

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “IULIU  
HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Factori genetici implicați în  
aparitia neoplasmelor  
mieloproliferative și a  
complicațiilor trombotice ale  
acestora**

Doctorand: Adrian Pavel Trifa

Conducător științific: Prof. Dr. Ioan Victor Pop



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA, 2014

# PUBLICAȚII

## Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Trifa AP**, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Patiu M, Pop IV. JAK2 p.V617F mutation - tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in myeloproliferative neoplasms. Rom Rev Lab Med. 2009;14(1):25-30. **ISI Factor de impact: 0,097** (studiu cuprins în capitolul 2).
2. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA. Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the JAK2 rs10974944 SNP, which might predispose to the acquisition of somatic mutation JAK2(V617F). Acta Haematol.2010;123(2):84-7. **ISI Factor de impact 0,894** (studiu cuprins în capitolul 2).
3. **Trifa AP**, Cucuianu A, Petrov L, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. Ann Hematol. 2010 Oct;89(10):979-83. **ISI Factor de impact: 2,866** (studiu cuprins în capitolul 2).
4. **Trifa AP**, Crișan S, Popp RA, Cucuianu A, Buzoianu AD. JAK2 46/1 haplotype seems not to be associated with lower limb deep venous thrombosis. Blood Cells Mol Dis. 2010 Oct 15;45(3):199-200. **ISI Factor de impact: 2,316** (studiu cuprins în capitolul 2).
5. **Trifa AP**, Popp RA, Cucuianu A, Coadă CA, Urian LG, Militaru MS, Bănescu C, Dima D, Farcaș MF, Crișan TO, Petrov L, Gug C, Pop IV. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. Leuk Lymphoma. 2012 Dec;53(12):2496-7. **ISI Factor de impact: 2,301** (studiu cuprins în capitolul 3).
6. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Costache RM, Coadă CA, Sarca AD, Urian LG, Dima D, Petrov L, Farcaș MF, Militaru MS, Pop IV. Analysis of the MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms in BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms. Int J Lab Hematol. 2013 Feb;35(1):e9-12. **ISI Factor de impact: 1,293** (studiu cuprins în capitolul 3).

7. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Coadă CA, Costache RM, Sarca AD, Farcaș MF, Militaru MS, Pop IV. No association between the STAT5b rs6503691 (C>T) SNP and myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. 2013 Mar;90(3):257-8. **ISI Factor de impact: 2,548** (studiu cuprins în capitolul 3).

8. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Pațiu M, Selicean C, Militaru MS, Pop IV. Concomitant myeloproliferative and lymphoid neoplasms in two patients positive for JAK2 V617F mutation. Case report and literature review. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2013 Jun 14. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12288-013-0281-0. **ISI Factor de impact: 0,250** (studiu cuprins în capitolul 2).

9. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Coadă CA, Costache RM, Militaru MS, Vesa SC, Pop IV. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol*. 2014 Feb;93(2):203-9. **ISI Factor de impact: 2,866** (studiu cuprins în capitolul 4).

