, and 19q13.2, where the *c-MPL*, *TPO* and *PRV-1* genes are located.

Our results suggest a lack of structural and numerical rearrangements (deletions, translocations, or amplifications) of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* genes detected by FISH in ET patients. The *PRV-1* gene status results are in line with those reported previously in PV patients by Najfeld et al. [8], where no abnormalities were found. The lack of *PRV-1*, *TPO*, and *c-MPL* rearrangements, using FISH as a detection tool, does not exclude their involvement in ET pathogenesis. Other strategies that focus on mutational status, gene expression, and functional analysis should be performed in the herein analyzed genes and also in those highlighted from multiscale gene expression studies. A somatic mutation in the pseudokinase domain of the JAK2 tyrosine kinase (Val617Phe) has been detected recently in most patients with PV, as well as in one third to one half of ET and myeloid metaplasia (MMA) patients [12,13]. It would be interesting to study how this mutation contributes to the ET molecular basis and its usefulness for the diagnosis and prognosis of these patients.

Acknowledgments

The authors thank Carme Melero for her contribution and excellent technical assistance. This work was supported by grants from Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI030345), Instituto de Salud Carlos III (C03/07 and C03/10), and Shire Ibérica.

References

- [1] Kralovics R, Skoda RC. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev* 2005; 19:1–13.
- [2] Temerinac S, Klippel S, Stranck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 2000; 95:2569–76.
- [3] Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Pechal JF, Pechal JT. Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003;101:3294–301.
- [4] Westwood NB, Raj K, Messinezy M, Pearson TC. Platelet expression of Mpl is diminished in reactive thrombocytosis and in myeloproliferative disorders, but is normal in secondary erythrocytosis. *Blood* 1999;94(Suppl. 1):491.
- [5] Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2003; 102:1869–71.
- [6] Teofili L, Pierconti F, Di Febo A, Maggiano N, Vianelli N, Ascani S, Rossi E, Pileri S, Leone G, Larocca LM, De Stefano V. The expression pattern of c-mpl in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002;100:714–7.
- [7] Mesa RA, Hanson CA, Li CY, Yoon SY, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expression in essential thrombocythemia. *Blood* 2002;99:4131–7.
- [8] Najfeld V, Fuchs S, Merando P, Lezon-Geyda K, Frachman S. Fluorescence in situ hybridization analysis of the PRV-1 gene in polycythemia vera: implications for its role in diagnosis and pathogenesis. *Exp Hematol* 2003;31:118–21.
- [9] Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997;34:29–39.
- [10] Zamora L, Espinet B, Florensa L, Besses C, Salido M, Solé F. Incidence of trisomy 8 and 9, deletion of D13S319 and D20S108 loci and BCR/ABL translocation in non-treated essential thrombocythemia patients: an analysis of bone marrow cells using interphase fluorescence in situ hybridization. *Haematologica* 2003;88:110–1.
- [11] Bench AJ, Nacheva EP, Champion KM, Green AR. Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:819–48.
- [12] Kaashansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005;105:4187–90.
- [13] Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:1207–9.



- age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006; **66**: 3310–3316.
- 5 Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 1372–1379.
 - 6 Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; **106**: 3618–3620.
 - 7 Tiesmeier J, Czwalinna A, Müller-Tidow C, Krauter J, Serve H, Heil G et al. Evidence for allelic evolution of CEBPalpha mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **123**: 413–419.
 - 8 Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; **106**: 2854–2861.
 - 9 Smith LL, Pearce D, Smith ML, Jenner M, Lister TA, Bonnet D et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction method for monitoring CEBPA mutations in normal karyotype acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; **133**: 103–105.
 - 10 Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'oro MG, Gottardi E, Specchia G et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; **20**: 1103–1108.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients

Leukemia (2006) **20**, 1903–1905. doi:10.1038/sj.leu.2404341; published online 3 August 2006

Myeloproliferative disorders (MPD) are a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell malignancies that classically include four related entities: chronic myelogenous leukemia (CML), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and idiopathic myelofibrosis (IM). With the exception of IM, all of these disorders are characterized by increased hematopoiesis and overproduction of blood elements, with the predominance of one myeloid lineage. In CML, the granulocytic lineage is the most hyperplastic, whereas the erythroblastic and megakaryocytic lineage are predominantly involved in PV and ET, respectively. These diseases are characterized by a clonal hematopoiesis, which involve the hematopoietic stem cells, as all myeloid lineages are monoclonal.

A hallmark of MPD is the independence or hypersensitivity of hematopoietic progenitors to numerous cytokines. In PV, one of the most relevant characteristics is endogenous erythroid colony formation (eBFU-E). Erythroid progenitor cells proliferate in semisolid cultures in the absence of exogenous erythropoietin (EPO). Similar growth pattern is observed in a significant proportion of patients with ET and IM, but never in healthy individuals. Some studies have revealed that erythroid colony formation (BFU-E) in PV are hypersensitive not only to EPO but also to several other hematopoietic growth factors, including interleukin (IL)-3, stem cell factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), insulin-like growth factor and thrombopoietin (TPO). Several studies have revealed that megakaryocytic colony formation (CFU-Mk) is growth factors-independent in the majority of ET patients. This endogenous megakaryocytic colony formation (eCFU-MK) has also been shown, but in a lesser degree, in some PV, IM and even in CML, but not in reactive thrombocytosis.

Recently, the existence of an activating mutation of Janus kinase 2 (JAK2) tyrosine kinase in granulocytes has been reported in a high proportion of patients with MPD^{1–4} (80% of PV, 50% of ET and 50% of IM). JAK2 is a cytoplasmic tyrosine kinase with a key role in signal transduction from diverse cytokines and growth factors (extracellular ligands), including those for IL-3, IL-5, EPO, GM-CSF, granulocyte colony-stimulating-factor receptor (G-CSF) and TPO, all of which play a major role in myeloid development. The JAK2 V617F is located in the pseudokinase domain of the JAK2 gene, a region

that inhibits JAK2 kinase activity. This mutation in the pseudokinase autoinhibitory domain results in a constitutive kinase activity and induces cytokine hypersensitivity or independence of factor-dependent cell lines.^{1–4} On the other hand, Lu et al.⁵ have shown that coexpression of the JAK2 V617F mutant kinase with a homodimeric type I cytokine receptor (such as the EPO receptor, the TPO receptor or the G-CSF receptor) is necessary for transformation of hematopoietic cells to growth factor independence and for hormone-independent activation of JAK-STAT signaling pathway. This phenomenon reveals the molecular basis for the prevalence of JAK2 V617F in diseases of myeloid lineage cells that express these type I cytokine receptors, but not in lymphoid lineage cells that do not.

The incidence of JAK2 mutation in ET patients ranges from 25 to 57% depending on the study. These variation is likely owing to the sensitivity of the assay used to detect JAK2 V617F and the cell type analyzed (variability of the implication of different myeloid lineages in ET). In the majority of reports, the JAK2 V617F has been described in whole blood or isolated granulocytes, whereas limited information to referred to platelets and no data have been reported in isolated megakaryocytes.⁶ The aim of the present study was to analyze the presence of the JAK2 V617F in megakaryocytic cells obtained from peripheral blood *in vitro* cultures and in the remaining myeloid cells: peripheral blood granulocytes and platelets, as well as erythroid and granulomonocyte colonies obtained from peripheral blood *in vitro* cultures of patients with ET.

We have evaluated six newly diagnosed ET patients according to the WHO's diagnostic criteria. Written informed consent was obtained from every patient. All the assays were determined at diagnosis.

In vitro cultures were performed as reported previously.⁷ Twenty milliliter of venous blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid and immediately processed. Neutrophils were isolated by Lymphoprep (1077 g/ml) density gradient, followed by dextran sedimentation. Total RNA was isolated from granulocytes or platelets using guanidinium thiocyanate method (Ultraspec; Biotecx Laboratories, Houston, TX, USA). cDNA was reverse transcribed from 1 µg of total RNA with Murine Moloney Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the standard procedures with random hexamers.

