

Dokazivanje točkastih mutacija u genu za FLT3 metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Kolman, Robert

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:638534>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Robert Kolman

**Dokazivanje točkastih mutacija u genu za FLT3
metodom lančane reakcije polimerazom u
stvarnom vremenu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Hematologija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Zadro.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. Renati Zadro, na nesebičnoj potpori i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također, od srca se zahvaljujem magistri Radić Antolic na uloženom trudu i pomoći oko eksperimentalnog dijela rada.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji koji su mi bili vjerna i nepresušna podrška tijekom cijelog studija. Hvala što ste vjerovali u mene!

Hvala mojim prijateljicama i prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane i s kojima sam stvorio lijepe uspomene koje ću uvijek nositi sa sobom!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Akutna mijeloična leukemija	1
1.1.1. Patofiziologija	2
1.1.2. Podjela.....	3
1.1.3. Prognostički faktori	5
1.2. Fms-slična tirozin kinaza 3 (FLT3).....	7
1.2.1. Mutacija FLT3-ITD.....	7
1.2.2. Mutacija FLT3-TKD	10
1.2.3. Terapija FLT3 inhibitorima.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Ispitanici i uzorci	14
3.2. Oprema i reagensi.....	15
3.3. Metode	20
3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA	20
3.3.2. Priprema radnih otopina početnica i proba.....	21
3.3.3. Postupak reverzne transkripcije.....	21
3.3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	23
3.3.5. Sekvenciranje prema Sangeru	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Rezultati.....	27
4.2. Rasprava	31
5. ZAKLJUČCI	32
6. LITERATURA	33
7. SAŽETAK/SUMMARY	39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Akutne leukemije su klinički, morfološki i genetički heterogena skupina zloćudnih bolesti do kojih dolazi uslijed zloćudne transformacije krvotvornih matičnih stanica (Lichtman i Henderson, 1990). Ovisno o podrijetlu leukemijskih stanica postoji podjela na dvije skupine: mijeloične i limfocitne, dok se na temelju kliničke slike dijele na akutne i kronične.

1.1. Akutna mijeloična leukemija

Akutna mijeloična leukemija (AML) je heterogeni poremećaj karakteriziran klonalnom ekspanzijom mijeloidnih progenitora (blasta) u koštanoj srži i perifernoj krvi zbog bloka u diferencijaciji. Potpuno autonomnu i nekontroliranu proliferaciju leukemijskih blasta prati izrazito potiskivanje normalne hematopoeze, pojava leukemijskih infiltrata u drugim organima što posljedično dovodi do metaboličkih i drugih promjena u funkcioniranju ostalih organskih sustava.

Većina kliničkih simptoma AML posljedica su akumulacije zloćudnih i nedovoljno diferenciranih mijeloidnih stanica u koštanoj srži, perifernoj krvi, a često i kao infiltrati u drugim organima. Tipični nalazi bolesnika su leukocitoza, anemija i trombocitopenija, dok se bolest metabolički očituje i kroz simptome umora, anoreksije i drastičnog gubitka na težini. Dijagnoza AML utvrđuje se pozitivnim nalazom blasta u postotku većem od 20% u koštanoj srži ili perifernoj krvi (Dohner i sur., 2010). Porijeklo leukemijskih stanica može se dodatno potvrditi mjerenjem aktivnosti mijeloperoksidaze, imunofenotipizacijom ili prisutnošću Auerovih štapića, specifičnih azurofilnih citoplazmatskih inkluzija koji su karakteristični za akutnu promijelocitnu leukemiju (APL), akutnu mijelomonocitnu leukemiju te većinu AML s translokacijom t(8;21). Nadalje, pozitivan nalaz ekstramedularnih leukemijskih infiltrata ili prisutnost nekih od kromosomskih abnormalnosti, kao što su t(8;21), inv(16) ili t(15;17) uz odgovarajuću kliničku sliku može biti dovoljan za dijagnozu AML bez obzira na postotak blasta (Vardiman i sur., 2009). Unatoč većoj učinkovitosti primjene terapije kod mlađih bolesnika, prognoza u starijih bolesnika koji čine najveći postotak novooboljelih ostaje loša (Shah i sur., 2013). Ukoliko se bolest ne liječi, uzrok smrti su najčešće ozbiljne sekundarne infekcije i krvarenja. Kod čak 70% bolesnika u dobi od 67 godina ili starijih očekuje se smrtni ishod unutar jedne godine od dijagnoze (Meyers i sur., 2013). AML je ujedno i najčešća leukemija i čini 25% svih leukemija dijagnosticiranih u odraslih osoba, a medijan dobi oboljelih je 68 godina (Kumar, 2011). Bolest zahvaća češće muškarce nego žene, a

na temelju statističkih podataka prikupljenih između 2012. i 2016. godine procijenjeno je kako se godišnje javlja 4,3 slučaja na 100.000 muškaraca i žena dok će se u 2019. godini u svijetu pojaviti 21.450 novih slučajeva akutne mijeloične leukemije (www. seer.cancer.gov).

1.1.1. Patofiziologija

Iako se akutna mijeloična leukemija može razviti i kod ljudi s već postojećim hematološkim poremećajima ili kao posljedica izlaganja, primjerice alkilirajućim agensima ili ionizirajućem zračenju, ipak u većini slučajeva radi se o *de novo* leukemiji (Sill i sur., 2011). Poznate kromosomalne translokacije poput t(8:21) u vezujućem faktoru jezgre (engl. *core-binding factor*, CBF) ili t(15:17) u akutnoj promijelocitnoj leukemiji posljedično dovode do nastanka fuzijskih proteina (RUNX1-RUNX1T1, engl. *Runt-related transcription factor 1* i PML-RARA, engl. *promyelocytic leukemia gene-retinoid acid receptor alpha*) koji mijenjaju proces normalnog sazrijevanja mijeloidnih prekursorskih stanica. U više od 97% slučajeva zabilježene su i molekularne promjene te genetičke mutacije, često bez prisutnosti kromosomalnih abnormalnosti (Patel i sur., 2012). Proučavanje animalnih modela dovelo je do razvoja novih teorija prema kojima se tumači povezanost različitih mutacija sa skupinama i podskupinama akutne mijeloične leukemije (Gilliland i Griffin, 2002). Prema tom modelu, mutacije klase 1 koje aktiviraju proliferativne mehanizme u kombinaciji sa mutacijama klase 2 koje onemogućuju fiziološku hematopoetsku diferencijaciju, zajedno dovode do razvoja leukemije (Kihara i sur, 2014; Takahashi, 2011).

Najčešće mutacije klase 1, primjerice u genu za FLT3 (engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*), ITD (engl. *internal tandem duplications*) i TKD (engl. *tyrosine kinase domain mutations*), K/NRAS, TP53 i c-KIT (tirozin-protein kinaza KIT ili CD117), pojavljuju se u 4-28% slučajeva bolesti. Nadalje, u stimulaciji stanične proliferacije i preživljenja sudjeluje i STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) čija se uloga očituje u mnogim solidnim i hematološkim tumorima (Ghoshal Gupta i sur., 2008). Konstitutivna fosforilacija STAT3 može biti posredovana hipersekrecijom citokina, primjerice interleukina-6 (Schurringa i sur., 2000.) ili uzrokovana mutacijom receptorske tirozin kinaze kao što je to slučaj FLT3 duplikacije ili rjeđe, mutacije JAK2 (engl. *Janus kinase 2*) (Spiekermann i sur., 2003; Steensma i sur., 2006) te se pojavljuje u oko 50% slučajeva AML i indikator je loše prognoze.

Među značajnim mutacijama klase 2 spadaju mutacije u genu za nukleofosmin 1 (engl. *nucleolar phosphoprotein B23; nucleophosmin, NPM1*) i CEBPA (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) nađene u 27% odnosno 6% slučajeva te se povezuju s boljom prognozom, a kao zasebna kategorija mutacija često se ističu promjene u genima uključenim u epigenetičku regulaciju stanične diferencijacije i proliferacije, primjerice mutacije u genima koji reguliraju metilaciju DNA (DNMT3A, TET2, IDH-1 i IDH-2), nađene u više od 40% slučajeva akutne mijeloične leukemije (Patel i sur., 2012). Sukladno predloženom modelu, patogeneza AML ovisi i o međusobnoj interakciji somatskih mutacija i kromosomalnih abnormalnosti. Primjerice, mutacija c-KIT povezuje se sa t(8;21) ili inv(16), a zajedno doprinose analizi bolesnika u smislu prognoze. Na sličan se način i mutacija NPM1 pojavljuje zajedno sa FLT3-ITD ili DNMT3A, odnosno mutacija u drugim regulacijskim genima metilacije DNA (Patel i sur., 2012).

1.1.2. Podjela

Prvi pokušaj u podjeli različitih tipova AML datira iz 1976. godine, a radi se o tzv. sustavu FAB (engl. *French-American-British classification system*) koji definira 8 različitih podtipova AML (M0 do M7) temeljem morfoloških i citokemijskih karakteristika leukemijskih stanica (Tablica 1.).

Tablica 1. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija prema FAB-u

FAB podtipovi	Naziv
M0	Minimalno diferencirana akutna mijeloična leukemija
M1	Akutna mijeloična leukemija bez sazrijevanja
M2	Akutna mijeloična leukemija sa sazrijevanjem
M3	Akutna promijelocitna leukemija (APL)
M4	Akutna mijelomonocitna leukemija (AMMoL)
M5	Akutna monocitna leukemija (AMoL)
M6	Akutna eritroidna leukemija (AEL)
M7	Akutna megakariocitna leukemija (AMKL)

Nadalje, 2001. godine Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *WHO, World Health Organization*) je s ciljem integriranja novih spoznaja o dijagnozi i liječenju AML predstavila novi klasifikacijski sustav koji je dodatno nadopunjen i revidiran 2008. godine (Vardiman i sur., 2009). Osam godina kasnije, SZO je izdala trenutno važeću podjelu AML (Tablica 2.) koja uz morfološke prognostičke pokazatelje uključuje citogenetičke, molekularne i biološke prognostičke pokazatelje te kliničku prezentaciju same bolesti i na taj način definira 6 glavnih kliničkih entiteta: AML s rekurentnim genetičkim promjenama, AML sa znakovima mijelodisplazije, mijeloidni zloćudni tumor nakon liječenja, AML koja nije drugdje uvrštena (AML-NOS), mijeloidni sarkom (ekstramedularni mijeloidni tumor, granulocitni sarkom, klorom) te mijeloidna proliferacija zbog Downova sindroma (Arber i sur., 2016). U skupini AML s rekurentnim genetičkim promjenama nalazi se 11 podtipova koji se dalje kategoriziraju ovisno o prisutnim kromosomskim translokacijama. Uz to, kategorije AML s mutacijom NPM1 i AML s mutacijom CEBPA su uvedene kao dio revizije 2008. godine (Vardiman i sur., 2009), dok su AML s prisutnim BCR-ABL1 fuzijskim prijepisom i AML s mutacijom RUNX1 dio važeće podjele iz 2016. godine (Arber i sur., 2016).

Tablica 2. Podjela AML prema reviziji SZO 2016.