Factor de impact cumulat: **15,431**

Număr de citări (2011 - 2014): **26**

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>11</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>13</b>
<b>1. Neoplasmele mieloide</b>	<b>15</b>
<b>2. Neoplasmele mieloproliferative</b>	<b>19</b>
2.1. Generalități	19
2.2. Leucemia mieloidă cronică	19
2.3. Policitemia vera, trombocitemia esențială și mielofibroza primară	20
2.3.1. Generalități	20
2.3.2. Rolul central al mutației <i>JAK2</i> V617F în etiopatogeneza neoplasmelor mieloproliferative non- <i>BCR-ABL</i>	22
2.3.3. Mutațiile somatice <i>c-MPL</i> în trombocitemia esențială și mielofibroza primară	23
2.3.4. Mutațiile somatice <i>CALR</i> în trombocitemia esențială și mielofibroza primară	24
2.3.5. Alte mutații somatice în NMP	25
2.3.6. Factori pre- <i>JAK2</i> ?	26
2.3.7. Complicațiile neoplasmelor mieloproliferative	31
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>33</b>
<b>1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale</b>	<b>35</b>
<b>2. Studiul 1 – Analiza mutației somatice <i>JAK2</i> V617F într-un lot de pacienți cu neoplasme mieloproliferative. Contribuția haplotipului <i>JAK2</i> 46/1 la apariția neoplasmelor mieloproliferative</b>	<b>37</b>
2.1. Ipoteza de lucru/obiective	37
2.2. Material și metodă	37
2.2.1. Pacienți și controale	37
2.2.2. Genotiparea pentru mutația somatică <i>JAK2</i> V617F	38
2.2.2.1. Tehnica tetra-primer PCR pentru genotiparea mutației <i>JAK2</i> V617F	39
2.2.2.2. Tehnica nested PCR-RFLP pentru genotiparea mutației <i>JAK2</i> V617F	40
2.2.3. Tehnicile tetra-primer PCR și nested PCR-RFLP adaptate pentru evaluarea semi-cantitativă a clonei mutante <i>JAK2</i> V617F	41
2.2.4. Tehnica PCR-RFLP pentru genotiparea polimorfismului <i>JAK2</i> rs10974944 (C>G)	41
2.2.5. Analiza statistică	42
2.3. Rezultate	43
2.3.1. Comparație între tehnicile PCR-RFLP și tetra-primer PCR folosite pentru genotiparea mutației <i>JAK2</i> V617F	43
2.3.2. Distribuția mutației <i>JAK2</i> V617F în lotul de pacienți cu NMP	43
2.3.3. Distribuția polimorfismului rs10974944 în cele două loturi (pacienți și controale)	45
2.3.4. Relația dintre polimorfismul rs10974944 și tromboza venoasă profundă	49
2.4. Discuții și concluzii	49

<b>3. Studiul 2 - Analiza polimorfismelor <i>MTHFR</i> și <i>STAT5b</i>, și a mutației somatice <i>BRAF V600E</i> în neoplasmle mieloproliferative</b>	<b>53</b>
3.1. Introducere și obiective	53
3.2. Material și metodă	55
3.2.1. Pacienți și controale	55
3.2.2. Genotiparea mutației <i>BRAF V600E</i>	56
3.2.3. Genotiparea polimorfismelor <i>MTHFR 677 C&gt;T</i> și <i>1298 A&gt;C</i>	56
3.2.4. Genotiparea polimorfismului <i>STAT5b rs6503691 (C&gt;T)</i>	58
3.2.5. Analiza statistică	58
3.3. Rezultate	59
3.3.1. Distribuția mutației <i>BRAF V600E</i>	59
3.3.2. Distribuția polimorfismelor <i>MTHFR 677 C&gt;T</i> și <i>1298 A&gt;C</i>	59
3.3.3. Distribuția polimorfismului <i>STAT5b rs6503691 (C&gt;T)</i>	61
3.4. Discuții și concluzii	63
<b>4. Studiul 3 – Relația dintre mutațiile <i>Factor V Leiden</i>, <i>Protrombină G20210A</i> și polimorfismele <i>MTHFR 677 C&gt;T</i> și <i>1298 A&gt;C</i>, și primul episod trombotic major în policitemia vera și trombocitemia esențială</b>	<b>67</b>
4.1. Introducere și obiective	67
4.2. Material și metodă	67
4.2.1. Pacienți	67
4.2.2. Genotiparea mutației <i>Factor V Leiden</i>	68
4.2.3. Genotiparea mutației <i>Protrombină G20210A</i>	69
4.2.4. Genotiparea polimorfismelor <i>MTHFR 677 C&gt;T</i> și <i>1298 A&gt;C</i>	69
4.2.5. Analiza statistică	70
4.3. Rezultate	70
4.3.1. Contribuția mutațiilor <i>Factor V Leiden</i> , <i>Protrombină G20210</i> și a celor două polimorfisme <i>MTHFR</i> la riscul trombotic al pacienților cu PV și TE – analiza univariată	70
4.3.2. Contribuția altor parametri biologici la riscul trombotic al pacienților cu PV și TE – analiza univariată	71
4.3.3. Analiza multivariată a riscului de tromboze majore la pacienți cu NMP	74
4.4. Discuții și concluzii	75
<b>5. Discuții generale</b>	<b>77</b>
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>81</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>83</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>85</b>