Isolated colonies from *in vitro* cultures were carefully aspirated and washed with phosphate-buffered saline. RNA

extraction was performed using the Genelute Mammalian Total RNA miniprep kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). cDNA was reverse transcribed using the high-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Analysis of JAK2 V617F was performed by direct sequencing using cDNA from granulocytes or purified colonies. Primers were designed using the Primer Express software and were as follows: forward: 5'-TTGGCCAAGGCACCTTTACAA-3' and reverse: 5'-TAGTGATCCAAATTTACAACTCTGA-3'. Sequencing was performed with BigDye version 3.1 (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions and analyzed on an ABI3100 Sequencer (Applied Biosystems). In non-conclusive cases, allele-specific polymerase chain reaction (PCR) was performed as described previously.¹

All patients showed eBFU-E and/or eCFU-MK colony formation. These results are in agreement with others and with our previous experience in which we demonstrated eBFU-E and/or eCFU-MK in 85% of ET patients^{7,8} (unpublished data) and confirms the myeloproliferative nature of this entity.

JAK2 mutation in granulocytes from peripheral blood by direct sequencing was detected in two out of six ET patients. When allele-specific PCR was used, the mutation was found in

five out of six ET patients (no. 1-5). In patient no. 6, JAK2 mutation was not demonstrated by any of the two techniques. These results demonstrate the higher sensitivity of allele-specific assay and are in line with others and with our previous experience^{1-4,8} (Table 1). In five patients (no. 1-5), JAK2 V617F was demonstrated not only in granulocytes from peripheral blood but also in megakaryocytes and erythroblasts from endogenous colonies. In patient no. 6, JAK2 V617F was not found in erythroblasts from BFU-E, megakaryocytes from CFU-MK, granulocytes from granulocyte-macrophage colony formation nor in granulocytes from peripheral blood.

To further analyze the megakaryocytic lineage involvement in the patients included, we studied the JAK2 V617F in platelets from these patients, except for one of them from which no platelets were available. The mutation was detected in all patients in which the eCFU-MK were mutated and was negative in patient no. 6 who was also negative for eCFU-MK (Figure 1).

ET is considered to be a clonal disease with the majority of myeloid lineages belonging to the same clone. Several reports have demonstrated JAK2 V617F in different myeloid lineages: erythroblasts, granulocytes and platelets in patients with MPD.

Table 1 JAK2 V617F analysis in different myeloid (granulocytes, platelets, BFU-E, CFU-MK and CFU-GM) in essential thrombocythaemia patients

| Patient | Diagnoses | PB granulocytes sequencing/allele-specific PCR | In vitro cultures | | | | | PB platelets |
|---------|-----------|--|-------------------|--------|--------|---------|--------|--------------|
| | | | BFU-E | eBFU-E | CFU-MK | eCFU-MK | CFU-GM | |
| 1 | ET | M | ND | M | ND | M | ND | M |
| 2 | ET | NM/M | ND | M | ND | M | ND | M |
| 3 | ET | NM/M | M | M | ND | M | ND | ND |
| 4 | ET | NM/M | ND | M | ND | M | ND | M |
| 5 | ET | M | M | M | ND | M | ND | M |
| 6 | ET | NM/NM | NM | | NM | NM | NM | NM |

Abbreviations: BFU-E, erythroid colony formation; CFU-GM, granulocyte-macrophage colony formation; CFU-MK, megakaryocytic colony formation; eBFU-E, endogenous erythroid colony formation; eCFU-MK, endogenous megakaryocytic colony formation; ET, essential thrombocythaemia; M, mutated; ND, not done; NM, non-mutated; PB, peripheral blood.

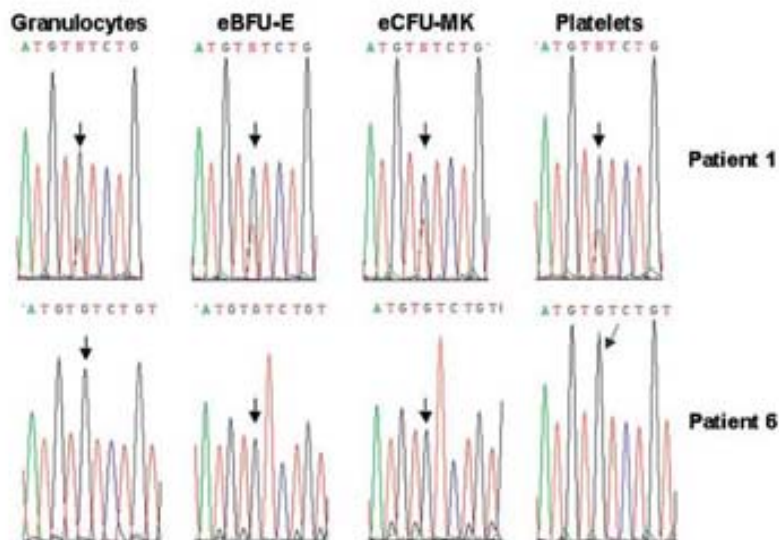


Figure 1 JAK2V617 analysis by sequencing in cell populations (granulocytes, eBFU-E, eCFU-MK and platelets) of a representative mutated case (upper panels) and a non-mutated case (lower panels).



In the current study, JAK2 V617F has been simultaneously analyzed in granulocytes, erythroblasts, megakaryocytes and platelets from the same patient. The results found in the first five ET patients (no. 1–5) demonstrated that myelopoiesis in these patients is entirely clonal and is related to JAK2 V617F. This mutation was not found in one patient who showed eCFU-MK formation; nevertheless, this patient had monoclonal myelopoiesis (as determined by the human androgen receptor gene polymorphic marker clonality assay) (results not shown). These results support the hypothesis that some cases of true ET might be related to other molecular defects, as already has been suggested in the literature.

In our experience, all ET patients with JAK2 V617F in peripheral blood granulocytes carry the mutation in the platelet-megakaryocytic lineage. This is the lineage predominantly involved in ET and indicates that in ET the mutation should be searched by more sensitive techniques and directly on platelets.

In conclusion, our study describes the presence of JAK2 V617F in all myeloid cells including the megakaryocytic lineage. These results strongly support the implication of different myelopoietic cell lineages in ET and confirm the biological heterogeneity of this disease.

Acknowledgements

This work was supported by the Grants FIS PI030345, C03/07 and C03/10 from the Spanish Ministry of Health.

L Florensa^{1,2}, B Bellosillo^{2,3}, C Besses^{2,4}, E Puigdecamet^{1,2,3}, B Espinet^{2,3}, E Pérez-Vila^{1,2}, R Longarón³, RM Vilà¹, F Solé^{2,3} and S Serrano^{1,2,3}

¹Laboratori de Citologia Hematològica, Departament de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain;

²Unitat de Recerca en Neoplàsies Hematològiques-Parc Recerca Biomèdica Barcelona (URNHE-PRBB), Barcelona, Spain;

³Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Departament de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain and

⁴Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain
E-mail: e0038@imas.imim.es

References

- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**: 1054–1061.
- 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.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; **434**: 1144–1148.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1779–1790.
- Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 18962–18967.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; **366**: 1945–1953.
- Florensa L, Besses C, Woessner S, Solé F, Acín P, Pedro C et al. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythemia. *Leukemia* 1995; **9**: 271–273.
- Bellosillo B, Besses C, Florensa L, Solé F, Serrano S. JAK2 V617F mutation, PRV-1 overexpression and endogenous erythroid colony formation show different coexpression patterns among Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; **102**: 18962–18967.