<ul style="list-style-type: none"> • AML s rekurentnim genetičkim promjenama <ul style="list-style-type: none"> ○ AML s t(8:21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 ○ AML s inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 ○ APL s PML-RARA ○ AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A ○ ML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 ○ AML s inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM ○ AML (megakariocitna) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 ○ AML s BCR-ABL1 (<i>privremeni podtip</i>) ○ AML s mutacijom NPM1 ○ AML s bialeličnom mutacijom CEBPA ○ AML s mutacijom RUNX1 (<i>privremeni podtip</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • AML sa znakovima mijelodisplazije
<ul style="list-style-type: none"> • Mijeloidni zloćudni tumor nakon liječenja

<ul style="list-style-type: none"> • AML-NOS <ul style="list-style-type: none"> ○ AML s minimalnom diferencijacijom ○ AML bez sazrijevanja ○ AML sa sazrijevanjem ○ Akutna mijelomonocitna leukemija ○ Akutna monoblastna/monocitna leukemija ○ Akutna eritroidna leukemija ○ Čista eritroidna leukemija ○ Akutna megakarioblastna leukemija ○ Akutna bazofilna leukemija ○ Akutna panmijeloza s mijelofibrozom
<ul style="list-style-type: none"> • Mijeloidni sarkom
<ul style="list-style-type: none"> • Mijeloidna proliferacija zbog Downova sindroma <ul style="list-style-type: none"> ○ Prolazni poremećaj mijelopoeze ○ Mijeloična leukemija pridružena Downovu sindromu

1.1.3. Prognostički faktori

Točna procjena prognoze AML ima ključnu ulogu u liječenju ove bolesti. Prognostički faktori služe u procesu stratifikacije bolesnika te donošenju kliničke odluke o načinu, vrsti, trajanju i ponajprije intenzitetu liječenja koje se planira uvesti. Prvenstveno se u obzir uzima starija dob bolesnika koja se povezuje s manjom vjerojatnošću postizanja kompletne remisije (engl. *complete remission, CR*) i manjim sveukupnim preživljenjem (engl. *overall survival, OS*), a opći status bolesnika također je bitan faktor, posebice ako je bolesnikovo zdravlje već narušeno u trenutku dijagnoze (Kantarjian i sur., 2006). Uz stariju dob preporučeno je pratiti i laboratorijske parametre kao što su broj trombocita, serumski kreatinin i/ili albumin te ih zajednički interpretirati u predviđanju potencijalnog lošeg ishoda liječenja (Walter i sur., 2011). Treba napomenuti kako se velika pažnja u stratifikaciji bolesnika posvećuje i tzv. “biološkoj” dobi, odnosno psihofizičkom stanju bolesnika i pridruženim bolestima koji su važni ograničavajući pokazatelji mogućnosti intenzivnijeg terapijskog pristupa. Na sličan način, lošijoj prognozi pridonose i prijašnji hematološki maligniteti (Hulegardh i sur., 2015).

Međutim, citogenetičke promjene predstavljaju jedinstvenu i najsnažniju prognostičku skupinu u procjeni postizanja kompletne remisije i duljeg preživljenja kod pacijenata s AML. Sukladno tome, slučajevi AML se prema svojim citogenetičkim profilima mogu generalno svrstati u 3 prognostičke skupine: bolesnici s povoljnom, intermedijarnom i nepovoljnom citogenetikom (Tablica 3.). Utvrđivanje citogenetičkih promjena prilikom dijagnoze ima prognostičku vrijednost u procjeni odgovora na uvodnu terapiju, učestalost relapsa bolesti i sveukupno preživljenje u odraslih bolesnika s *de novo* AML.

Tablica 3. Podjela bolesnika s AML na prognostičke skupine na temelju citogenetičkih profila

Prognostička skupina	Citogenetički profil
Povoljna	t(8,21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutacija NPM1 bez FLT3-ITD (normalni kariotip) Mutacija CEBPA (normalni kariotip)
Intermedijarna – I	Mutacija NPM1 s FLT3-ITD (normalni kariotip) Divlji tip NPM1 s FLT3-ITD (normalni kariotip) Divlji tip NPM1 bez FLT3-ITD (normalni kariotip)
Intermedijarna – II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL Citogenetičke abnormalnosti koje nisu klasificirane niti kao povoljni niti kao nepovoljni podtip
Nepovoljna	inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EV11 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); -5 ili del(5q); -7; abnl(17p); kompleksni kariotip

Klinička istraživanja pokazala su kako petogodišnje preživljenje bolesnika s povoljnom citogenetikom iznosi 55%, dok je petogodišnje preživljenje za bolesnike s intermedijarnom citogenetikom 24%, a za bolesnike s nepovoljnom citogenetikom samo 5% (Byrd i sur., 2002). Nadalje, uz dokaz već poznatih kromosomskih promjena dokazuju se i potencijalno prisutne molekularne promjene te mutacije u bolesnika s normalnim kariogramom jer čak 40 – 50% bolesnika s AML ima normalan kariogram i tako predstavlja najveću podskupinu AML (Mrózek i

sur., 2007). U tih bolesnika potrebno je ispitati mutacije u genima za NPM1, CEPBA i FLT3 koje pokazuju i prognostičku vrijednost, kako je navedeno u Tablici 3. Prema učestalosti, oko 55% bolesnika ima pozitivnu mutaciju NPM1 koja je povezana s povoljnom prognozom i boljim sveukupnim preživljenjem (Schnittger i sur., 2005), dok je druga najčešća mutacija prisutna u 35 – 45 % ovih bolesnika FLT3-ITD koja je prognostički nepovoljna (Kottaridis i sur., 2001), a osobito ako se pojavljuje zajedno s mutacijom NPM1 jer kumulativno dovode do lošijeg ishoda bolesti (Schnittger i sur., 2011).

1.2. Fms-slična tirozin kinaza 3 (FLT3)

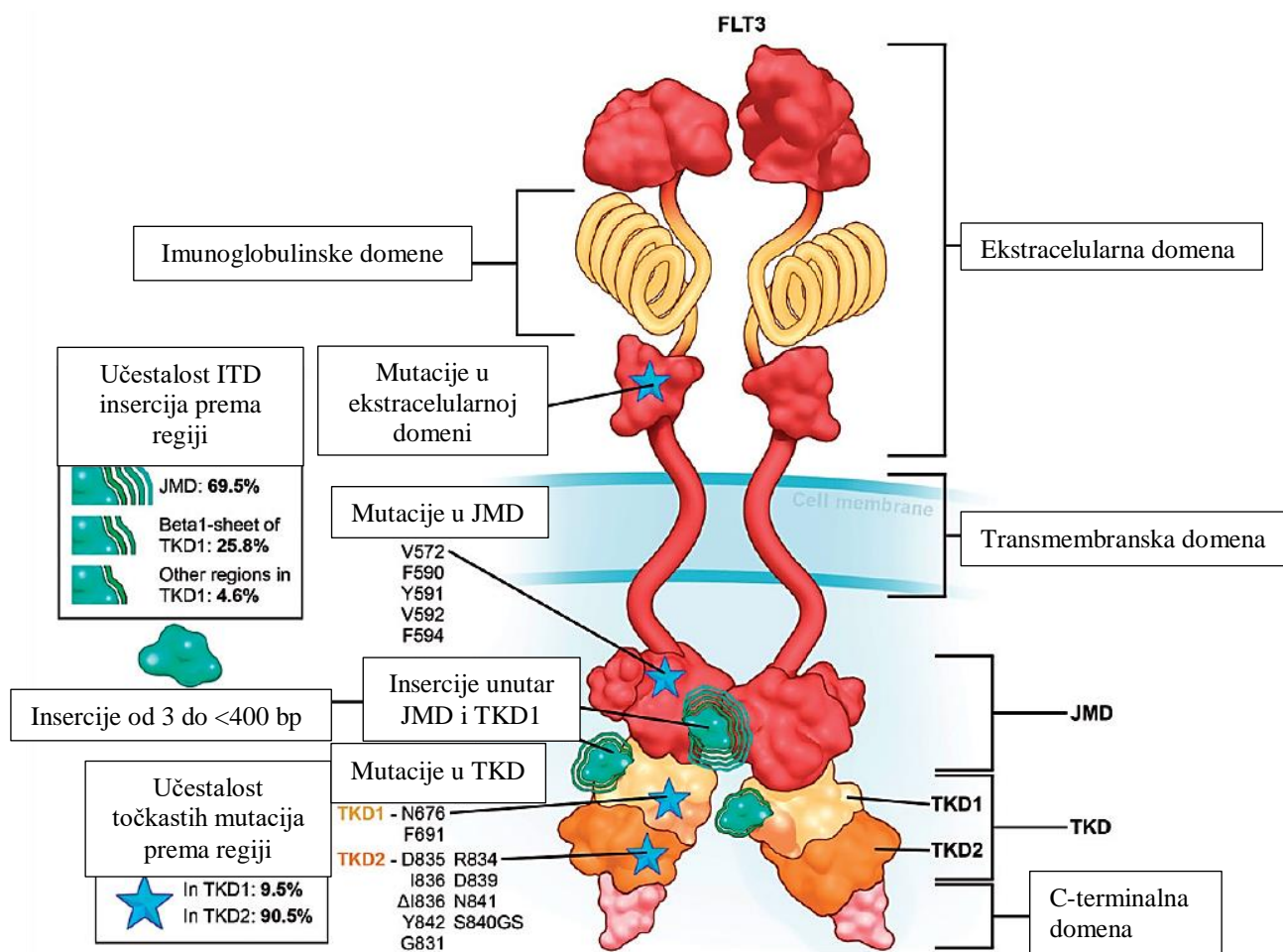
Fms-slična tirozin kinaza (FLT3) pripada obitelji receptorskih tirozin kinaza tipa III, zajedno sa c-kit, c-fms i PDGF receptorima (engl. *platelet-derived growth factor receptor, PDGFR*) i u normalnoj koštanoj srži ekspresija je ograničena isključivo na nezrele hematopoetske matične stanice kod kojih posreduje u procesu rasta i proliferacije (Lyman i Jacobsen, 1998.). Kod bolesnika s AML ekspresija je daleko veća i konstitutivno je aktivna u oko 90% leukemijskih blasta (Rosnet i sur., 1996).

Iako kariotip bolesnika predstavlja najznačajniji prognostički parametar kada je riječ o AML, ipak 45% bolesnika pokazuje normalan kariotip i sukladno tome pripada intermedijarnoj prognozi (Slovak i sur., 2000). Budući da se AML s normalnim kariotipom smatra heterogenom bolešću ovisno o molekularnoj podlozi, velika se pažnja usmjerava na pronalazak odgovarajućeg molekularnog biljega prikladnog za procjenu prognoze i minimalne ostatne bolesti (engl. *minimal residual disease, MRD*). Mutacije u genu za FLT3 u velikom se postotku povezuju upravo uz bolesnike s normalnim kariotipom, ali i one sa t(15;17)/PML-RARA i t(6;9)/DEK-CAN fuzijskim proteinima (Kayser i sur., 2009).

1.2.1. Mutacija FLT3-ITD

Mutacije u genu za FLT3 pojavljuju se u približno 1/3 bolesnika s AML, a po prvi su puta opisane 1997. godine (Kiyoi i sur., 1997). Unutarnje tandemske duplikacije od 3 do preko 400 baznih parova najčešća su vrsta FLT3 mutacija i prisutne su u do 30% slučajeva odraslih pacijenata s *de novo* AML (Papaemmanuil i sur., 2016; Kayser i sur., 2009). Takve tandemske insercije najčešće se pojavljuju unutar eksona 11 i 12 ljudskog FLT3 gena lociranog na kromosomu 13q12

koji nosi genetičku uputu za jugstamembransku domenu receptora (Slika 1). Mutirani genski produkt sadrži ireverzibilne strukturne promjene koje onemogućuju prelazak receptora u inaktivnu konformaciju te posljedično dovode do kontinuirane autofosforilacije čime receptor postaje konstitutivno aktivan, a nizvodnom signalizacijom, primjerice signalnim putevima STAT i MAPK, trajno su aktivirane i ostale efektorske molekule (Griffith i sur., 2004; Mizuki i sur., 2000). Leukemijski blasti s konstitutivno aktivnom FLT3 u *in vitro* uvjetima pokazuju veći potencijal proliferacije i smanjenu sposobnost apoptoze (Hayakawa i sur., 2000).



Slika 1. FLT3 sadrži 5 funkcionalnih domena: imunoglobulinsku ekstracelularnu domenu, transmembransku domenu, jugstamembransku domenu (JMD), tirozin-kinaznu domenu (TKD) i malu C-terminalnu domenu. Unutarnja tandemska ponavljanja i bazne insercije u oko 70% slučajeva karakteristične su za JMD, dok je preostalih 30% prisutno u TKD. Mutacije u TKD u preko 90% slučajeva prisutne su u aktivacijskoj petlji TKD2 i uglavnom se radi o točkastim mutacijama koje rezultiraju promijenjenim slijedom aminokiselina (prilagođeno prema Patnaik, 2018.)