**Cuvinte-cheie:** neoplasmle mieloproliferative, policitemia vera, trombocitemie esențială, mielofibroză primară, *JAK2 V617F*, *JAK2 46/1*, tromboze majore

**Stadiul actual al cunoașterii** este structurat în două capitole, și anume „Neoplasmele mieloides” și „Neoplasmele mieloproliferative”.

Primul capitol face o descriere succintă a tipurilor de neoplasme mieloides. Al doilea capitol este structurat în 3 sub-capitole.

Primul dintre acestea se referă la generalități despre neoplasmele mieloproliferative.

Al doilea sub-capitol face o descriere a leucemiei mieloides cronice (cel mai studiat neoplasm mieloproliferativ) și a anomaliei sale genetice, respectiv fuziunea BCR-ABL.

În fine al treilea sub-capitol reprezintă un adevărat preambul al contribuției personale, întrucât descrie policitemia vera, trombocitemia esențială și mielofibroza primară, bolile studiate în cadrul acestei teze de doctorat. Un accent deosebit este pus pe mutațiile somatice specifice acestor boli (în special *JAK2* V617F), care au fost și analizate mai departe în contribuția personală. De asemenea, sunt descrise și alte mutații somatice, care nu sunt neapărat specifice doar neoplasmelor mieloproliferative, dar care probabil au importanță prognostică. De asemenea, sunt discutați unii factori pre-*JAK2*, cu accent asupra haplotipului *JAK2* 46/1, care a fost și analizat ulterior în contribuția personală.

**Contribuția personală**, piesa-cheie a tezei, este structurată în trei studii. Toată partea experimentală s-a efectuat în laboratorul Catedrei de Genetică Medicală a UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Pacienții incluși în studiile tezei de doctorat fac parte exclusiv din cazuistica Clinicii de Hematologie din Cluj-Napoca. Așadar, putem spune că a fost o cercetare exclusiv clujeană, deși rezultatele generate sunt de interes național și internațional.

### **Studiul 1 – Analiza mutației somatice *JAK2* V617F într-un lot de pacienți cu neoplasme mieloproliferative. Contribuția haplotipului *JAK2* 46/1 la apariția neoplasmelor mieloproliferative**

Prin acest studiu, am intenționat să aduc în Transilvania, la Cluj, diagnosticul molecular pentru mutația somatică *JAK2* V617F, marker-ul molecular specific policitemiei vera, trombocitemiei esențiale și mielofibrozei primare și să caracterizez această mutație la toți pacienții aflați în observația Clinicii de Hematologie din Cluj la momentul respectiv. De asemenea, am vrut să analizez relația dintre haplotipul *JAK2* 46/1, pe de o parte, și neoplasmele mieloproliferative și mutația *JAK2* V617F, pe de altă parte.

Am inclus în acest studiu 149 de pacienți cu neoplasme mieloproliferative (69 cu policitemia vera, 65 cu trombocitemie esențială și 15 cu mielofibroză primară. De asemenea, am inclus și 150 de controale, pentru comparațiile referitoare la haplotipul *JAK2* 46/1. Am genotipat mutația *JAK2* V617F prin două tehnici – tetra-primer PCR și PCR-RFLP, pe care le-am transformat în tehnici semi-cantitative. Pentru genotiparea haplotipului *JAK2* 46/1, am dezvoltat o tehnică PCR-RFLP proprie.

Am observat mutația *JAK2* V617F la 61 de pacienți cu policitemia vera (88.4%), 37 de pacienți cu trombocitemie esențială (57%) și respectiv 9 pacienți cu mielofibroză primară (60%).