High ZAP-70 expression correlates with worse clinical outcome in mantle cell lymphoma

Leukemia (2006) **20**, 1905–1908. doi:10.1038/sj.leu.2404362; published online 17 August 2006

Zeta-associated protein 70 (ZAP-70) is a ζ -chain, CD3-receptor-associated protein tyrosine kinase (PTK) that is critical for initiating T-cell signaling. Relatively little is known with regard to its function in B cells, although there is evidence that ZAP-70 may enhance signal transduction via the B-cell receptor complex. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), the presence of >20% of ZAP-70-positive CLL cells detectable by flow cytometry was found to correlate with rapid disease progression and shorter overall survival in stage Binet A patients.¹ High level of ZAP-70 expression also has been associated with a relative lack of somatic mutations in the variable regions of the immunoglobulin heavy chain gene (V_H), which is an established prognostic marker for CLL.² Several recent studies have confirmed that ZAP-70 is expressed in a subset of mantle cell lymphoma (MCL).^{3–5} In this study, we aimed to determine if ZAP-70 carries any clinical significance in newly diagnosed MCL patients.

Immunohistochemistry was employed to assess ZAP-70 expression in 64 MCL tumors. The clinical characteristics of these patients are summarized in Table 1. All cases were newly diagnosed and collected between 1994 and 2003 at the Department of Laboratory Medicine and Pathology, Cross Cancer Institute. Treatment for each MCL patient was determined during our weekly lymphoma conference based on our institutional treatment protocol. For first-line treatment, 32 of the 64 patients received CHOP-based (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy, 15 had chlorambucil-based chemotherapy, and five received other treatments such as proteasome inhibitor PS341 and flavopiridol. The diagnosis of all MCL cases was based on the criteria described in the World Health Organization Classification Scheme; all cases were positive for CD5 and/or CD43 and cyclin D1, and negative for CD23. All tissues were routinely processed, formalin-fixed and paraffin-embedded. All but four cases had the small cell morphology. Three of the remaining four cases were blastoid MCL. The morphology of the other case was composed of diffuse areas of small lymphoma cells admixed with



ORIGINAL ARTICLE

Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia

E Puigdecaneet^{1,2,3,4}, B Espinet^{1,3,5}, J Lozano^{6,7}, I Sumoy⁶, B Bellosillo¹, I Arenillas^{2,3,5}, A Álvarez-Larrán⁸, F Solé^{1,3,5}, S Serrano^{1,2,3}, C Besses⁸ and L Florensa^{2,3,5}

¹Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain; ²Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain; ³GRETNHE, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁴Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ⁵Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, Barcelona, Spain; ⁶Laboratori de Microarrays, Programa de Bioinformàtica i Genòmica, Centre de Regulació Genòmica-UPF, Barcelona, Spain; ⁷Plataforma de Bioinformàtica, CIBERehd, Hospital Clinic, Barcelona, Spain and ⁸Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain

To explore the gene expression signature in essential thrombocythemia (ET) patients in relation to JAK2V617F mutational status, expression profiling in circulating granulocytes was performed. Twenty ET were studied by microarray analysis and the results were confirmed by real-time quantitative RT-PCR in 40 ET patients, not receiving cytoreductive treatment. A heterogeneous molecular signature characterized by two main gene expression patterns was found: one with an upregulation of inflammatory genes related to neutrophil activation and thrombosis, and the other with significantly lower expression of these genes. Supervised clustering analysis showed 30 genes differentially expressed between JAK2V617F-negative and JAK2V617F-positive ET patients. Among the JAK2V617F-negative, a set of 14 genes (*CISH*, *C13orf18*, *CCL3*, *PIM1*, *MAFF*, *SOCS3*, *ID2*, *GADD45B*, *KLF5*, *TNF*, *LAMB3*, *HRH4*, *TAGAP* and *TRIB1*) showed an abnormal expression pattern. In this group of patients, *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* and *PIM1* genes, all involved in JAK-STAT signalling pathway, presented a lower expression. A two-gene predictor model was built comprising *FOSB* and *CISH* genes, which were the best discriminators of JAK2V617F status. In conclusion, JAK2V617F-negative ET patients present a characteristic gene expression profile, different from JAK2V617F-positive patients. Other pathways, besides JAK-STAT, might be implicated in the pathophysiology of JAK2V617F-negative ET patients.

Leukemia advance online publication, 15 May 2008;
 doi:10.1038/leu.2008.112

Keywords: essential thrombocythemia; JAK2V617F; gene expression profiling; real-time quantitative RT-PCR

Introduction

BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders (MPDs) including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are characterized by a clonal expansion of a multipotent haematopoietic progenitor cell. ET is a heterogeneous entity characterized by increased bone marrow megakaryocytes, persistent thrombocytosis and an increased risk of thrombohaemorrhagic complications.¹ Recently, the existence of the JAK2V617F mutation has been reported in a high proportion of MPD BCR-ABL-negative patients (90% of PV,

50–60% of ET and PMF patients).^{2–6} Although the description of the JAK2V617F mutation has provided important insight into the pathogenesis of PV, ET and PMF, the molecular abnormalities associated to JAK2V617F-negative BCR-ABL-negative MPD remain unknown. Regarding ET, JAK2V617F-positive patients present clinical features resembling the PV phenotype, in contrast to JAK2V617F-negative ET patients, and according to this observation, two molecular distinct subtypes of ET have been proposed.⁷ The constitutive kinase activity of V617F mutation causes cytokine-independent activation of the JAK-STAT, PI3K-AKT and Ras-MAPK pathways. This multiple pathway activation results in the independence or hypersensitivity of haematopoietic progenitors to numerous cytokines, a hallmark of MPD.^{2–5} Recently, mutations involving exon 12 of the JAK2 gene in PV^{8,9} and MPLW515L mutation in approximately 10% of JAK2V617F-negative PMF and in a smaller proportion of ET have been reported.¹⁰ However, in more than 40% of ET patients a molecular marker is still lacking.

Global gene expression analysis has been used as a powerful tool to provide insight into the molecular aetiology of haematologic malignancies. Granulocytes with altered gene expression have been detected in PV^{11–13} and new markers have been defined in relation to JAK2V617F.¹⁴ Recently, distinct gene expression subclasses in ET in relation to JAK2V617F status have been described by using cDNA microarrays.¹⁵

Our aim was to characterize the gene expression profile of peripheral blood granulocytes in ET using whole genome oligonucleotide microarray technology and real-time quantitative RT-PCR. The objective was to extend the set of markers for ET and analyse the relation between gene expression data, JAK2V617F status and clinical manifestations of the disease.

Patients and methods

Patients

A total of 40 cases (28 women/12 men) with a median age of 54 years (ranging from 31 to 85 years), diagnosed with ET according to the WHO criteria (2001), who had never received cytoreductive treatment were studied. At the time of diagnosis four patients had presented thrombotic events and three patients had shown haemorrhages. Among the 40 patients, 32 presented at least one of the following clonality markers: JAK2V617F, positivity for HUMARA assay and myeloid endogenous growth. JAK2V617F was detected in 52.5% (21/40) patients, always in

Correspondence: Dr L Florensa, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia-GRETNHE, Hospital del Mar, Pg. Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain.
 E-mail: epuigdecaneet@imim.es
 Received 4 July 2007; revised 2 April 2008; accepted 4 April 2008



heterozygosity, with a percentage of mutant alleles ranging from 7.8 to 40.7% (mean of 28.3%). Among the 17 out of 28 informative women, seven showed clonality by the HUMARA assay. Out of 40 patients, 26 showed endogenous myeloid growth (eBFU-E and/or eCFU-MK). Out of 19 JAK2V617F-negative patients, 11 presented HUMARA clonality and/or myeloid endogenous growth. Therefore, only eight patients did not present any clonal marker. We analysed the association between presence or absence of JAK2V617F and clinico-biological data from all patients (Table 1). Ten healthy individuals (5 women/5 men) with age ranging from 25 to 58 years and with a normal blood cell count were used as assay validation controls. The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained from all patients, according to the Declaration of Helsinki.

RNA extraction

Venous blood (20 ml) was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and immediately processed. Granulocytes were isolated as previously described¹⁶ and total cellular RNA from each sample was isolated from 10×10^6 granulocytes using a guanidinium thiocyanate-based method (Ultraspec; Biotech Laboratories, Houston, TX, USA) following the protocol supplied by the manufacturer.