Osim točkastih mutacija prikazanih na Slici 1., identificirane su i druge insercijske i delecijske mutacije, iako vrlo rijetke, koje zahvaćaju ekstracelularnu domenu i JMD. Također, kod pacijenata s AML uočene su i druge točkaste mutacije, no nije dokazano kako dovode do konstitucijske aktivnosti receptora *in vitro* – mutacije ekstracelularne domene (kodoni T167, V194, D324, Y364 i V491), transmembranske domene (I548 i V557), JMD (V579 i E598), TKD1 (A680 i M737) i TKD2 (V816, A814 i T784). Iako su većina TKD mutacija točkaste mutacije koje dovode do promjene kodona, ipak su identificirane i insercijske mutacije (primjerice, insercija glicina i serina između kodona S840 i N841) te delecijske mutacije (Δ I836 i Δ E598/Y599) (Patnaik, 2018).

Međutim, FLT3-ITD nije eksprimirana u jednakom intenzitetu među svim FLT3-ITD-pozitivnim (FLT3-ITD+) bolesnicima, odnosno razlike u jačini ekspresije dobivene u omjeru sa ekspresijom FLT3-divljeg tipa (engl. *wild type*, *WT*) utječu na prognozu bolesti (Whitman i sur., 2001). Dobiveni omjer rezultat je relativnog intenziteta signala deriviranog iz fluorescentno obilježenih produkata umnažanja FLT3-ITD i FLT3-WT alela metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, *PCR*) te ukoliko je takav omjer visok ($\geq 0,5$) internacionalni konsenzus predlaže da je riječ o negativnom prognostičkom faktoru (Pratcorona i sur., 2013; Stirewalt i Radich, 2003; Thiede i sur., 2002).

1.2.2. Mutacija FLT3-TKD

Mutacije unutar tirozin-kinazne domene su druge po učestalosti mutacije u genu za FLT3 karakteristične za AML te se pojavljuju u do 14% odraslih bolesnika (Bacher i sur., 2008). Radi se o točkastim mutacijama unutar aktivacijske petlje TKD2 (primjerice, u kodonu D835 ili delecije u kodonu I836), a rjeđe unutar petlje TKD1 (primjerice, N676 i F691) (Smith i sur., 2012). Uočene su i druge točkaste mutacije te manje insercije i delecije unutar TKD i drugih domena, kao što su ekstracelularna i jugstamembranska, karakteristične za 2% bolesnika s AML (Reindl i sur., 2006). Molekularne mutacije, posebice u slučajevima AML s normalnim kariotipom, postaju od sve veće važnosti u procjeni prognozi bolesti. Neke mutacije pokazale su se prognostički povoljnima, a neke nepovoljnima, međutim za FLT3-TKD nejasno je u kojoj mjeri utječe na ishod bolesti i samog liječenja. Detaljna analiza napravljena na uzorku od 3082 pacijenta s AML (Bacher i sur., 2008) koristila je visoko-osjetljivu metodologiju za detekciju ukupno 17 mutacija kodona u TKD i pokazala kako je učestalost ovih mutacija tek 4,8%. Najčešća mutacija koja dovodi do promjene u slijedu aminokiselina bila je D835Y, a nakon nje D835V i D835E, što korelira i sa rezultatima prijašnjih studija (Mead i sur., 2007; Fröhling i sur., 2002; Yamamoto i sur., 2001) te dovodi do zaključka kako raspodjela ovih mutacija unutar TKD nije nasumična. Nadalje, studija je pokazala kako se FLT3-TKD u većini bolesnika povezuje sa *de novo* dijagnosticiranom AML, a ne sekundarnom ili tercijskom bolešću, dok je u bolesnika s relapsom bolesti u čak 69% slučajeva dokazan gubitak ove mutacije, što govori u prilog njene nestabilnosti.

Prijašnje studije koje su obuhvaćale procjenu sveukupnog preživljenja odraslih bolesnika s *de novo* AML normalnog kariotipa ili intermedijarne prognostičke skupine pokazale su se u jednoj mjeri međusobno kontradiktorne. Rezultati meta-analize na uzorku od 1160 pacijenata s AML (Yanada i sur., 2005) govore u prilog lošije prognoze za bolesnike s potvrđenom mutacijom FLT3-TKD, dok su druge studije (Mead i sur., 2007; Fröhling i sur., 2002) pokazale kako se radi o povoljnom prognostičkom biljevu, osobito u odnosu na bolesnike s mutacijom FLT3-ITD. Bacher i sur. na svom uzorku bolesnika nisu uspjeli dokazati značajan utjecaj FLT3-TKD na ukupno preživljenje bolesnika s AML, ukoliko je mutacija prisutna samostalno. Međutim, zaključuju kako FLT3-TKD u kombinaciji sa drugim molekularnim promjenama može promijeniti prognozu bolesti. Primjerice, prisutnost FLT3-TKD zajedno sa t(15;17)/PML-RARA dovodi do kumulativnog pogoršanja prognoze, dok se povoljna prognostička vrijednost mutacija NPM1 i CEBPA dodatno poboljšava ukoliko je prisutna i FLT3-TKD.

1.2.3. Terapija FLT3 inhibitorima

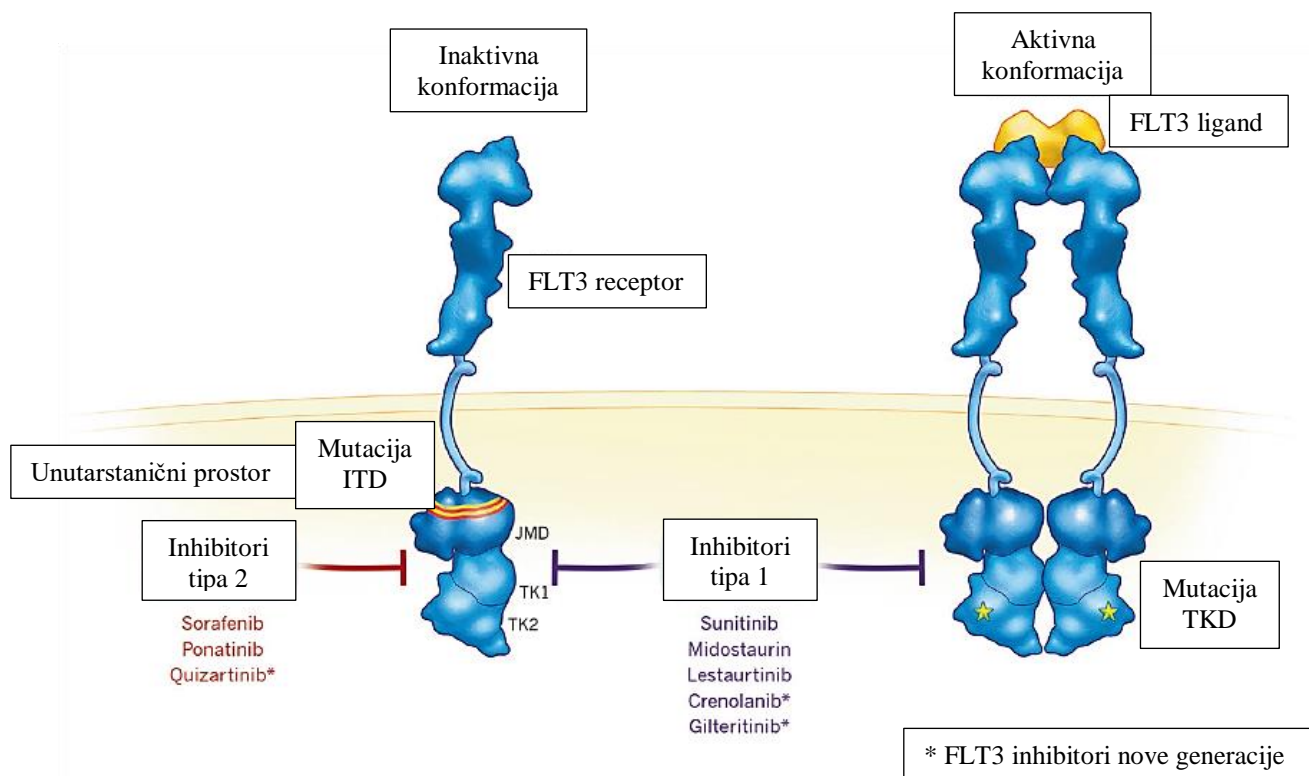
S obzirom na visoku učestalost FLT3 mutacija kod bolesnika s AML, veliki se napori ulažu u razvoj te kliničku primjenu novih “pametnih” lijekova, odnosno tirozin-kinaznih inhibitora (TKI) koji ciljano ometaju onkogenu signalizaciju FLT3. Većina se nalazi u fazama kliničkih ispitivanja gdje su se pokazali učinkovitima i kada se primjenjuju samostalno i u kombinaciji sa konvencionalnom kemoterapijom (Stone i sur., 2017; Brunner i sur., 2016).

Nekoliko FLT3 TKI uključujući i multikinazne inhibitore, midostaurin i sorafenib (inhibitori prve generacije), te selektivnije FLT3 inhibitore, krenolanib, gilteritinib i kvizartinib (inhibitori nove generacije), su trenutno u postupku evaluacije ili su već završili treću fazu kliničkih ispitivanja (Tablica 4.). Svaki od ovih TKI ima karakteristične prednosti i mane. Primjerice, multikinazni inhibitori poput midostaurina i sorafeniba pokazali su bolje kliničke rezultate kada se primjenjuju kao početna terapija zbog poliklonalne prirode AML, dok su oni više selektivniji inhibitori kao krenolanib, gilteritinib i kvizartinib prikladniji za primjenu kod relapsa ili refraktornih oblika AML (Pratz i Lewis, 2017).

Prema mehanizmu djelovanja, FLT3 inhibitore možemo podijeliti na dva tipa (Slika 2.). Inhibitori tipa 1 vežu se za FLT3 receptor u aktivnoj konformaciji i to na mjestu aktivacijske petlje ili veznog mjesta za ATP (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) te su učinkoviti kod mutacija ITD i TKD. Inhibitori tipa 2 vežu se za FLT3 receptor u inaktivnoj konformaciji u regiji blizu veznog mjesta za ATP te su zbog ovakvog specifičnog mehanizma vezanja učinkoviti samo u blokiranju signalizacije kod mutacija ITD, ali ne i mutacija TKD (Daver i sur., 2015).

Tablica 4. FLT3 inhibitori prve generacije i nove generacije te njihove terapijske mete

Generacija i naziv lijeka		Ciljani signalni putevi	Faza kliničkih ispitivanja
FLT3 inhibitori prve generacije	Sunitinib	VEGFR2, PDGFR β , KIT, RET	Faza 2
	Sorafenib	RAF, VEGFR1/2/3, PDGFR β , KIT, RET	Faza 3
	Midostaurin	PKC, SYK, FLK-1, AKT, PKA, KIT, FGR, SRC, PDGFR α/β , VEGFR1/2	Odobren za liječenje <i>de novo</i> AML u kombinaciji sa kemoterapijom
	Lestaurtinib	JAK2/3, TrkA/B/C	Faza 2
	Ponatinib	LYN, ABL, PDGFR α , VEGFR2, FGFR1, SRC, KIT, TEK, RET	Faza 2
	Tandutinib	KIT, PDGFR β	Povučen
FLT3 inhibitori nove generacije	Krenolanib	PDGFR β	Faza 3
	Kvizartinib	KIT, PDGFR	Faza 3
	Gilteritinib	LTK, ALK, AXL	Faza 3



Slika 2. Mehanizam djelovanja FLT3 inhibitora tipa 1 i 2 (prilagođeno prema Daver i sur., 2019)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Akutna mijeloična leukemija najčešća je vrsta leukemije te predstavlja četvrtinu svih leukemija koje se dijagnosticiraju u odrasloj dobi. Trenutno važeća klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije osim morfoloških i citogenetičkih prognostičkih pokazatelja uključuje i molekularne promjene karakteristične za određene podtipove AML. Iako citogenetičke promjene predstavljaju najsnažniju prognostičku skupinu u procjeni postizanja kompletne remisije i sveukupnog preživljenja kod bolesnika s AML, mutacije u genima koji su uključeni u onkogene procese stanične proliferacije od sve su veće važnosti prilikom procjene prognoze bolesti, a posljedično i donošenju odluke o vrsti, trajanju i intenzitetu liječenja.