Haplotipul *JAK2* 46/1 a fost observat mult mai frecvent la pacienți față de controale (p-value<0.0001), și de asemenea la pacienții *JAK2*-pozitivi față de cei negativi (p-value = 0.001), însă el a avut o distribuție similară la pacienții *JAK2*-negativi și în lotul de control (p-value = 0.29).

În concluzie, mutația *JAK2* V617F a caracterizat aproape toți pacienții cu policitemia vera și aproximativ 60% din pacienții cu trombocitemie esențială și mielofibroză primară. Haplotipul *JAK2* 46/1 este un factor predispozant extrem de puternic pentru achiziția mutației *JAK2* V617F.

## **Studiul 2 - Analiza polimorfismelor *MTHFR* și *STAT5b*, și a mutației somatice *BRAF* V600E în neoplasmele mieloproliferative**

În acest studiu mi-am propus evaluarea unor posibili factori pre-*JAK2*, alții în afară de haplotipul *JAK2* 46/1, respectiv polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C, și *STAT5b* rs6503691. De asemenea, mi-am propus să evaluez mutația somatică *BRAF* V600E pe un lot mare de pacienți cu neoplasme mieloide în general.

Analiza polimorfismelor *MTHFR* a presupus un lot de 208 pacienți cu neoplasme mieloproliferative (90 cu policitemia vera, 101 cu trombocitemie esențială și 17 cu mielofibroză primară) și 245 de controale. Analiza polimorfismului *STAT5b* a presupus un lot de 302 pacienți cu neoplasme mieloproliferative (90 cu policitemia vera, 101 cu trombocitemie esențială, 18 cu mielofibroză primară și respectiv 93 cu leucemie mieloidă cronică) și 340 de controale. În fine, analiza mutației *BRAF* V600E a presupus un lot de 402 pacienți cu diverse neoplasme mieloide cronice și leucemie acută mieloidă. Am genotipat polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și *STAT5b* rs6503691 prin tehnica PCR-RFLP, iar polimorfismul *MTHFR* 1298 A>C și mutația *BRAF* V600E prin tehnica AS-PCR.

Niciunul din polimorfismele analizate (*MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C și respectiv *STAT5b* rs6503691) nu a fost întâlnit mai frecvent în lotul de pacienți față de cel de control. Mutația *BRAF* V600E nu a fost întâlnită la niciunul din cei 402 pacienți cu neoplasme mieloide.

### **Studiul 3 – Relația dintre mutațiile *Factor V* Leiden, *Protrombină* G20210A și polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C, și primul episod trombotic major în policitemia vera și trombocitemia esențială**

Trombozele majore reprezintă cea mai frecventă complicație a pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială. Etiopatogeneza acestor tromboze este incomplet înțeleasă. Mi-am propus să analizez legătura dintre mutațiile *Factor V* Leiden și *Protrombină* G20210A, și polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C, pe de o parte, și riscul de tromboză majoră al acestor pacienți.

În acest studiu am inclus 86 de pacienți cu policitemia vera, din care 34 (39.5%) au avut tromboze majore și 95 de pacienți cu trombocitemie esențială, din care 22 (23.1%) au avut tromboze majore.

Analiza multivariată a demonstrat că dintre cele patru mutații și polimorfisme genotipate, doar mutația *Factor V* Leiden este un determinant major al riscului de tromboză majoră al pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială (OR = 4.3; 95% CI = 1.2 – 15.9; p-value = 0.02). Alți factori puternic asociați cu trombozele majore ale acestor pacienți au fost: sexul masculin (OR = 3.5; 95% CI = 1.6 – 7.6; p-value = 0.002), însăși mutația *JAK2* V617F (OR = 6.9; 95% CI = 2.2 – 21.2; p-value = 0.001), dar și hematocritul (OR = 3.5; 95% CI = 1.6 – 7.6; p-value = 0.06). Astfel, modelul multiparametric care prezice cel mai bine riscul de tromboză majoră al pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială din România cuprinde: mutația *Factor V* Leiden, sexul masculin, mutația *JAK2* V617F și hematocritul.