RNA quality was assessed by nanoelectrophoresis using the Nano lab-on-a-chip assay for total eukaryotic RNA (Bioanalyzer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Only samples with RNA integrity number >7 were subsequently used in microarray experiments.

Microarray analysis

RNA labelling and hybridization. In each experiment, RNA obtained from granulocytes from a single ET patient was compared with a pool of granulocyte RNAs from 10 healthy individuals. Total RNA (500 ng) were reverse transcribed into cDNA and amplified by *in vitro* transcription in the presence of fluorescent-labelled CTP using the Low Input RNA Labelling and Amplification Kit from Agilent following the manufacturer's instructions.

Each microarray was hybridized with 750 ng of each amplified cRNA labelled with Cy5 or Cy3 at a specific activity between 7 and 15 pmol/ μ g. Duplicate hybridizations were performed for each comparison with dye swapping to control for possible differences in the incorporation rate of the Cy5 and Cy3 fluorochromes. Microarray expression profiles were obtained using Whole Human Genome oligonucleotide microarrays (G4112A, Agilent), comprising 41 000 60-nt oligonucleotide probes, most represented as single spots, using the protocol recommended by Agilent with SSC-based washes.

Scanning and analysis. Fluorescent images were obtained using an Agilent G2565BA scanner. Fluorescence intensity data were extracted and quantified using GenePix 6.0 (Molecular Dynamics).

Only spots with signal intensities twice above the local background, not saturated and not flagged as absent by GenePix, were considered reliable and used for subsequent analysis. Normalized log₂ratios were scaled between arrays to make all data comparable. Statistically significant differences in gene expression were determined by computing a Bayesian statistic using all log₂ratios from replicate hybridizations.

Target genes were considered as differentially expressed when their empirical Bayes statistic B was higher than 15 (B_rank $>98\%$). All quantitative and statistical analyses were performed using MMARGE tool, a web implementation of the Limma package in the R environment.^{17,18}

Supervised classification of ET samples into categories according to clinical and biological parameters based on gene expression profiles was performed using standard two-tailed Student's test using the *t*-test function from R (<http://www.cran.r-project.org>) and was used to determine statistical significance of differential gene expression. Gene Ontology terms for annotated genes and common pathways were analysed using the Ingenuity Pathways Analysis software (Ingenuity Systems Inc.) and the FATIGO + gene ontology-based application (<http://fatigo.bioinfo.cnio.es/bioinfo/>).¹⁹ The differentially expressed gene lists were linked to the Internet genome databases (that is, GeneCards, GenBank, Swiss Prot, Online Mendelian Inheritance in Man).

Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>)

Table 1 Main clinico-biological data at diagnosis of the 40 ET patients in relation to JAK2 status

| | JAK2V617F-positive (n = 21) | JAK2V617F-negative (n = 19) | P-value |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| Age ^a | 52 (31–76) | 55 (35–85) | NS |
| Sex | 15F/6M | 13F/6M | NS |
| Platelets ($\times 10^9$ per l) ^b | 719.29 (± 235.60) | 832.61 (± 243.08) | NS |
| WBC ($\times 10^9$ per l) ^b | 9.12 (± 2.57) | 7.97 (± 1.33) | 0.097 |
| Haemoglobin (g per 100 ml) ^b | 14.6 (± 1.4) | 13.5 (± 1.6) | NS |
| Increased LDH | 3/20 | 5/19 | NS |
| LAP index ^c | 86.17 (± 30.89) | 55.64 (± 16.28) | 0.002 |
| Splenomegaly | 1/21 | 1/19 | NS |
| Thrombotic events | 2/21 | 2/19 | NS |
| Haemorrhagic events | 0/21 | 3/19 | NS |
| Cardiovascular risk factors | 10/21 | 8/19 | NS |
| % JAK2V617F alleles ^a | 28.3% (7.8–40.7%) | — | NA |
| HUMARA clonality | 2/7 | 5/10 | NS |
| Myeloid endogenous growth (eBFU-E and/or eCFU-MK) | 18/21 | 8/18 | 0.015 |
| eBFU-E | 17/21 | 1/18 | <0.001 |
| eCFU-MK | 15/21 | 8/18 | 0.112 |
| Increased PRV-1 | 10/20 | 1/19 | 0.003 |

Abbreviations: eBFU-E, erythroid endogenous growth; eCFU-MK, megakaryocytic endogenous growth; ET, essential thrombocythemia; F, female; LAP, leucocyte alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase; M, male; NA, not applicable; NS, not statistically significant.

^aMedian value (range) is reported.

^bMean value (\pm s.d.) is reported.

and are accessible through GEO Series accession number GSE11003.

Real-time quantitative RT-PCR analysis by TaqMan low density arrays

On the basis of array results, we evaluated expression levels of selected genes by real-time quantitative RT-PCR analyses using the TaqMan Low Density Arrays (LDA platform, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in all patients. cDNA was reverse transcribed from total RNA with random primers using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), as described by the manufacturer. TaqMan PCR reactions were performed on cDNA samples using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, and fluorescence was detected in an ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). Cycle threshold (C_t) values were calculated by the ABI PRISM software, and relative gene expression levels were expressed as the difference in C_t values (ΔC_t) of the target gene and the geometric mean of the three housekeeping genes: *18S rRNA* (eukaryotic 18S ribosomal RNA), *GUSB* (glucuronidase, beta) and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).²⁰ $\Delta\Delta C_t$ values were calculated for each sample using the mean of its ΔC_t subtracted from the mean ΔC_t value measured in the pool of the 10 healthy subjects, considered as a calibrator. Gene expression quantification was achieved using the comparative C_t method for relative quantification, in which the amount of target is expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. We designed two different LDA platforms, containing 96 and 48 assays in duplicate, which were selected according to the microarray results (see Supplementary Table 1 and 2). Supervised classification of ET samples based on real-time quantitative RT-PCR results into categories according to clinical and biological parameters was performed as described above (Microarray data analysis).

Statistical analyses of the clinical and biological data

Statistical analyses of the clinical and biological data and their relationship with the gene expression data were performed using the SPSS12 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Differences between normally distributed group data were analysed by the unpaired Student's *t*-test, as well as one-factor analysis of variance (ANOVA) and nonparametric tests when appropriate. The χ^2 -test was used to compare categorical variables among groups. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Predictor modelling

Predictor model was constructed on a training data set and evaluated on an independent test data set. We used the misclassification-penalized posterior algorithm (MiPP).²¹ MiPP is based on stepwise incremental classification modelling for discovery of the most parsimonious prediction models. Model training was performed using different classification algorithms including linear discriminant analysis, quadratic discriminant analysis, support vector machine learning and logistic regression.

Results and discussion

Global gene expression patterns in ET

A flow-chart describing the design of the entire study is provided in Figure 1. Analysing the microarray data from the first 20 patients studied (patients 1–20), a common gene expression signature was found in 17 out of 20 ET patients (patients 1–17)

compared to the healthy control pool. The other three patients (patients 18–20) showed a different gene expression pattern, being independent among them, and were considered outliers. The signature of the first 17 patients was composed of 124 upregulated and 14 downregulated genes, with >2 -fold changes over control granulocytes.

Applying Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) of the 124 upregulated genes, 42 were implicated in the immune response ($P < 0.0003$), 39 of them were involved in the development and function of the haematological system ($P < 0.0005$) and 34 were related to cancer ($P < 0.0004$). We studied common pathways for these genes, detecting two main networks related to the immune response ($P < 0.05$). One important network comprised 24 genes, among which *TNF* and *IL-1* were overexpressed. These genes are the main initiators of the immune and inflammatory responses. Another network more related to haematological development and function comprised 39 overexpressed genes. These genes were directly involved in neutrophil chemotaxis (*CXCL2*, *PPBP*, *CCL4*, *CCL3*, *CCL20* and *CCL23*), neutrophil adhesion (*ICAM1*), complement and coagulation mediators (*PLAU*, plasminogen activator, urokinase, and *PLAUR*, *PLAU* receptor) and other relevant molecules, such as *OSM*, *PTGS2*, *ETS2*, *CD83* and *EDN1*. These findings suggest that there is an activation of the immune response in ET patients over healthy controls.