Mutacije u genu za FLT3 spadaju u jednu od klinički značajnih molekularnih promjena i prisutne su kod čak trećine bolesnika s AML. Prognostički značaj FLT3 mutacija od posebnog je interesa u populaciji odraslih bolesnika s urednom citogenetikom pa je cilj ovog diplomskog rada bio uspostaviti metodu za dokazivanje prisutnosti točkastih mutacija u genu za FLT3 u uzorku bolesnika sa urednim kariogramom i negativnom mutacijom FLT3-ITD, budući da je dokazana mutacija FLT3-TKD osnovni preduvjet za primjenu ciljane terapije tirozin-kinaznim inhibitorima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada prikupljeni su uzorci periferne krvi 23 ženska i 22 muška bolesnika u dobi između 29 i 78 godina sa primarnom dijagnozom akutne mijeloične leukemije koji se liječe ili su upućeni na hematološku obradu u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Bolesnicima je napravljena rutinska laboratorijska obrada koja uključuje kompletnu krvnu sliku (KKS), diferencijalnu krvnu sliku (DKS) te osnovne biokemijske pretrage, a prikupljeni su i citološki nalazi punktata koštane srži za 35 bolesnika iz kojih je prema morfologiji hematopoetskih stanica eritrocitne, leukocitne i trombocitne loze te citokemijskim reakcijama dano mišljenje o kojem se podtipu AML radi (Tablica 5.).

Tablica 5. Podjela bolesnika prema spolu i podtipu dijagnosticirane AML

Bolesnik (M-muški, Ž-ženski)	Podtip AML
1 M	Minimalno diferencirana AML (M0)
2 M, 2 Ž	AML bez sazrijevanja (M1)
5 M, 6 Ž	AML sa sazrijevanjem (M2)
1 M, 2 Ž	Akutna mijelomonocitna leukemija (M4)
2 M, 2 Ž	Akutna monocitna leukemija (M5)
2 Ž	Akutna monoblastična leukemija (AML-NOS)
1 M, 3 Ž	AML sa znakovima mijelodisplazije

Prema novijoj podjeli SZO, dvije bolesnice svrstane su u skupinu akutne monoblastične leukemije (AML-NOS), a tri ženska i jedan muški bolesnik u skupinu AML sa znakovima mijelodisplazije. Za jednog ženskog i pet muških bolesnika citološki nalaz nije dao konkretno mišljenje, odnosno potvrđuje osnovnu dijagnozu AML, međutim ona je citomorfološki i/ili citokemijski nediferencirana te se stoga preporučuje tumačenje nalaza u sklopu ostalih pretraga koje su napravljene prilikom obrade bolesnika. Za ostalih 10 bolesnika nije bilo moguće dobiti citološki nalaz punktata koštane srži. Svi bolesnici, njih ukupno 45, imaju uredan citogenetički nalaz bez kromosomskih abnormalnosti što je bio i osnovni kriterij prilikom njihovog odabira

budući da je cilj ovog rada bio dokazati prisutnost točkastih mutacija u genu za FLT3 kao prognostičkog biljega upravo u populaciji citogenetički urednih bolesnika s AML.

3.2. Oprema i reagensi

1. Izdvajanje leukocita iz punktata koštane srži i otapanje u Trizolu u svrhu njihove pohrane na – 20 °C do postupka izolacije RNA

Oprema:

- a) Automatske pipete promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima
- b) Centrifuga 5810R Eppendorf, Njemačka
- c) Sterilna epruvete (1,5 mL i 50 mL) Eppendorf, Njemačka
- d) Sterilne igle i šprice

Reagensi:

- a) Pufer za hemolizu, otopina amonijevog klorida (RCLB)
- b) Pufer za pročišćavanje leukocita, otopina fosfatnog pufera (PBS)
- c) Trizol (gvanidinijev izotiocijanat)

2. Izdvajanje ukupne RNA iz leukocita koštane srži pohranjenih u Trizolu

Oprema:

- a) Centrifuga 5417R Eppendorf, Njemačka
- b) Vrtložna mješalica TK3S TechnoKartell, Italija
- c) Inkubator Heraeus B6 Thermo Scientific
- d) Ultrafreezer (– 80 °C), Fiochetti, Italija
- e) Sterilne epruvete (1,5 mL) Eppendorf, Njemačka
- f) Automatske pipeta promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima

Reagensi:

- a) Kloroform (49 mL kloroform + 1 mL izoamilni alkohol), Kemika
- b) Etanol, 100% (apsolutni etanol), Kemika
- c) Etanol, 75% (37,5 mL apsolutni etanol + 12,5 mL DEPC voda)
- d) DEPC (dietil pirokarbonat) voda

3. Priprava radnih otopina liofiliziranih početnica i proba

Oprema:

- a) Automatske pipete promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima
- b) Sterilne epruvete (0,5 mL i 1,5 mL), Eppendorf, Njemačka
- c) Vrtložna mješalica TK3S TechnoKartell
- d) Centrifuga MiniSpin Eppendorf, Njemačka

Reagensi:

- a) Liofilizirane probe i početnice
FLT3 sensor: 5' – ACTCATGATATCTCGAGCCAATCC – 3'
FLT3 anchor: 5' – AAGTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT – 3'
FW početnica: 5' – CCGCCAGGAACGTGCTTG – 3'
REV početnica: 5' – ATGCCAGGGTAAGGATTCACACC – 3'
- b) Sterilna voda

4. Postupak reverzne transkripcije

Oprema:

- a) Termoblok GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems, SAD
- b) Vrtložna mješalica TK3S TechnoKartell
- c) Centrifuga MiniSpin Eppendorf, Njemačka
- d) Automatske pipete promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima
- e) Sterilne epruvete (0,5 mL i 1,5 mL), Eppendorf, Njemačka

Reagensi:

- a) DEPC (dietil pirokarbonat) voda
- b) High capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor, Applied Biosystems, SAD
 - a. pufer (10 x RT Buffer)
 - b. mješavina nukleotida (dNTP mix, 100 mM)
 - c. nasumično odabrane početnice (10 x RT Random primers)
 - d. enzim reverzna transkriptaza (Reverse Transcriptase)
 - e. inhibitor ribonukleaza (RNase Inhibitor)

5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu sa specifičnim početnicama i fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim probama

Opis instrumenta:

Uređaj LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka) sastoji se od dijela u kojem se nalazi termalna komora i sustav za fotometrijsko očitavanje fluorescencije te od računala, ekrana i pisača. Nosač za uzorke u termalnoj komori povezan je s fluorimetrom, a izvor svjetlosti je dioda koja odašilje plavu svjetlost valne duljine 470 nm te pobuđuje fluorescenciju u uzorku. Pobuđeni uzorak potom odašilje fluorescenciju koja se uz pomoć zrcala reflektira na fluorometar. Uređaj ima mogućnost mjerenja 6 različitih valnih duljina svjetlosti (530, 555, 610, 640, 670 i 705 nm). Kapacitet uređaja je 32 kapilare. Uređaj na stražnjem dijelu ima prekidač za uključivanje/isključivanje. Na prednjoj strani nalaze se 3 svjetiljke (Slika 3.) koje označavaju status uređaja: zelena svjetiljka označava da je uređaj uključen (“POWER ON”), crvena svjetiljka označava da je PCR u tijeku (“CYCLING”) i u tom slučaju uređaj se ne smije otvarati, a narančasta svjetiljka označava da je program završen (“RUN COMPLETED”).



Slika 3. Vanjski izgled LightCycler® 2.0. (preuzeto sa www.diagnostics.roche.com)

Oprema:

- a) LightCycler® kapilare 20 µL, Roche Diagnostics, Njemačka
- b) Centrifuga LC Carousel Centrifuge 2.0, Roche Diagnostics, Njemačka
- c) Hladan blok za kapilare (2-8°C)
- d) Automatske pipete promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima
- e) Vrtložna mješalica TK3S TechnoKartell
- f) Centrifuga MiniSpin Eppendorf, Njemačka
- g) Sterilne epruvete (1,5 mL), Eppendorf, Njemačka

Reagensi:

- a) LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} Hybprobe, Roche Diagnostics, Njemačka
 - a. epruveta s bijelim čepom (oznaka “1a Enzyme”) koja sadrži enzim Taq DNA polimerazu
 - b. epruveta s crvenim čepom (oznaka “1b Reaction mix”) koja sadrži već optimiranu smjesu nukleotida, pufera i Mg²⁺
- b) Oligonukleotidne početnice, 100 µM, TIB MolBiol, Njemačka
 - FW početnica: 5’ – CCGCCAGGAACGTGCTTG – 3’
 - REV početnica: 5’ – ATGCCAGGGTAAGGATTCACACC – 3’
- c) Fluorescentno obilježene probe, 20 µM, TIB MolBiol, Njemačka
 - FLT3 sensor: 5’ – ACTCATGATATCTCGAGCCAATCC – 3’
 - FLT3 anchor: 5’ – AAGTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT – 3’

6. Postupak sekvenciranja prema Sangeru

Oprema:

- a) Termoblok GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems, SAD
- b) Hladni blok za reagense
- c) Automatske pipete promjenjivog volumena sa sterilnim nastavcima
- d) Vrtložna mješalica TK3S TechnoKartell
- e) Centrifuga MiniSpin Eppendorf, Njemačka
- f) Sterilne epruvete od 1,5 mL i 0,2 mL
- g) Vrtložna mješalica s grijačem TechnoKartell
- h) Mikrotitarske pločice sa septama
- i) AB Genetic Analyzer 3130xl, uređaj za kapilarnu elektroforezu

Reagensi:

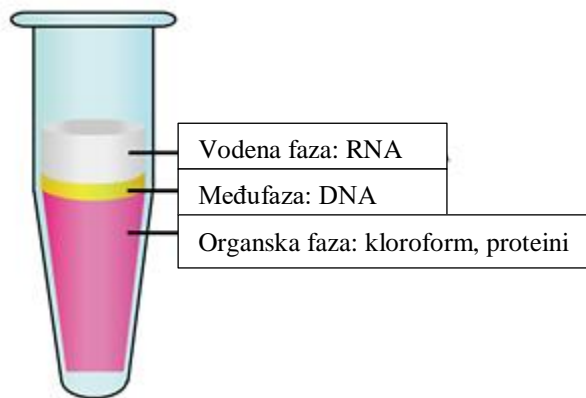
- a) Reagensi za PCR (Applied Biosystems by Life Technologies, SAD):
 - a. GeneAmp® 10X PCR Buffer II with MgCl₂ (150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl)
 - b. 10 mM dNTP (ili 100 mM dNTP razrijediti 1:10)
 - c. AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/μL)
 - d. Big Dye Terminator mix
 - e. Sterilna voda, Zavod za transfuziju
 - f. ExoSap IT (enzim za pročišćavanje), Thermo Scientific
 - g. DyeExe 2.0 kolonice za pročišćavanje, Qiagen
 - h. Oligonukleotidne početnice, 100 μM, TIB MolBiol, Njemačka
FW početnica: 5' – CCGCCAGGAACGTGCTTG – 3'
REV početnica: 5' – ATGCCAGGGTAAGGATTCACACC – 3'

3.3. Metode

3.3.1. Izdvajanje ukupne RNA

Sterilnom pipetom se uzima volumen dobro promiješanog uzorka koštane srži koji sadrži 20 milijuna leukocita i prenosi se u Falcon epruvete nakon čega se dodaje hladni pufer za hemolizu eritrocita, promiješa se i ostavi stajati na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim se centrifugira, supernatant se odbacuje, a ukoliko hemoliza nije bila potpuna ponovno se dodaje RCLB pufer i ponavlja centrifugiranje. Talog leukocita se potom resuspendira u 20 mL pufera za pročišćavanje leukocita te centrifugira 10 minuta na 1500 okretaja u minuti i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant se ponovno odbacuje, a nakon toga leukocite je potrebno pohraniti na Trizol prije postupka izolacije RNA i to dodavanjem 1 mL Trizola, resuspendiranjem taloga te pohranom leukocita u sterilnim epruvetama na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Trizol u kojem su stanice homogenizirane omogućuje inhibiciju ribonukleaza te lizu stanica iz kojih posljedično dolazi do ispuštanja staničnog sadržaja. Odjeljivanje RNA od DNA i proteina provodi se ekstrakcijom sa kloroformom. Uzorke leukocita u epruvetama koje su pohranjene na Trizol reagensu odmrzne se na sobnoj temperaturi, potom inkubira na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ desetak minuta nakon čega se dodaje 0,2 mL hladnog kloroforma te uz pomoć vrtložne mješalice homogenizira tijekom 15 minuta. Kako bi se osiguralo potpuno odvajanje faza, uzorci se centrifugiraju 10 minuta na $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10600 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja, mješavina kloroforma i Trizola se odvaja na donju ružičastu fazu koja sadrži fenol, kloroform i proteine, međufazu u kojoj je DNA i bezbojnu gornju vodenu fazu u kojoj se nalazi RNA (Slika 4.). Vodena faza se automatskom pipetom i sterilnim nastavkom pažljivo prebaci u novu epruvetu na način da se izbjegne kontakt s međufazom koji može dovesti do kontaminacije. Slijedi taloženje RNA ispiranjem vodene faze s 0,2 mL hladnog kloroforma, centrifugiranjem i dodavanjem 0,5 mL 100% hladnog etanola nakon čega se kratko miješa na vrtložnoj mješalici i ponovno centrifugira u istim uvjetima sve dok se na dnu ne istaloži RNA u obliku bijelog gela. Supernatant se uklanja, a talog RNA se ispiri 1 mL 75% hladnog etanola i centrifugira 5 minuta na $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 8400 okretaja u minuti. Na taj način, talog RNA se dodatno pročišćava, a u zadnjem koraku talog RNA se suši 10 do 15 minuta na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u inkubatoru čime gubi bijelu boju i postaje proziran, no treba oprezno sušiti jer se previše suh talog slabije otapa u DEPC vodi. Ovisno o količini taloga dodaje se 24 μL , 48 μL ili 72 μL DEPC vode i tako otopljena RNA pohranjuje se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za potrebe daljnje analize.