Probabil că ar fi bine ca screening-ul inițial al pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială să cuprindă și testarea mutației *Factor V* Leiden.

## **6. Concluzii generale**

**1.** Am adus diagnosticul molecular pentru mutația *JAK2* V617F în Transilvania și am caracterizat statusul pentru această mutație la un număr reprezentativ de pacienți cu NMP diagnosticați la Clinica de Hematologie din Cluj în ultimele două decenii.

**2.** Testarea pentru mutația *JAK2* V617F a ajuns să se facă de rutină la toate suspiciunile de PV, TE și MFP, cel puțin din Cluj, reprezentând unul din pilonii de bază pe care se bazează astăzi diagnosticul acestor boli.



3. Tehnicile pe care le-am folosit pentru genotiparea mutației *JAK2* V617F, respectiv nested PCR-RFLP și tetra-primer PCR sunt capabile să o detecteze la încărcături chiar și de 2-3%.

4. Diluțiile seriale ale unei probe ADN cu încărcătură a alelei mutante de aproape 100% într-o probă ADN negativă pentru mutația *JAK2* V617F permit cuantificarea relativă a acestei mutații. Astfel, am transformat aceste tehnici de genotipare a mutației *JAK2* V617F într-unele semi-cantitative.

5. Deși ambele tehnici – nested PCR-RFLP și respectiv tetra-primer PCR – au o sensibilitate asemănătoare, totuși prefer tehnica tetra-primer PCR, deoarece ea este mai rapidă. Imediat după amplificarea PCR, probele pot fi analizate direct prin electroforeză, pe când tehnica PCR-RFLP presupune două runde succesive de amplificare PCR, plus o etapă de digestie enzimatică.

6. Distribuția mutației *JAK2* V617F pe care am observat-o în lotul meu inițial de 149 de pacienți cu NMP, respectiv 88.4% în PV, 57% în TE și respectiv 60% în MFP este asemănătoare cu datele din literatură.

7. În rândul pacienților cu PV și MFP, majoritatea au avut *JAK2* V617F „homozigot” (încărcătură cu alelă mutantă >50%), în vreme ce în TE majoritatea pacienților au avut *JAK2* V617F „heterozigot” (încărcătură cu alelă mutantă <50%), ceea ce din nou corespunde datelor din literatură.

8. Haplotipul *JAK2* 46/1 este un puternic factor de risc pentru achiziția mutației somatice *JAK2* V617F. Polimorfismul rs10974944, aparținând haplotipului 46/1 (mai exact genotipurile CG și GG ale acestuia), pentru care am dezvoltat o tehnică proprie de genotipare, crește semnificativ riscul de a dezvolta NMP pozitive pentru mutația *JAK2* V617F. Acest efect nu este valabil și în cazul NMP negative pentru această mutație.

9. În cadrul NMP pozitive pentru mutația *JAK2* V617F, efectul este ușor nuanțat: haplotipul 46/1 este și mai bine reprezentat la pacienții „homozigoti” pentru această mutație, față de pacienții „heterozigoti”. Așadar, haplotipul 46/1 nu doar predispune la apariția mutației somatice *JAK2* V617F, ci și oferă probabil un avantaj selectiv al clonei care a dobândit-o, în ceea ce privește supraviețuirea și proliferarea.

10. Polimorfismul rs10974944 nu este asociat cu tromboza venoasă profundă.

11. Mutația *BRAF* V600E nu este implicată în neoplasmelor mieloide. La nivelul unui grup reprezentativ, de 402 pacienți cu diverse neoplasme mieloide acute și cronice, inclusiv NMP (PV, TE și MFP), nu am observat această mutație la niciun pacient.

12. Polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C nu influențează semnificativ riscul dezvoltării NMP non-*BCR-ABL* (PV, TE și MFP).

13. Polimorfismul *STAT5b* rs6503691 nu influențează riscul apariției NMP clasice (PV, TE, MFP și LMC).

14. Trombozele majore arteriale și venoase au caracterizat 39,5% din pacienții cu PV și respectiv 23,1% din pacienții cu TE pe care i-am inclus în studiu. Astfel, trombozele au fost complicațiile cel mai frecvent întâlnite la pacienții cu PV și TE.