We selected a set of 96 genes, including 81/124 of the most upregulated and 9/14 of the most downregulated with functional annotation (comprising all the above referred genes), 3 other genes previously described as associated with MPDs (*CD44*, *NFE2* and *ANKRD15*),^{11,12,14} and *18S rRNA*, *GAPDH* and *GUSB* genes as endogenous controls. This set of 96 genes was validated by real-time quantitative RT-PCR in the same cohort of 20 patients previously studied by microarrays. The concordance between the two assays, calculated using the Spearman correlation test, was high for most of the genes validated, with a mean correlation coefficient across 17 samples of 0.76 (s.d. = 0.06). Subsequently, 20 additional ET patients (patients 21–40) were studied using the 96 gene custom designed LDA platform, expanding the series to 40 patients. A hierarchical clustering of the gene expression data of the 96 genes in the 40 patients studied showed a classification into two main groups. The first one (group A) comprised 18 patients, showing the common expression pattern found in the microarray data (which was characterized by 81 genes upregulated and 9 downregulated, in relation to control granulocytes). The other cluster (group B) included a set of 22 patients. In this cluster two subgroups were observed: one of them (group B.1) comprised 9 patients and the other (group B.2) included 13 patients. Concerning expression data of the different patient clusters (groups A, B.1 and B.2), one-factor ANOVA test confirmed a progressive decrease in expression levels of certain genes in the three respective clusters (genes with *F* ratio > 33 were *ARL8*, *CCL3*, *CCL4*, *CD83*, *CXCL2*, *DUSP2*, *EDN1*, *ICAM1*, *IL1A*, *IL1RN*, *KLF10*, *MAFF*, *NFKBIZ*, *PLAU*, *PLEK*, *PLEKHG2*, *PLK2*, *PTX3*, *TNF*, *TNFAIP3*, *XBPI* and *ZFP36*). In addition, the same test confirmed that the nine downregulated genes in microarray analysis (*AP3MI*, *ARRDC3*, *C4BPA*, *CIQC*, *DDX28*, *SOLH*, *SOX4*, *TBCC*, *ZNF217*) had similar expression levels in the patients studied, as some other genes such as *B2M*, *CCL23*, *CD44*, *NBN*, *NFE2*, *RABGEF1* and *RBF600*. Cluster data are shown in Figure 2.

We did not find any statistically significant association between the two cluster-derived patient groups and the clinical and biological parameters described in Table 1. However, three

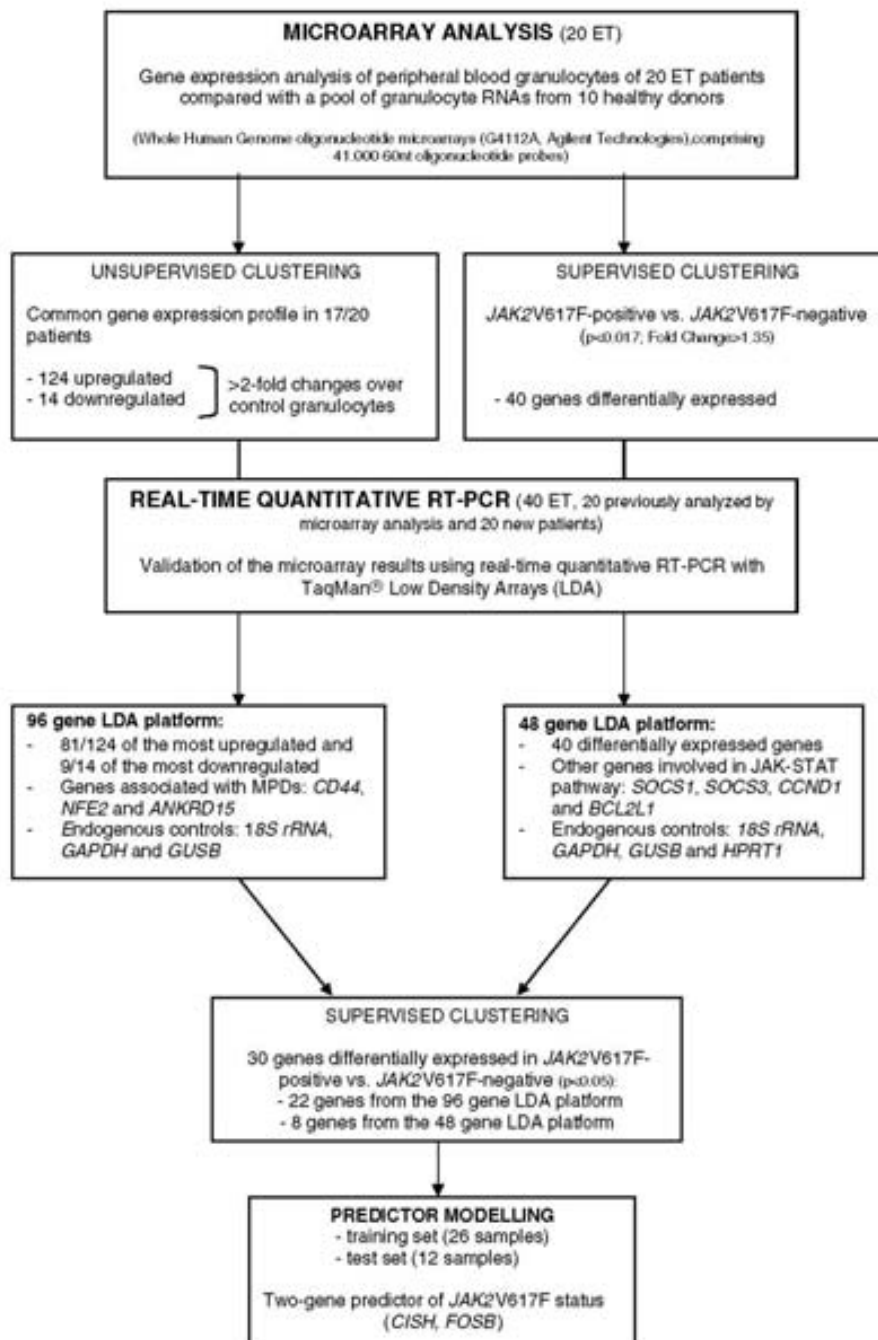


Figure 1 Flow-chart describing the design of the study.

out of four patients that presented thrombotic complications were included in group A. Moreover, 76.9% (10/13) patients in group B.2 were JAK2V617F-positive.

Besides, an overexpression of NFE2 and downregulation of ANKRD15 has been described in PV.^{12,14} In our results, the expression of NFE2 and ANKRD15 genes is not altered in ET patients and is similar to healthy controls. We detected an upregulation of CD44 in ET patients, also previously reported in

PV patients.¹¹ CD44 is an adhesion molecule involved in cell-cell contact between progenitor cells and stromal cells and might therefore be important for haemopoiesis, in proliferation of progenitor cells and myeloid differentiation,²² as well as in the pathophysiology of bone marrow fibrosis.²³

It is remarkable that some overexpressed genes in group A in relation to group B are involved in the immune response. An activated neutrophil phenotype has been described by Falanga