Slika 4. Shematski prikaz dobivenih faza nakon ekstrakcije RNA Trizolom
(preuzeto i prilagođeno sa www.creative-diagnostics.com)

3.3.2. Priprema radnih otopina početnica i proba

Liofiliziranu početnicu otopi se u volumenu sterilne vode tako da se dobije koncentracija od 100 μM . Na isti način otopi se i liofilizirana proba do ciljne koncentracije od 20 μM . Početnice i probe otapaju se na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Kratko se homogeniziraju vrtložnom mješalicom i centrifugiranjem nakon čega se otopljena početnica alikvotira u 10 alikvota po 100 μL , a proba u 4 alikvota po 10 μL dok se ostatak ostavlja u matičnoj epruveti i pohranjuje u obilježenu kutiju za otopljene početnice i probe na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3. Postupak reverzne transkripcije

Prepisivanje jednolančane molekule mRNA u dvolančanu komplementarnu cDNA omogućuje određivanje izražaja pojedinog gena, odnosno količine proteina koji bi nastao translacijom mRNA od interesa. Uzorke izolirane RNA potrebno je ostaviti na sobnoj temperaturi desetak minuta zajedno sa reagensima iz komercijalnog paketa uz pomoć kojih će se pripremiti reakcijska smjesa. Zatim se u sterilnom prostoru pripreme epruvete od 0,2 mL i označe brojevima, a u posebnoj sterilnoj epruveti od 1,5 mL pripremi se reakcijska smjesa prema navedenom protokolu (Tablica 6.).

Tablica 6. Protokol za izradu reakcijske smjese za reverznu transkripciju

10 x RT Buffer	2 μ L
10 x RT Random Primers	2 μ L
dNTP mix, 100 mM	0,8 μ L
RNase Inhibitor	1 μ L
Reverse Transcriptase	1 μ L
DEPC voda	3,2 μ L
Ukupno	10 μ L

Svježe pripremljenu reakcijsku smjesu potrebno je kratko promiješati na vrtložnoj mješalici i kratko centrifugirati te pipetirati po 10 μ L smjese u pripremljene sterilne epruvete od 0,2 mL. Zatim se u svaku pojedinu sterilnu epruvetu dodaje količina otopljene RNA koja odgovara 2 μ g RNA, odnosno 10 μ L vodene otopine RNA, pazeći da se prije dodavanja svakog pojedinog uzorka mijenja nastavak za pipetu kako bi se spriječila kontaminacija. Epruvete se zatvore nakon dodavanja i poslože se na nosač koji se postavi na uređaj na kojem će se izvoditi transkripcija (Termoblok GeneAmp PCR System 2720, Applied Biosystems, SAD) te se odabere program reverzne transkripcije prema navedenim uvjetima (Tablica 7.).

Tablica 7. Program reverzne transkripcije

Temperatura	Vrijeme
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	∞

Nakon završetka transkripcije, uzorci cDNA pohranjuju se na 2 – 8 °C do daljnje analize.

3.3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Pohranjeni uzorci cDNA i potrebni reagensi za PCR otapaju se na sobnoj temperaturi dok se enzim pohranjuje u hladni blok. Reagensi, ali ne i enzim, se dodatno kratko promiješaju na vrtložnoj mješalici i kratko centrifugiraju nakon čega se pristupa izradi reakcijske smjese. Iz komercijalnog seta (LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} Hybprobe) uzima se 10 µL iz epruvete “1a Enzyme” i dodaje u epruvetu “1b Reaction mix” te se promiješa uvlačenjem i ispuštanjem sadržaja uz pomoć automatske pipete. Na taj način dobiven je 5x LC DNA Master^{PLUS} Hybridization mix koji služi kao dio reakcijske smjese. Ostale komponente reakcijske smjese dodaju se navedenim redoslijedom i u odgovarajućim volumenima (Tablica 8.).

Tablica 8. Protokol za izradu reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

5x LC DNA Master ^{PLUS} Hybridization mix	2 µL
FW početnica	0,5 µL
REV početnica	0,5 µL
FLT3 sensor (proba 1)	0,75 µL
FLT3 anchor (proba 2)	0,75 µL
Sterilna voda	13,5 µL

Reakcijsku smjesu potrebno je kratko promiješati na vrtložnoj mješalici i kratko centrifugirati te odložiti u hladan blok za kapilare. U isti hladan blok postavi se 32 LightCycler® kapilara i u njih se pipetira po 18 µL reakcijske smjese i po 2 µL uzorka cDNA bolesnika, kontrolnog uzorka bez FLT3-TKD odnosno slijepe probe. Kapilare se zatvore posebnim čepovima i centrifugiraju se uz pomoć posebne LC Carousel 2.0 centrifuge nakon čega se premještaju u mjerni instrument LightCycler® v2.0.

Svaka PCR reakcija sastoji se od niza ponavljajućih temperaturnih promjena od kojih je svaka karakteristična za reakciju koja se u tom trenutku događa. Takav ciklus reakcija može se podijeliti na nekoliko faza: denaturacija dvolančane DNA događa se na temperaturi od oko 95 °C i predstavlja prvi korak nakon kojeg su lanci DNA dostupni za vezanje početnica i DNA polimeraze. Pri tako visokim temperaturama enzimski aktivnost većine DNA polimeraza prestaje uslijed denaturacije, međutim DNA polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* zadržava svoju enzimsku aktivnost pri visokim temperaturama te se od svojeg otkrića koristi u PCR reakcijama pod imenom Taq-polimeraza (Chien i sur, 1976). Nakon razdvajanja lanaca,

temperatura se spušta na vrijednosti između 50 i 65 °C, ovisno o korištenim početnicama, čime se omogućava spajanje početnica s kalupom DNA, no temperatura je još uvijek dovoljno visoka da se onemogući međusobno spajanje lanaca DNA. Potom se temperatura podiže na 72 °C koja je najpogodnija za djelovanje Taq-polimeraze te započinje proces polimerizacije novog lanca. Završetkom polimerizacije temperatura se ponovno podiže na 95 °C čime započinje novi ciklus umnažanja ciljnih sekvenci DNA kalupa. Na kraju svakog ciklusa dobiva se dvostruko veći broj molekula DNA od onog na početku tako da je broj molekula DNA nakon N ciklusa 2^N puta veći od početnog broja molekula. Broj ciklusa ovisi o zadanom programu umnažanja, a najčešće se radi između 25 i 50 ponavljajućih ciklusa (Rychlik i sur., 1990).

Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR, qPCR*), uz osnovne komponente potrebne za PCR reakciju sadrži i komercijalne fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe (LightCycler® HybProbe) koje se vežu na unutarnju sekvencu umnoženog fragmenta u istoj fazi kada se vežu i početnice. Jedna proba (engl. *anchor*) na svojem 5' kraju obilježena je fluorescentnom bojom dok je druga proba (engl. *sensor*) na svojem 3' kraju obilježena fluoresceinom. Kada su obje probe vezane na DNA kalup prostorno su približene čime je omogućen FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) tijekom kojeg emitirana laserska svjetlost mjernog instrumenta LightCycler® 2.0 ekscitira fluorescein koji dio energije odašilje akceptorskom fluoroforu, odnosno fluorescentnoj boji. Kada je akceptorska fluorofora ekscitirana, ona fluorescira te se taj signal bilježi u instrumentu što omogućuje pouzdanu kvantifikaciju PCR produkta.

Program umnažanja koji je korišten prilikom ovog istraživanja ima zadane sljedeće uvjete za PCR reakciju (Tablica 9.).

Tablica 9. Program umnažanja qPCR

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Denaturacija	95 °C	30 sek	x1
Umnažanje	95 °C	20 sek	x45
	60 °C	10 sek	
	72 °C	2 sek	
Postupak izrade krivulje taljenja	95 °C	0 sek	x1
	45 °C	60 sek	
	95 °C	0 sek	
Hlađenje	40 °C	30 sek	x1

3.3.5. Sekvenciranje prema Sangeru

Metoda se zasniva na preuranjenom prestanku sinteze DNA zbog ugradnje dideoksinukleotida (ddNTP) kojima nedostaje 3'-OH skupina na deoksiribozi zbog čega DNA polimeraza ne može katalizirati stvaranje fosfodiesterske veze sa sljedećim nukleotidom. Izvorna Sangerova metoda sastoji se od četiri neovisne lančane reakcije polimerazom. U svakoj od četiri reakcijskih smjesa nalazi se isti kalup DNA, ista radioaktivno obilježena ishodnica, dNTP (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) te po jedan od dideoksinukleotida uz DNA-polimerazu i pufer. Lančanom reakcijom polimerazom stvara se serija obilježenih molekula DNA koje završavaju bazom onog dideoksinukleotida korištenog u toj reakciji. Ti se fragmenti DNA potom razdvajaju prema veličini gel-elektroforezom i detektiraju autoradiografijom. Kako je veličina nastalog produkta određena položajem na koji se ugradio ddNTP, slijed nukleotida u DNA odgovara redosljednu fragmenata koji se iščitava s filma (Sanger i sur., 1977).

Jedna od modifikacija Sangerove metode jest uporaba dideoksinukleotida obilježenih fluorescentnim bojama. Ovdje se u jedinstvenoj reakcijskoj smjesi nalaze kalup DNA, neobilježena početnica, dNTP i ddNTP obilježeni sa četiri različite fluorescentne boje. Fragmenti DNA koji se razlikuju u duljini za jedan nukleotid razdvajaju se kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenatoru. Pred kraj kapilare kroz koju se elektroforeza odvija nalazi se detekcijski prozor koji osvjetljava laser. Kraći fragmenti prije dosežu taj prozor jer putuju brže te se prvi detektiraju jer laser ekscitira fluorescentnu boju kojom je obilježen posljednji (dideoksi) nukleotid tog fragmenta. Kamera prikuplja emitiranu svjetlost, podaci se prikupljaju računalno te prevode u oblik elektroferograma iz kojeg se jednostavno očitava nukleotidni slijed. Taj je nukleotidni slijed komplementaran kalupu DNA korištenom u reakciji sekvenciranja. Ova modifikacija Sangerove metode korištena je u svrhu potvrđivanja prisutnosti točkaste mutacije u genu za FLT3.

Umnožene produkte potrebno je pročitati sa 3 μ L enzima za pročišćavanje "EXO SAP IT" neposredno prije postupka sekvenciranja. Zatim ih se postavlja u nosač epruveta, prenosi u termoblok i pokreće program pročišćavanja prema protokolu (Tablica 10.).