15. Mutația *Factor V* Leiden a fost un puternic determinant al trombozelor majore la pacienții cu PV și TE.

16. Mutația *Protrombină* G20210A și polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C au fost distribuite similar la pacienții cu și fără tromboze majore.

17. Însăși mutația *JAK2* V617F este un puternic determinant al trombozelor majore la pacienții cu PV și TE, atât în analiza univariată, cât și în cea multivariată.

18. Sexul masculin este de asemenea un puternic determinant al trombozelor majore la pacienții cu PV și TE, atât în analiza univariată, cât și în cea multivariată.

19. Hematocritul este un determinant major al trombozelor majore la pacienții cu PV, atât în analiza univariată, cât și în cea multivariată.

20. Leucocitoza a contribuit semnificativ la riscul de tromboze majore al pacienților cu PV și TE ca factor independent, însă în analiza multivariată această observație și-a pierdut semnificația statistică.

## 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

**Consider că teza mea este originală**, pornind de la însăși tema de cercetare abordată. Neoplasmale mieloproliferative non-*BCR-ABL*, respectiv policitemia vera, trombocitemia esențială și mielofibroza primară, reprezintă boli studiate puțin, la nivel mondial. Există câteva grupuri de cercetători în toată lumea care se ocupă de studiul acestor boli. În Europa, sunt câte două grupuri în Italia și Franța, și câte unul în Spania, Marea Britanie, Germania, Elveția, Austria și respectiv Ungaria care se ocupă în special de studiul neoplasmelor mieloproliferative. Pot să spun că am reușit să creez și să condensez și un grup român care se ocupă de studiul acestora. Teza mea și publicațiile

care au decurs din ea reprezintă premise importante pentru creșterea vizibilității internaționale a cercetării medicale clujene, cel puțin în aria hematologiei.

Toate etapele cercetării mele s-au desfășurat în Laboratorul de Genetică Moleculară al Disciplinei de Genetică Medicală a UMF Cluj, fără a apela la colaboratori din afara țării.

Am reușit să aduc în Transilvania, la Cluj, diagnosticul molecular pentru mutația *JAK2* V617F. Acum, toate suspiciunile de neoplasm mieloproliferativ non-*BCR-ABL* sunt investigate corect, testarea mutației *JAK2* V617F reprezentând unul dintre primii pași ai algoritmului diagnostic. Mai mult de atât, medicii hematologii și pacienții beneficiază și de o estimare a încărcăturii cu alelă mutantă *JAK2* V617F, deoarece acest detaliu este util mai ales în cazurile „overlapping” (de exemplu TE/PV mascat?).

În rândul **contribuțiilor inovative** pe care le-a furnizat teza mea de doctorat, aș vrea să menționez:

- o tehnică PCR-RFLP proprie pentru genotiparea polimorfismului rs10974944 (C>G), parte a haplotipului *JAK2* 46/1, pe care am dezvoltat-o împreună cu colegul meu Radu Popp, și care face obiectul unui patent;

- evaluarea mutației *BRAF* V600E la nivelul unui lot de 402 pacienți cu diverse neoplasme mieloid acute și cronice (inclusiv policitemia vera, trombocitemia esențială și mielofibroza primară);

- evaluarea relației dintre polimorfismele *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C, și apariția neoplasmelor mieloproliferative non-*BCR-ABL*, asemenea date ne-existând în literatură până la momentul respectiv;

- evaluarea relației dintre polimorfismul *STAT5b* rs6503691 și riscul apariției neoplasmelor mieloproliferative, asemenea date ne-existând în literatură până la momentul respectiv;

- evaluarea relației dintre polimorfismul rs10974944 (haplotipul *JAK2* 46/1), pe de o parte, și neoplasmele mieloproliferative non-*BCR-ABL* și mutația *JAK2* V617F, pe de altă parte; la momentul respectiv, existau doar 5 articole pe plan mondial care tratau această problemă;