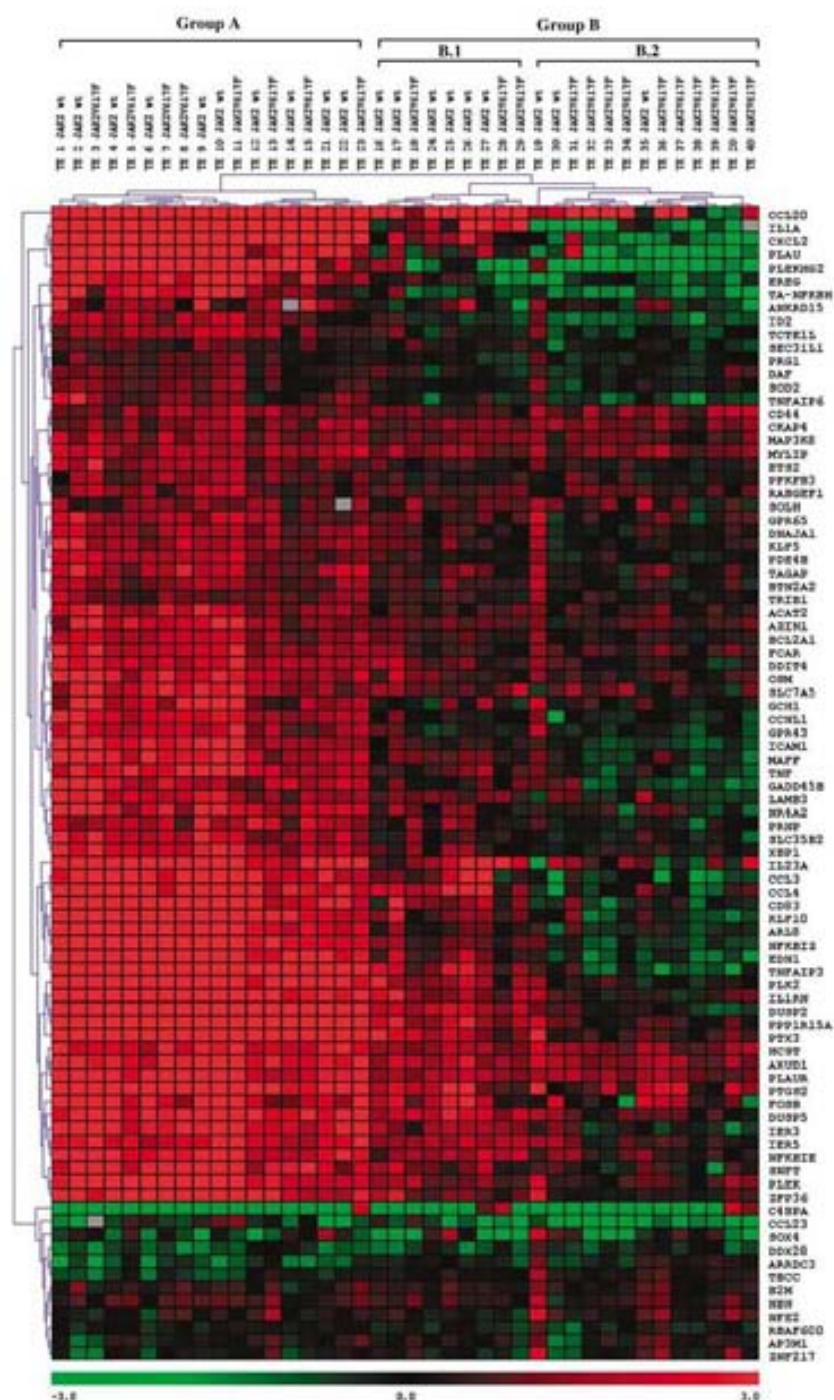


Figure 2 Gene expression profiling in 40 essential thrombocythemia (ET) patients using the 96 TaqMan Low Density Arrays platform (LDA). Among the 96 genes assayed, gene expression data of 67 genes is shown. The rest of assays data are not shown because in six genes (*CIQC*, *CNGB1*, *HLA-G*, *UMS1*, *MTM* and *PHACTR1*) no amplification was detected in any of the samples studied, and three genes (*18S rRNA*, *GAPDH* and *GLUS8*) were used as endogenous controls. A hierarchical clustering (Euclidean distance Complete Linkage) of the gene expression data of the 96 genes in 40 patients studied showed a classification into two main groups: A and B. In this cluster B two subgroups were observed: B.1 and B.2. The columns represent individual patients and the rows represent specific genes. The expression values are the \log_2 ratios between every patient and the control pool. Grey squares depict missing data points.



et al.²⁴ in ET and PV patients. These authors have proposed a probable role for leucocytes in the thrombosis of ET. On the other hand, a high monocyte and platelet activation has been reported in ET patients with thrombosis.²⁵ In this sense, activated leucocytes and platelets could contribute to the local injury of the endothelium by engagement of adhesion receptors and release of proteases or cytokines resulting in coagulation activation. Taking these results into account, we could hypothesize that the ET expression pattern found in group A, with overexpression of genes involved in the immune response, could primarily affect thrombosis mechanisms.

Gene expression patterns in relation to JAK2V617F

Supervised clustering of the microarray data of the 20 ET patients, showed some genes differentially expressed in JAK2V617F-positive versus JAK2V617F-negative ET. Most of these genes showed little expression differences in relation to controls.

We selected 40 of these genes, applying a cutoff based on the Bayesian moderated *t*-test (using Limma package,²⁶ $P < 0.017$; fold change > 1.35 between the JAK2V617F-positive and JAK2V617F-negative patients) and we designed a new LDA platform with 48 genes that included the 40 differentially expressed genes and the *SOCS1*, *SOCS3*, *CCND1* and *BCL2L1* genes which are directly or indirectly related to the JAK-STAT pathway. The *18S rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* and *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase) genes were used as endogenous controls. Using real-time quantitative RT-PCR, this set of 48 genes was validated in 19/20 patients previously studied by microarrays, and tested in 19 additional ET patients. A *t*-test of the gene expression data of the 38 ET patients confirmed the differential expression between JAK2V617F-positive and JAK2V617F-negative patients in 8/48 genes studied ($P < 0.052$): *CISH*, *C13orf18*, *CD44*, *PIM1*, *SOCS2*, *SOCS3*, *HRH4*, *BATF*. Among these eight genes, four were induced by the JAK-STAT pathway in response to cytokines: *CISH* (cytokine inducible SH2-containing protein), *SOCS2* (suppressor of cytokine signaling 2), *SOCS3* (suppressor of cytokine signaling 3) and *PIM1* (*PIM1* oncogene).²⁷ *SOCS2* and *SOCS3* were overexpressed in JAK2V617F-positive ET and no differences were found between JAK2V617F-negative ET and controls. *CISH* and *PIM1* expression levels in mutated patients were similar to controls, whereas a downregulation was found in JAK2V617F-negative ET patients (Table 2). These genes have been described as targets of the STATs (signal transducers and activators of transcription). *CISH*, *SOCS2* and *SOCS3* are *SOCS* family members that are activated by STATs. These three genes as well as *PIM1* act as negative regulators of the JAK-STAT signalling pathway.^{28,29} As JAK2V617F causes constitutive activation of the JAK-STAT signalling in haematopoietic cells,²⁻⁵ it consequently activates several negative feedback systems, mainly including members of the *SOCS* family, which initially might act to suppress the tumour promoting effects of the JAK2V617F oncogene.³⁰ The activation of the negative feedback of JAK-STAT pathway could explain the higher expression of *SOCS2* and *SOCS3* detected in JAK2V617F-positive ET. The lower expression of these two genes in JAK2V617F-negative ET indicates that there is no activation of the JAK-STAT pathway in these patients. The finding of similar expression levels of *CISH* and *PIM1* in mutated patients and controls could be explained by a perturbed expression or imbalances in the negative feedback system of the JAK-STAT pathway. Similarly, a recent study in MPD Philadelphia positive patients has described that BCR/ABL signalling activates several negative feedback regulatory systems

(such as JAK-STAT inhibitors).²⁸ This effect might be overcome by increased BCR/ABL signalling or by signalling via additional or alternative pathways, which subsequently causes an increased signalling in the JAK-STAT pathway. Moreover, Verdier et al.³¹ described that the overexpression of *STAT5* overcomes the inhibitory effects of *CISH* on erythropoietin signalling. To our knowledge, this is the first time that *CISH* and *SOCS3* have been described to present different expression between JAK2V617F-negative and JAK2V617F-positive ET patients. Concerning to the relative differential expression of *SOCS2* and *PIM1*, our results agree with those recently reported by Schwemmers et al.¹⁵ These authors revealed two distinct gene expression subclasses in a series of 16 ET patients in relation to JAK2V617F status, by using cDNA microarrays (home-made platform) analysing a reduced set of genes (7497 genes).