Tablica 10. Program pročišćavanja PCR produkata

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Pročišćavanje	37 °C	30 min	x1
	80 °C	15 min	
	4 °C	∞	

Nakon pročišćavanja, potrebno je izraditi PCR smjesu za sekvenciranje. Potrebni reagensi za PCR otapaju se na sobnoj temperaturi 5 minuta, kratko se miješaju na vrtložnoj miješalici i kratko centrifugiraju, a PCR smjesa za “forward” i “reverse” reakciju izrađuje se prema sljedećim protokolima (Tablica 11.)

Tablica 11. Protokol za izradu PCR reakcijske smjese za sekvenciranje

PCR smjesa za “forward” reakciju		PCR smjesa za “reverse” reakciju	
Sastav	Volumen	Sastav	Volumen
5x Sequencing PCR Buffer	1,75 μ L	5x Sequencing PCR Buffer	1,75 μ L
Big Dye Terminator Mix	0,5 μ L	Big Dye Terminator Mix	0,5 μ L
FW početnica (3,3 pmol/ μ L)	1 μ L	REV početnica (3,3 pmol/ μ L)	1 μ L

Epruvete sa pripremljenom reakcijskom smjesom potrebno je kratko miješati na vrtložnoj miješalici i centrifugirati radi homogenizacije te odložiti u hladan blok. U nove sterilne PCR epruvete treba dodati 3,25 μ L reakcijske smjese (“forward” ili “reverse”) te konačno dodati po 6,75 μ L pročišćenih PCR produkata i smjesu lagano promiješati. Tako pripremljene uzorke prenosi se na nosač koji se stavlja u termoblok, pazeći da u epruvetama nije zaostao mjehurić zraka koji se treba ukloniti neposredno prije pokretanja programa umnažanja (Tablica 12.).

Tablica 12. Program umnažanja obilježene PCR smjese

Naziv koraka	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Taljenje	96 °C	1 min	x1
Umnažanje	96 °C	10 sek	x25
	50 °C	5 sek	
	60 °C	4 min	

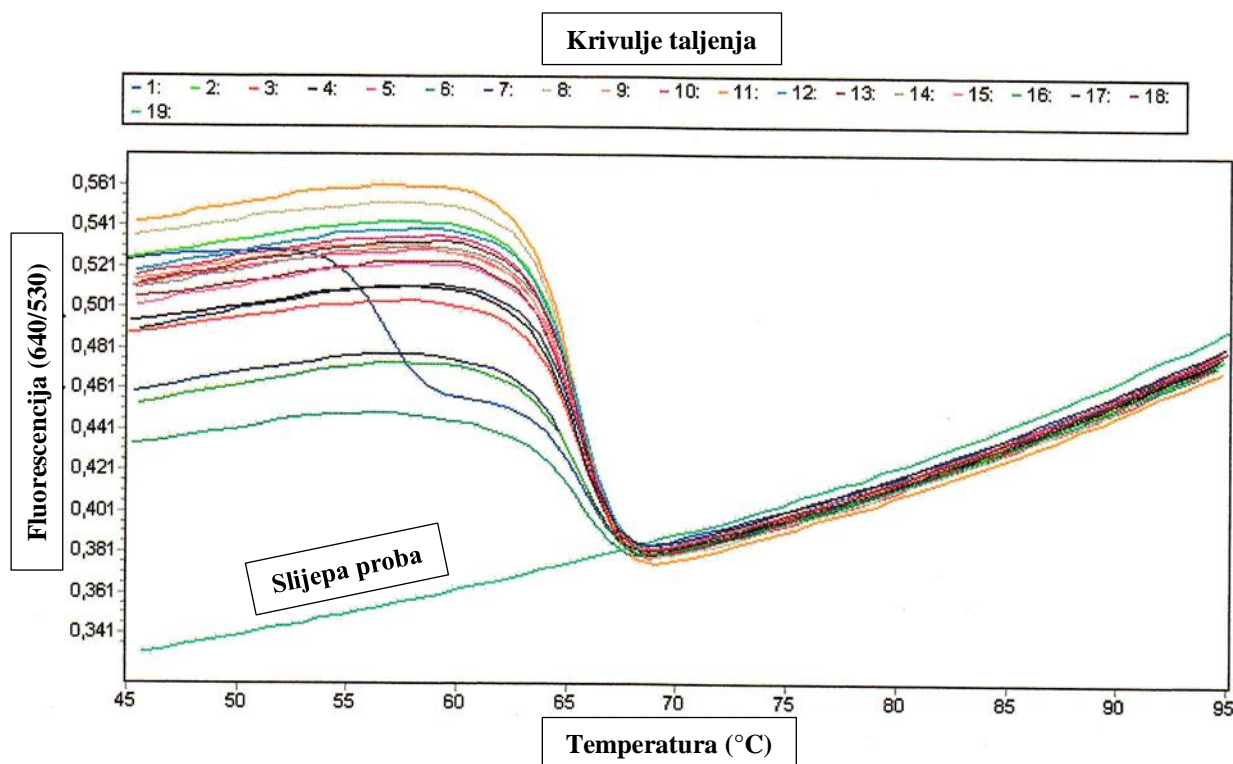
Produkti obilježene PCR reakcije ponovno se trebaju pročišćavati, ali ovoga puta na kolonama DyeEx nakon čega se dobiveni pročišćeni eluat pipetira u mikrotitarske pločice, a pločica se prekiva gumenom septom i kratko centrifugira. Zatim se pristupa sekvenciranju na uređaju za kapilarnu elektroforezu, a rezultat sekvenciranja izražava se kvalitativno kao pozitivan ili negativan na mutacije u genu za FLT3 ukoliko se u usporedbi sa referentnom sekvencom u programu “SeqScape” dokaže mutacija ili se pregledom sekvence u programu “Sequencing Analysis” uoči preklapanje dva nukleotida na istom mjestu u sekvenci.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

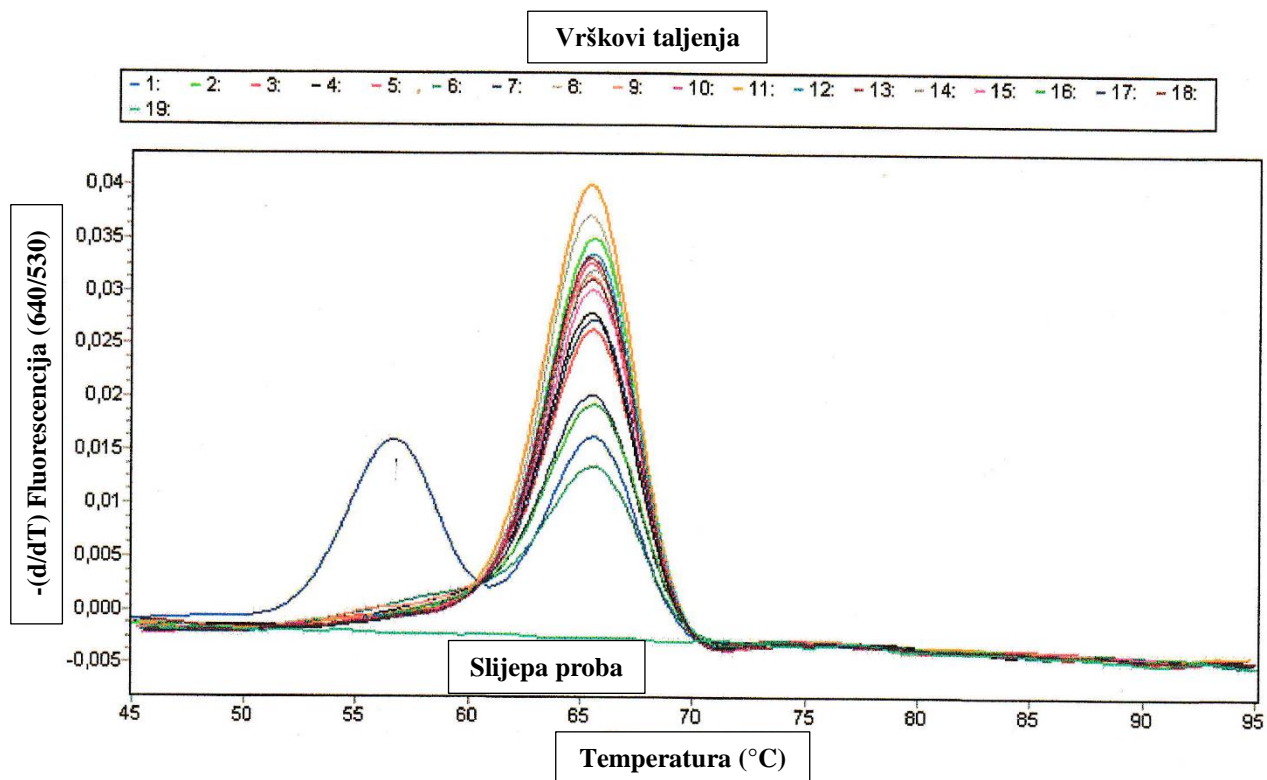
Krivulje taljenja grafički su prikazi ovisnosti fluorescencije, koju odašilje fluorescentna boja ili obilježivač tijekom procesa disocijacije dvolančane DNA (engl. *double-stranded DNA*, dsDNA), i temperature čiji porast uzrokuje “taljenje” dvolančane DNA u jednolančanu (engle. *single-stranded DNA*, ssDNA). Analizom krivulja taljenja pratimo blagi porast fluorescencije te nagli pad na određenoj temperaturi ili temperaturama gdje zbog disocijacije dvolančane DNA hibridizirane fluorescentno obilježene probe više nisu prostorno približene i nisu u mogućnosti emitirati fluorescenciju mehanizmom FRET-a.

Slika 5. prikazuje krivulje taljenja za 18 analiziranih bolesnika. Iz slike se jasno vidi kako je zajednička temperatura taljenja (T_m) za sve uzorke, odnosno umnožene produkte, između 65 i 70 °C, međutim jedan uzorak pokazuje još jednu specifičnu temperaturu taljenja između 55 i 60 °C. Uzorak broj 1 predstavlja kontrolni uzorak cDNA u kojem nije dokazana mutacija FLT3-TKD, a uzorak 19 predstavlja slijepu probu i ona prati očekivani linearni rast bez naznaka kontaminacije.



Slika 5. Grafički prikaz krivulja taljenja uzoraka bolesnika i slijepa probe

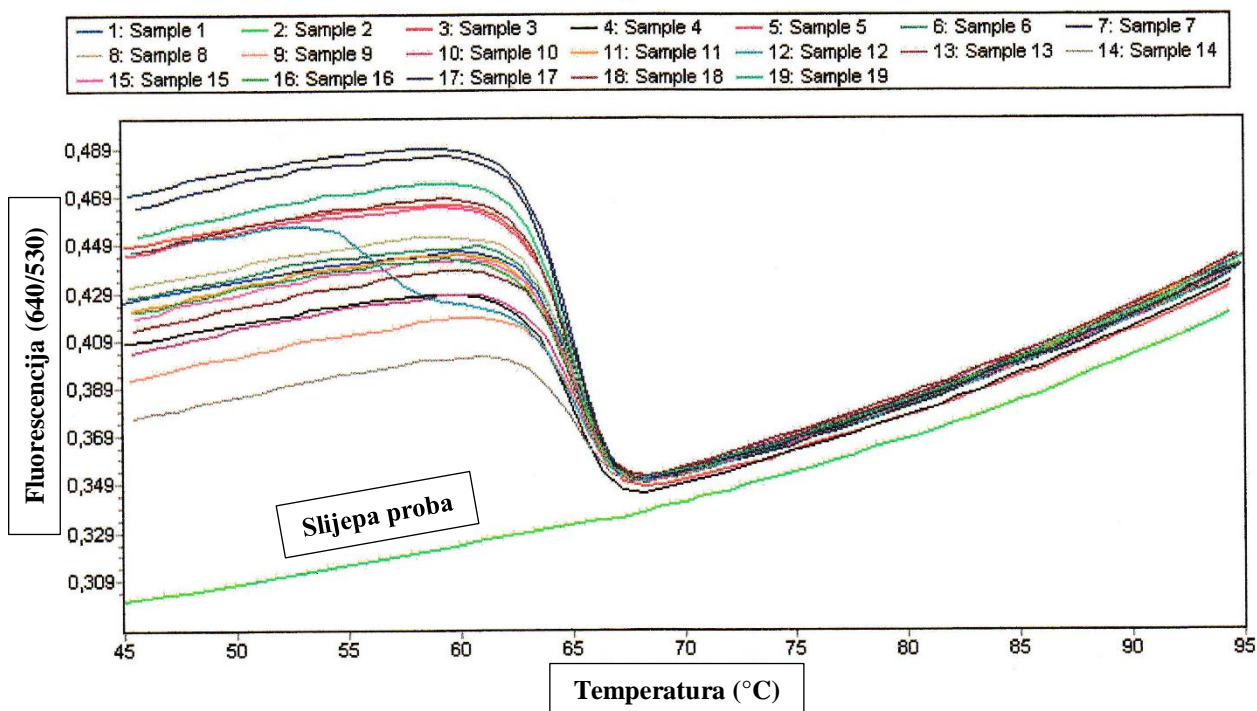
Deriviranjem fluorescencijskog signala, krivulje taljenja postaju vrškovi uz pomoć kojih se jasnije može razlučiti točna temperatura taljenja za pojedini uzorak (Slika 6.). Na taj način razvidno je kako jedan uzorak pokazuje dva vrška i dvije temperature taljenja od 56 i 65 °C dok ostali pokazuju zajednički vršak na 65 °C različitog intenziteta fluorescencije. Uzorak broj 1 predstavlja kontrolni uzorak cDNA u kojem nije dokazana mutacija FLT3-TKD, a uzorak 19 predstavlja slijepu probu i ona prati očekivani linearni rast bez naznaka kontaminacije.