Regarding the other four differentially expressed genes, a higher expression of *BATF* (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like) and *CD44* (CD44 molecule) was detected in JAK2V617F-positive versus JAK2V617F-negative ET patients. *C13orf18* (chromosome 13 open reading frame 18) and *HRH4* (histamine H4 receptor) were downregulated in JAK2V617F-negative patients. Interestingly, *C13orf18* expression was the best marker to discriminate JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive and controls (Table 2).

On the other hand, when we applied a *t*-test to the data obtained on the 96 genes LDA platform, we found 22 genes differentially expressed between JAK2V617F-positive and JAK2V617F-negative patients ($P < 0.05$). All these 22 genes presented a lower expression in JAK2V617F-positive patients. Interestingly, the same set of genes was downregulated in the B.2 group of the unsupervised clustering obtained from the 96 genes LDA data that had a majority of cases carrying the JAK2V617F mutation. These findings support the hypothesis that there is an effect of mutational status of JAK2V617F on the granulocytic expression profile of ET patients, in agreement with other studies.¹⁵

This set of 22 genes, together with the 8 previously defined in 48 genes LDA, established a group of 30 genes that showed different expression in relation to JAK2V617F status (Table 2).

A set of genes predicts the JAK2V617F mutational status

Grouping real-time PCR results from the two LDA custom designs (137 genes plus 4 endogenous controls) we sought to obtain a gene expression signature that differentiated JAK2V617F-positive and JAK2V617F-negative ET. The predictor model was constructed on the training data set (26 samples) and evaluated on an independent test data set (12 samples). We performed an exhaustive sequential search to select the genes with the lowest error classification in the training set and optimal prediction power in the independent set. Applying successive runs of MiPP R package, using linear discriminant analysis and the settings (*n.seq* = 20, *n.split* = 100, *n.fold* = 10, *n.split.eval* = 100) and changing the number of preselected genes (using *percent.cut* parameter), two models with an error rate lower than 20% in test set were selected: the first model was a three gene predictor, including *CISH*, *FOSB* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue B) and *SOCS2*, with validation error rates of 15.38% in the training set and 16.67% in the test set (*percent.cut* = 0.3). The second model, comprising only the genes *CISH* and *FOSB*, yielded an error rate of 11.54% in the training set and of 16.67% in the test set (*percent.cut* = 0.02). It is noteworthy that the two genes with highest predictive value were consistently recovered in all predictor models (Figure 3). These results highlight the power of

Table 2 Genes differentially expressed between JAK2V617F-positive and JAK2V617F-negative ET patients ($P < 0.052$)

| Symbol | Gene description | GenBank accession no. | Taqman assay | Fold change vs control pool | | Differential FC JAK2V617F-positive/ JAK2V617F-negative | P-value |
|-------------|---|-----------------------|---------------|-----------------------------|--------------------|--|---------|
| | | | | JAK2V617F-positive | JAK2V617F-negative | | |
| CISH | Cytokine inducible SH2-containing protein | NM_013324 | Hs00367082_g1 | -1.33 | -2.79 | 2.08 | 0.0062 |
| FOSB | FSU murine osteosarcoma viral oncogene homologue B | NM_006732 | Hs00171851_m1 | 1.87 | 5.32 | 0.35 | 0.0204 |
| C13orf18 | Chromosome 13 open reading frame 18 | NM_025113 | Hs00228336_m1 | -1.17 | -1.63 | 1.39 | 0.0047 |
| CD44 | CD44 molecule (Indian blood group) | NM_000610 | Hs00153304_m1 | 1.81 | 1.49 | 1.22 | 0.0060 |
| IEF3 | Immediate early response 3 | NM_003897 | Hs00174674_m1 | 1.64 | 3.80 | 0.43 | 0.00748 |
| HCS1 | Haematopoietic cell signal transducer | NM_014266 | Hs00367159_m1 | 2.58 | 3.82 | 0.68 | 0.00603 |
| COL3 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 | NM_002863 | Hs00234142_m1 | 1.27 | 3.94 | 0.32 | 0.01113 |
| PIM1 | Pim-1 oncogene | NM_002648 | Hs00171473_m1 | -1.28 | -1.77 | 1.37 | 0.01263 |
| MAFF | v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue F (avian) | NM_012323 | Hs00544822_m1 | 1.37 | 2.73 | 0.50 | 0.01352 |
| PPP1R15A | Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | NM_014330 | Hs00168585_m1 | 3.09 | 7.06 | 0.44 | 0.01378 |
| KLF10 | Kruppel-like factor 10 | NM_005655 | Hs00164622_m1 | 1.55 | 3.68 | 0.42 | 0.01403 |
| SOC3 | Suppressor of cytokine signalling 3 | NM_003955 | Hs00269575_s1 | 1.46 | -1.04 | 1.52 | 0.01823 |
| ID2 | Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | NM_002165 | Hs00747378_m1 | -1.36 | 1.21 | 0.61 | 0.01891 |
| TNFAIP3 | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | NM_006280 | Hs00234713_m1 | 1.81 | 5.57 | 0.32 | 0.01814 |
| COL4 | Chemokine (C-C motif) ligand 4 | NM_002984 | Hs00660148_m1 | 2.09 | 6.29 | 0.33 | 0.02024 |
| GADD45B | Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | NM_015675 | Hs00166587_m1 | 1.10 | 2.15 | 0.51 | 0.02580 |
| TNFAIP6 | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | NM_007115 | Hs00200180_m1 | -1.42 | 1.22 | 0.57 | 0.02565 |
| TA-NFKB1 | T-cell activation NFKB-like protein | NM_139239 | Hs00262018_m1 | -1.40 | 1.57 | 0.45 | 0.02767 |
| CXCL2 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | NM_002089 | Hs00601875_m1 | 1.60 | 6.88 | 0.23 | 0.02775 |
| KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | NM_001730 | Hs00156145_m1 | 1.38 | 1.98 | 0.70 | 0.03059 |
| TNF | Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | NM_000594 | Hs00174128_m1 | 1.40 | 2.69 | 0.52 | 0.03283 |
| PLEKHG2 | Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2 | NM_022835 | Hs00263943_m1 | -1.51 | 2.79 | 0.24 | 0.03572 |
| DDIT4 | DNA-damage-inducible transcript 4 | NM_019058 | Hs00430304_g1 | 1.56 | 2.49 | 0.63 | 0.04051 |
| LAMB3 | Laminin, beta 3 | NM_002228 | Hs00165078_m1 | 1.31 | 2.29 | 0.57 | 0.04114 |
| HRH4 | Histamine receptor H4 | NM_021624 | Hs00222084_m1 | -1.32 | -2.28 | 1.73 | 0.04516 |
| TAGAP | T-cell activation GTPase activating protein | NM_138810 | Hs00269284_m1 | 1.43 | 2.22 | 0.65 | 0.04650 |
| BAIF | Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like | NM_006369 | Hs00232380_m1 | 1.91 | 1.53 | 1.25 | 0.04701 |
| TRIS1 | Tribbles homologue 1 (Drosophila) | NM_025185 | Hs00179760_m1 | 1.18 | 1.48 | 0.80 | 0.04983 |
| DUSP5 | Dual specificity phosphatase 5 | NM_004419 | Hs00244839_m1 | 2.71 | 5.05 | 0.54 | 0.05023 |
| SOC2 | Suppressor of cytokine signalling 2 | NM_003877 | Hs00153304_m1 | 1.96 | -1.06 | 2.09 | 0.05126 |

The fold change (FC) were subtracted from the $2^{\Delta\Delta CT}$ real-time quantitative RT-PCR values. Genes involved in JAK-STAT pathway are in bold.