Slika 6. Grafički prikaz vrškova taljenja uzoraka bolesnika i slijepa probe

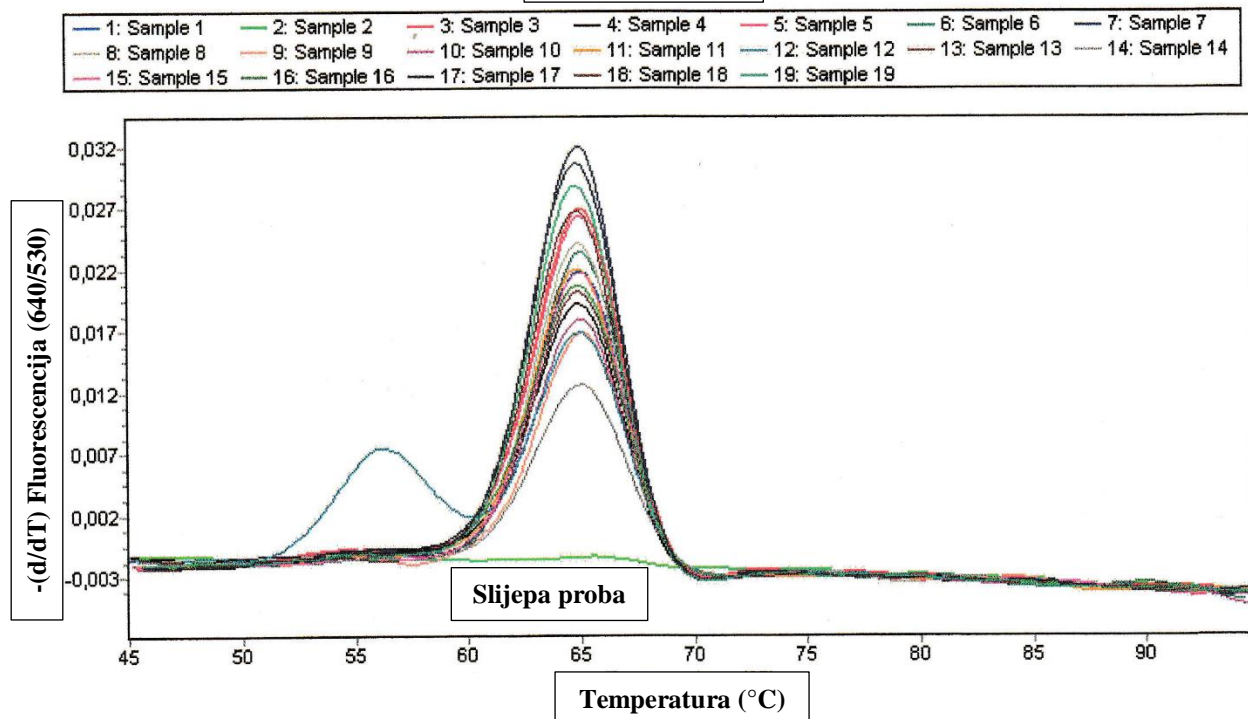
Na isti način je analizom krivulja taljenja druge skupine uzoraka bolesnika utvrđeno kako jedan uzorak pokazuje svojstvenu temperaturu taljenja na 56 °C, dok preostali uzorci imaju samo jednu temperaturu taljenja na 65 °C (Slika 7.). Temperature taljenja mogu se jasnije vidjeti prema vrškovima gdje su kod jednog uzorka prisutna dva vrška, dok je kod ostalih uzoraka prisutan samo jedan vršak (Slika 8.). Uzorak broj 1 predstavlja kontrolni uzorak cDNA u kojem nije dokazana mutacija FLT3-TKD, a uzorak 19 predstavlja slijepu probu i ona prati očekivani linearni rast bez naznaka kontaminacije.

Krivulje taljenja



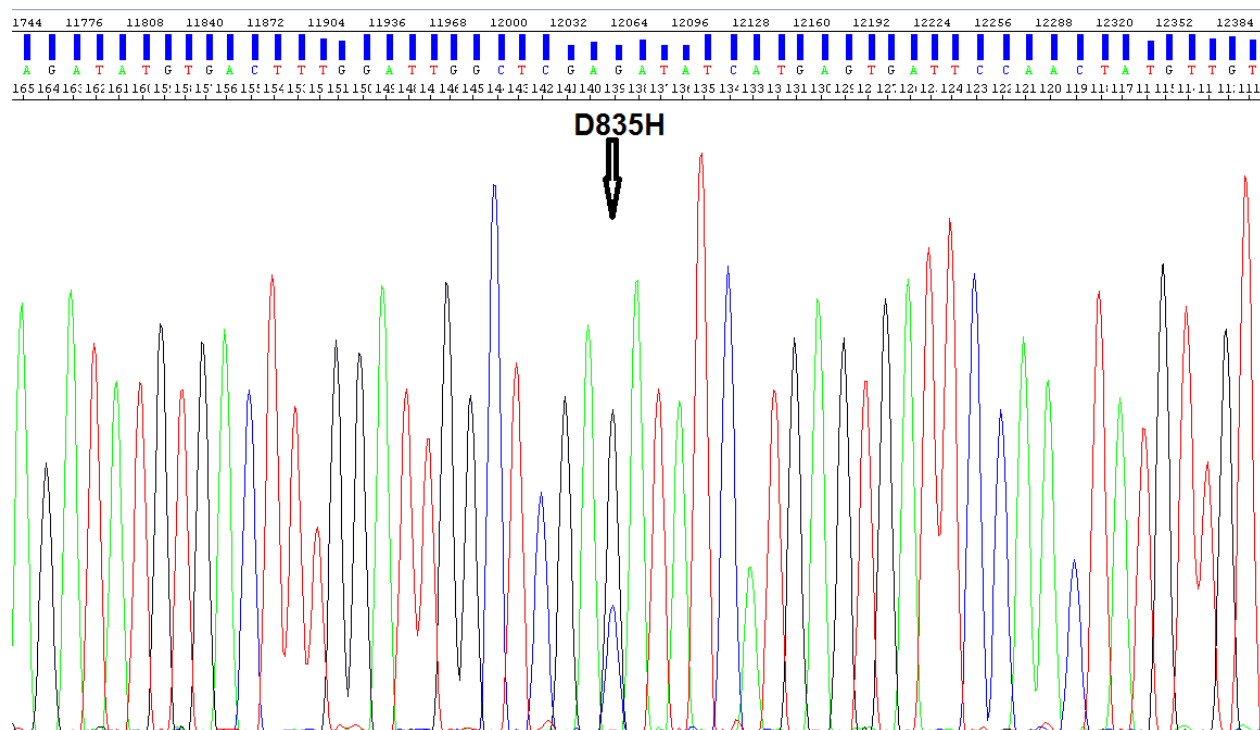
Slika 7. Grafički prikaz krivulja taljenja uzoraka bolesnika i slijepa probe

Vrškovi taljenja



Slika 8. Grafički prikaz vrškova taljenja uzoraka bolesnika i slijepa probe

Dobivena svojstvena temperatura taljenja na 56 °C označava prisutnost mutacije. Od ukupno 45 analiziranih uzoraka bolesnika, ista specifična temperatura taljenja na 56 °C dokazana je kod 4 bolesnika (8,8%). U svrhu potvrde prisutnosti mutacije, navedena 4 uzorka sekvencirana su prema Sangeru te je u svim analiziranim uzorcima dokazana mutacija na položaju 835 u regiji TKD (Slika 9.).



Slika 9. Nukleotidni slijed dobiven sekvenciranjem prema Sangeru s označenim vrškovima gvanina i citozina na istoj poziciji u sekvenci

4.2. Rasprava

Molekularne mutacije, posebice u slučajevima AML s urednim kariotipom, postaju od sve veće važnosti u procjeni prognoze bolesti i sveukupnog preživljenja. Neke mutacije pokazale su se prognostički povoljnima, a neke nepovoljnima, međutim za mutaciju FLT3-TKD nejasno je u kojoj mjeri utječe na ishod bolesti i samog liječenja. Uspostavljena metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu pokazala se brzom i učinkovitom prilikom probira bolesnika koji su kandidati za ciljanu terapiju FLT3 inhibitorima. Specifična temperatura taljenja pri 56 °C dobivena u analizi uzoraka bolesnika s AML karakteristična je za mutaciju a posljedica je promijenjenih fizikalno-kemijskih svojstava molekule DNA uslijed promjene u slijedu nukleotida zbog čega dsDNA disocira u ssDNA pri nižim temperaturama. Bolesnici čiji su uzorci pokazali niže vrijednosti temperature taljenja i dodatni vršak specifičan za mutaciju od interesa, sekvencirani su prema Sangeru u svrhu potvrde mutacije. Nakon kapilarne elektroforeze obilježenih PCR produkata, analizom dobivenih vrškova potvrđena je mutacija na položaju 835 kod koje dolazi do zamjene nukleotida i posljedično promijenjenog kodona za aminokiselinu u slijedu. Ova mutacija podudara se sa podacima iz literature u kojoj se navodi kako su promjene na položaju 835 najčešće među svim točkastim mutacijama u regiji TKD (Mead i sur., 2007; Fröhling i sur., 2002; Yamamoto i sur., 2001). Od ukupno 45 bolesnika, mutacija FLT3-TKD dokazana je kod njih četvero (8,8%). S obzirom na literaturne podatke, učestalost mutacija TKD znatno je manja u odnosu na mutacije FLT3-ITD i kreće se između 4 i 5%. Veća učestalost u našem istraživanju rezultat je dokazivanja mutacija TKD u uzorcima FLT3-ITD negativnih bolesnika, a ne u ukupnom broju bolesnika s AML i urednog kariograma. Od četiri bolesnika kod kojih je dokazana mutacija TKD, tri su ženska i jedan muški bolesnik. Bacher i sur. na znatno većem uzorku bolesnika (3082 bolesnika) nisu uspjeli dokazati statistički značajnu korelaciju u odnosu na spol ili dob bolesnika kod kojih je dokazana mutacija TKD, dok je u našem istraživanju mutacija TKD dominantna kod ženskih bolesnika (17,4%) što se može objasniti kao posljedica premalog broja analiziranih i bolesnika s dokazanom mutacijom. Bolesnici kod kojih je potvrđena mutacija u regiji TKD kandidati su za terapiju ciljanim FLT3 inhibitorima, samostalno ili uz konvencionalnu kemoterapiju, od kojih su mnogi pokazali kliničku učinkovitost i već se nalaze u kliničkoj praksi. Takve bolesnike trebalo bi kontinuirano pratiti u vremenu od trenutka primjene nove terapije kako bi se utvrdila eventualna pozitivna ili negativna prognostička vrijednost dokazane mutacije u vidu sveukupnog preživljenja i ishoda bolesti te primjenjenog liječenja

5. ZAKLJUČCI

- I. Uspostavljena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu za dokazivanje mutacije FLT3-TKD u akutnim mijeloičnim leukemijama.
- II. Analizom uzoraka odraslih bolesnika s dijagnozom AML, mutacija FLT3-TKD dokazana je u 4 bolesnika (8,8%).
- III. Sekvenciranjem prema Sangeru potvrđene su četiri dokazane mutacije na položaju 835 u regiji TKD.

6. LITERATURA

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016, 127, 2391–2405.

Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3–TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients. *Blood*, 2008, 111, 2527–2537.

Brunner AM, Li S, Fathi AT, Wadleigh M, Ho VT, Collier K et al. Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol*, 2016, 175, 496–504.

Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 2002, 100, 4325-4336.

Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol*, 127, 1550–1557.

Choudhary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T et al. AML associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*, 2005, 106, 265-273.

Cook AM, Li L, Ho Y, Lin A, Li L, Stein A et al. Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 2014, 123, 2826–2837.

Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, et al. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood*, 2015, 125, 3236–45.

Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, 2019, 33, 299-312.

Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010, 115, 453–474.

Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, 2002, 100, 4372–4380.

Ghoshal Gupta S, Baumann H, Wetzler M. Epigenetic regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 2008, 32, 1005–1014.

Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 2002, 100, 1532–1542.

Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 2004, 13, 169–178.

Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura M et al. Tandem duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogen*, 2000, 19, 624–631.

Hulegardh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Derolf AR et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol*, 2015, 90, 208–214.

Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer*, 2006, 106, 1090–1098.

Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*, 2009, 114, 2386–2392.

Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 2014, 28, 1586–1595.

Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia: Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*, 1997, 11, 1447-1452.

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 2001, 98, 1752-1759.

Kumar CC. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes Cancer*, 2011, 2, 95-107.

Lichtman MA, Henderson ES. Acute myelogenous leukemia. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, urednici, New York, McGraw-Hill, 1990, str. 251.

Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, 1998, 91, 1101-1134.

Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2007, 110, 1262-1270.

Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Appl Health Econ Health Policy*, 2013, 11, 275–286.

Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, 2000, 96, 3907-3914.

Mrózek K, Döhner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14, 106-114.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2016, 374, 2209–2221.

Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2012, 366, 1079–1089.

Patnaik Mrinal M. The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 2018, 59, 10, 2273-2286.

Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*, 2013, 121, 2734–2738.

Pratz KW, Levis M. How I treat FLT3-mutated AML. *Blood*, 2017, 129, 565–571.

Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, W. Ellwart J, Wenig K et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*, 2006, 107, 3700–3707.

Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 1996, 10, 238–248.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1990, 21, 6409–6412.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5463–5467.

Schnittger S, Bacher U, Kern W, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 25, 1297-1304.

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 2005, 106, 3733-3739.

Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood*, 2000, 95, 3765–3770.

Shah A, Andersson TM, Racht B, Bjorkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*, 2013, 162, 509–516.

Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wolfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *Br J Pharmacol*, 2011, 162, 792–805.

Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington HA, Theil KS, Mohamed A et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 2000, 96, 4075-4083.

Smith CC, Wang Q, Chin CS, Salerno S, Damon E, Lewis MJ et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 2012, 485, 260–263.

Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res*, 2003, 9, 2140–2150.

Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL et al. 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.

Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3, 650–665.

Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*, 2017, 377, 454–464.

Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 2011, 4-36.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 2002, 99, 4326–4335.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009, 114, 937–951.

Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol*, 2011, 29, 4417–4423.

Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a Cancer and Leukemia Group B study. *Cancer Res*, 2001, 61, 7233–7239

Yamada O, Kawauchi K. The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies. *JAKSTAT*, 2013, 2, 252–256.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyakawi S et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, 97, 2434-2439.

Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*, 2005, 19, 1345-1349.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Akutna mijeloična leukemija najčešća je vrsta leukemije te predstavlja četvrtinu svih leukemija koje se dijagnosticiraju u odrasloj dobi. Ukoliko se bolest ne liječi, uzrok smrti su najčešće ozbiljne sekundarne infekcije i krvarenja, a kod čak 70% bolesnika starijih od 67 godina očekuje se smrtni ishod unutar jedne godine od dijagnoze. S obzirom na to, točna procjena prognoze bolesti ima ključnu ulogu kada se pristupa liječenju bolesnika. U tom procesu stratifikacije te donošenju kliničke odluke o načinu, vrsti, trajanju i intenzitetu liječenja od velike su važnosti prognostički pokazatelji. Trenutno važeća klasifikacija SZO uz morfološke prognostičke pokazatelje uključuje citogenetičke, molekularne i biološke prognostičke pokazatelje te kliničku prezentaciju same bolesti. Iako kariotip bolesnika predstavlja najsnažniji prognostički parametar kada je riječ o AML, ipak 45% bolesnika pokazuje uredan kariotip i sukladno tome pripada intermedijarnoj prognozi stoga je velika pažnja usmjerena na potencijalno prisutne molekularne promjene. Jedne od klinički i prognostički značajnih molekularnih promjena koje su prisutne u čak trećini bolesnika s AML jesu mutacije u genu za FLT3 koja je konstitutivno aktivna u preko 90% leukemijskih blasta. Najčešća vrsta mutacija u genu za FLT3 prisutnih u do 30% slučajeva odraslih pacijenata s *de novo* dijagnosticiranom AML jesu unutarnje tandemske duplikacije, dok su mutacije unutar tirozin-kinazne domene druge po učestalosti te se pojavljuju u do 14% odraslih bolesnika. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prisutnost točkastih mutacija u genu za FLT3 uspostavom metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu kod populacije odraslih bolesnika s urednim kariogramom i negativnom mutacijom FLT3-ITD. Uspostavljenom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu dokazana je mutacija FLT3-TKD u 4 (8,8%) odrasla bolesnika s dijagnozom AML i urednim kariogramom. Prisutnost mutacija potvrđena je sekvenciranjem prema Sangeru, a metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu pokazala se brzom i učinkovitom za rutinski probir FLT3-TKD i odabir odgovarajuće terapije.

Acute myeloid leukemia is the most common type of leukemia and accounts for a quarter of all leukemias diagnosed in adulthood. If untreated, the cause of death are usually serious secondary infections and bleeding and as many as 70% of patients over 67 are expected to die within one year of diagnosis. In this regard, accurate assessment of the prognosis of the disease plays a crucial role when treating patients. Prognostic indicators are of great importance in this stratification process and in making clinical decisions about the method, type, duration and intensity of treatment. The current WHO classification along with morphological prognostic indicators also includes cytogenetic, molecular and biological prognostic indicators and clinical presentation of the disease itself. Although the karyotype of patients represents the strongest prognostic parameter in AML, however, 45% of patients show a normal karyotype and accordingly belong to the intermediate prognosis. Therefore great attention is focused on potentially present molecular changes. One of the clinically and prognostically significant molecular changes present in as many as a third of patients with AML are mutations in the FLT3 gene, which are constitutively active in over 90% of leukemic blasts. The most common type of FLT3 gene mutations present in up to 30% of adult patients with *de novo* diagnosed AML are internal tandem duplications, while mutations within the tyrosine kinase domain are second in frequency and occur in up to 14% of adult patients. The aim of this thesis was to investigate the presence of point mutations in the FLT3 gene by establishing a real-time polymerase chain reaction method in a population of adult patients with a normal karyogram and a negative FLT3-ITD mutation. The established real-time polymerase chain reaction method demonstrated the FLT3-TKD mutation in 4 (8.8%) adult patients diagnosed with AML and normal karyogram. The presence of mutations was confirmed by Sanger sequencing. The real-time polymerase chain reaction method proved to be rapid and effective for routine FLT3-TKD screening and selection of appropriate therapy.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

DOKAZIVANJE TOČKASTIH MUTACIJA U GENU ZA FLT3 METODOM LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU

Robert Kolman

SAŽETAK

Akutna mijeloična leukemija najčešća je vrsta leukemije te predstavlja četvrtinu svih leukemija koje se dijagnosticiraju u odrasloj dobi. Ukoliko se bolest ne liječi, uzrok smrti su najčešće ozbiljne sekundarne infekcije i krvarenja, a kod čak 70% bolesnika starijih od 67 godina očekuje se smrtni ishod unutar jedne godine od dijagnoze. S obzirom na to, točna procjena prognoze bolesti ima ključnu ulogu kada se pristupa liječenju bolesnika. U tom procesu stratifikacije te donošenju kliničke odluke o načinu, vrsti, trajanju i intenzitetu liječenja od velike su važnosti prognostički pokazatelji. Trenutno važeća klasifikacija SZO uz morfološke prognostičke pokazatelje uključuje citogenetičke, molekularne i biološke prognostičke pokazatelje te kliničku prezentaciju same bolesti. Iako kariotip bolesnika predstavlja najsnažniji prognostički parametar kada je riječ o AML, ipak 45% bolesnika pokazuje uredan kariotip i sukladno tome pripada intermedijarnoj prognozi stoga je velika pažnja usmjerena na potencijalno prisutne molekularne promjene. Jedne od klinički i prognostički značajnih molekularnih promjena koje su prisutne u čak trećini bolesnika s AML jesu mutacije u genu za FLT3 koja je konstitutivno aktivna u preko 90% leukemijskih blasta. Najčešća vrsta mutacija u genu za FLT3 prisutnih u do 30% slučajeva odraslih pacijenata s *de novo* dijagnosticiranom AML jesu unutarnje tandemske duplikacije, dok su mutacije unutar tirozin-kinazne domene druge po učestalosti te se pojavljuju u do 14% odraslih bolesnika. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prisutnost točkastih mutacija u genu za FLT3 uspostavom metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu kod populacije odraslih bolesnika s urednim kariogramom i negativnom mutacijom FLT3-ITD. Uspostavljenom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu dokazana je mutacija FLT3-TKD u 4 (8,8%) odrasla bolesnika s dijagnozom AML i urednim kariogramom. Prisutnost mutacija potvrđena je sekvenciranjem prema Sangeru, a metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu pokazala se brzom i učinkovitom za rutinski probir FLT3-TKD i odabir odgovarajuće terapije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 9 grafičkih prikaza, 12 tablica i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Akutna mijeloična leukemija, AML, mutacija, FLT3, reverzna transkripcija, PCR

Mentor: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Zadro**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dunja Rogić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EVIDENCE OF POINT MUTATIONS IN THE FLT3 GENE BY METHOD OF REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Robert Kolman

SUMMARY

Acute myeloid leukemia is the most common type of leukemia and accounts for a quarter of all leukemias diagnosed in adulthood. If untreated, the cause of death are usually serious secondary infections and bleeding and as many as 70% of patients over 67 are expected to die within one year of diagnosis. In this regard, accurate assessment of the prognosis of the disease plays a crucial role when treating patients. Prognostic indicators are of great importance in this stratification process and in making clinical decisions about the method, type, duration and intensity of treatment. The current WHO classification along with morphological prognostic indicators also includes cytogenetic, molecular and biological prognostic indicators and clinical presentation of the disease itself. Although the karyotype of patients represents the strongest prognostic parameter in AML, however, 45% of patients show a normal karyotype and accordingly belong to the intermediate prognosis. Therefore great attention is focused on potentially present molecular changes. One of the clinically and prognostically significant molecular changes present in as many as a third of patients with AML are mutations in the FLT3 gene, which are constitutively active in over 90% of leukemic blasts. The most common type of FLT3 gene mutations present in up to 30% of adult patients with *de novo* diagnosed AML are internal tandem duplications, while mutations within the tyrosine kinase domain are second in frequency and occur in up to 14% of adult patients. The aim of this thesis was to investigate the presence of point mutations in the FLT3 gene by establishing a real-time polymerase chain reaction method in a population of adult patients with a normal karyogram and a negative FLT3-ITD mutation. The established real-time polymerase chain reaction method demonstrated the FLT3-TKD mutation in 4 (8.8%) adult patients diagnosed with AML and normal karyogram. The presence of mutations was confirmed by Sanger sequencing. The real-time polymerase chain reaction method proved to be rapid and effective for routine FLT3-TKD screening and selection of appropriate therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 9 figures, 12 tables and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Acute myeloid leukemia, AML, mutation, FLT3, reverse transcription, PCR

Mentor: **Renata Zadro, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Zadro, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dunja Rogić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.