CISH and *FOSB* for the discrimination of ET patients according to *JAK2V617F* status. *CISH* is a negative regulator of the JAK-STAT signalling pathway and its expression could be altered by *JAK2V617F*. *FOSB* is an oncogene involved in the regulation of progression through cell cycle. *FOSB* upregulation in ET *JAK2V617F*-negative patients may indicate its implication in the molecular pathology of this group of ET patients. Interestingly, the differential expression of this set of genes in *JAK2V617F*-negative patients could be useful to identify other pathways besides JAK-STAT in the pathogenesis of ET.

Gene expression signature in *JAK2V617F*-negative patients

Among *JAK2V617F*-negative ET patients (that represent approximately 50% of ET), a proportion of them do not present any clonal marker, such as HUMARA clonality or endogenous myeloid growth. It would be interesting to find new biological markers that could characterize this group of patients. In our study, we defined a set of genes differentially expressed in *JAK2V617F*-negative ET patients versus *JAK2V617F*-positive and controls. Among them, the following genes showed an abnormal expression pattern (with >1.5-fold changes over control granulocytes) in *JAK2V617F*-negative patients: *CISH*, *C13orf18*, *CCL3*, *PIM1*, *MAFF*, *SOCS3*, *ID2*, *GADD45B*, *KLF5*, *TNF*, *LAMB3*, *HRH4*, *TAGAP* and *TRIB1* (Table 2). Noteworthy, the expression of these genes was not altered either in *JAK2V617F*-positive ET patients or in controls. The identification of a characteristic gene expression signature in this group of patients is worthy of consideration to identify other signal transduction pathways besides JAK-STAT involved in the pathogenesis of ET.

In conclusion, our results showed a heterogeneous molecular signature in ET patients characterized by two main gene expression patterns: one (group A) with an upregulation of inflammatory markers that could participate in neutrophil activation and thrombosis, and the other (group B) with significantly lower expression of these genes. Interestingly, we

found a group of 30 genes that showed a different expression in relation to *JAK2V617F* status. Among them, a set of 14 genes (*CISH*, *C13orf18*, *CCL3*, *PIM1*, *MAFF*, *SOCS3*, *ID2*, *GADD45B*, *KLF5*, *TNF*, *LAMB3*, *HRH4*, *TAGAP* and *TRIB1*) showed an abnormal expression pattern only in *JAK2V617F*-negative. Remarkably, in this group of patients *CISH*, *SOCS2*, *SOCS3* and *PIM1* presented a significant lower expression, all of them involved in the JAK-STAT signalling pathway. A two-gene predictor model comprising *FOSB* and *CISH* genes, which were the best discriminators of *JAK2V617F* status, was built. The identification of a gene expression signature characteristic in this group of patients is interesting to identify other signal transduction pathways besides JAK-STAT involved in the pathogenesis of ET. These data would provide new biological markers that characterize *JAK2V617F*-negative ET patients. Additional biological investigations are required to confirm these results.

Acknowledgements

This work was supported by grants FIS PI030345 and PI071009 from the Spanish Ministry of Health and Beca de Investigación FEHH. We thank Manuel Delgado, Norma Carmen Gutiérrez and Jesús M^o Hernández-Rivas from Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca and Centro de Investigación del Cáncer (CIC), for their help in microarray data analyses and Josep M Manresa from Assessorament Metodològic en Investigació Biomèdica (AMIB) Department, IMIM-Hospital del Mar, for the statistical analysis of the clinical data.

Authorship contribution: EP processed the samples, carried out the microarray study and real-time quantitative RT-PCR analysis, and wrote the manuscript; BE designed the study and wrote the paper; JLL, LS performed the statistical analysis of the microarray and the real-time quantitative RT-PCR data; BB carried out the *JAK2* analysis and provided molecular biology laboratory support; LA provided basic laboratory support; AA and CB collected the patients data; FS performed cytogenetics studies; SS was head of the laboratory that was involved in the biology studies; LF designed the study and wrote the paper. All authors reviewed and accepted the manuscript.

References

- 1 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.
- 2 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**: 1054–1061.
- 3 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.
- 4 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; **434**: 1144–1148.
- 5 Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1779–1790.
- 6 Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ et al. Mutation of *JAK2* in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood* 2006; **108**: 3548–3555.
- 7 Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and

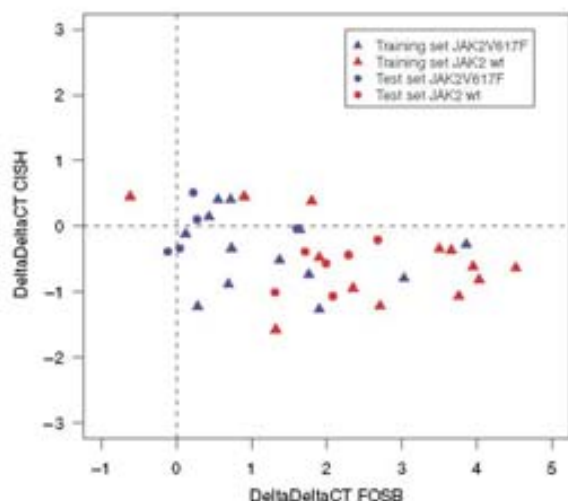


Figure 3 Diagram showing the relative expression of *CISH* and *FOSB* versus the control pool in the training data set (26 samples; 13 *JAK2V617F*-positive and 13 *JAK2V617F*-negative) and the independent test data set (12 samples; 6 *JAK2V617F*-positive and 6 *JAK2V617F*-negative). These genes show a good separation between the two *JAK2* status groups.

- relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; **366**: 1945–1953.
- 8 Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; **356**: 459–468.
 - 9 Martínez-Avilés L, Besses C, Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007; **92**: 1717–1718.
 - 10 Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; **3**: e270.
 - 11 Pellagatti A, Vetrie D, Langford CF, Gama S, Eagleton H, Wainscoat JS et al. Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology. *Cancer Res* 2003; **63**: 3940–3944.
 - 12 Goettler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, März E et al. Gene expression profiling in polycythaemia vera: over-expression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol* 2005; **129**: 138–150.
 - 13 Steidl U, Schroeder T, Steidl C, Kobbe G, Graef T, Bork S et al. Distinct gene expression pattern of malignant hematopoietic stem and progenitor cells in polycythemia vera. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1044**: 94–108.
 - 14 Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005; **106**: 3374–3376.
 - 15 Schwemmers S, Will B, Waller CF, Abdulkarim K, Johansson P, Andreasson B et al. JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling. *Exp Hematol* 2007; **35**: 1695–1703.
 - 16 Florensa L, Bellosillo B, Besses C, Puigdecanet E, Espinet B, Perez-Vila E et al. JAK2 V617F mutation analysis in different myeloid lineages (granulocytes, platelets, CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) in essential thrombocythemia patients. *Leukemia* 2006; **20**: 1903–1905.
 - 17 Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**: Article3.
 - 18 Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; **5**: R80.
 - 19 Al-Shahrour F, Minguez P, Tárrega J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JMM et al. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: W472–W476.
 - 20 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**: RESEARCH0034.
 - 21 Soukup M, Cho H, Lee JK. Robust classification modeling on microarray data using misclassification penalized posterior. *Bioinformatics* 2005; **21** (Suppl): i423–i430.
 - 22 Moll J, Khaldoyanidi S, Sleeman JP, Achtnich M, Preuss I, Ponta H et al. Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1024–1034.
 - 23 Rameshwar P, Chang VT, Gascón P. Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis. *Br J Haematol* 1996; **93**: 22–29.
 - 24 Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007; **35**: 702–711.
 - 25 Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; **91**: 169–175.
 - 26 Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer: New York, 2005, pp 397–420.
 - 27 Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000; **95**: 19–29.
 - 28 Häkansson P, Nilsson B, Andersson A, Lassen C, Gullberg U, Fioretos T. Gene expression analysis of BCR/ABL1-dependent transcriptional response reveals enrichment for genes involved in negative feedback regulation. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47**: 267–275.
 - 29 Peltola KJ, Pauku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood* 2004; **103**: 3744–3750.
 - 30 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002; **17**: 83–90.
 - 31 Verdier F, Chrétien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S et al. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28185–28190.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)