- evaluarea relației dintre mutațiile și polimorfismele *Factor V* Leiden, *Protrombină* G20210A, și *MTHFR* 677 C>T și 1298 A>C și riscul de tromboză majoră al pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială; existau aproximativ 4 studii în literatură care abordau această temă;

- dezvoltarea unui model multiparametric de predicție a riscului de tromboze a pacienților cu policitemia vera și trombocitemie esențială, care să țină cont atât de factorii genetici (*Factor V* Leiden, *Protrombină* G20210), cât și de parametrii demografici și hematologici (sex, număr de leucocite, hematocrit, mutația *JAK2* V617F).

**“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY, CLUJ-NAPOCA**

**PhD thesis summary**

**Genetic factors involved in the  
occurrence of the  
myeloproliferative neoplasms  
and their thrombotic  
complications**

PhD student: Adrian Pavel Trifa

Scientific coordinator: Prof. Dr. Ioan Victor Pop



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA, 2014

# PUBLICATIONS

## Articles published *in extenso* from the PhD thesis

1. **Trifa AP**, Popp RA, Cucuianu A, Dima D, Militaru MS, Patiu M, Pop IV. JAK2 p.V617F mutation - tetra-primer PCR and PCR-RFLP comparative semiquantitative approaches for estimation of the mutant allele in myeloproliferative neoplasms. Rom Rev Lab Med. 2009;14(1):25-30. **ISI Impact factor: 0,097** (study belonging to chapter 2).
2. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA. Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the JAK2 rs10974944 SNP, which might predispose to the acquisition of somatic mutation JAK2(V617F). Acta Haematol.2010;123(2):84-7. **ISI Impact factor 0,894** (study belonging to chapter 2).
3. **Trifa AP**, Cucuianu A, Petrov L, Urian L, Militaru MS, Dima D, Pop IV, Popp RA. The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms. Ann Hematol. 2010 Oct;89(10):979-83. **ISI Impact factor: 2,866** (study belonging to chapter 2).
4. **Trifa AP**, Crişan S, Popp RA, Cucuianu A, Buzoianu AD. JAK2 46/1 haplotype seems not to be associated with lower limb deep venous thrombosis. Blood Cells Mol Dis. 2010 Oct 15;45(3):199-200. **ISI Impact factor: 2,316** (study belonging to chapter 2).
5. **Trifa AP**, Popp RA, Cucuianu A, Coadă CA, Urian LG, Militaru MS, Bănescu C, Dima D, Farcaş MF, Crişan TO, Petrov L, Gug C, Pop IV. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. Leuk Lymphoma. 2012 Dec;53(12):2496-7. **ISI Impact factor: 2,301** (study belonging to chapter 3).
6. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Costache RM, Coadă CA, Sarca AD, Urian LG, Dima D, Petrov L, Farcaş MF, Militaru MS, Pop IV. Analysis of the MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms in BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms. Int J Lab Hematol. 2013 Feb;35(1):e9-12. **ISI Impact factor: 1,293** (study belonging to chapter 3).

7. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Coadă CA, Costache RM, Sarca AD, Farcaș MF, Militaru MS, Pop IV. No association between the STAT5b rs6503691 (C>T) SNP and myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol.* 2013 Mar;90(3):257-8. ISI **Impact factor: 2,548** (study belonging to chapter 3).

8. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Pațiu M, Selicean C, Militaru MS, Pop IV. Concomitant myeloproliferative and lymphoid neoplasms in two patients positive for JAK2 V617F mutation. Case report and literature review. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2013 Jun 14. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12288-013-0281-0. ISI **Impact factor: 0,250** (study belonging to chapter 2).

9. **Trifa AP**, Cucuianu A, Popp RA, Coadă CA, Costache RM, Militaru MS, Vesa SC, Pop IV. The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol.* 2014 Feb;93(2):203-9. ISI **Impact factor: 2,866** (study belonging to chapter 4).

Impact factor (total): **15,431**

Number of citations (2011 - 2014): **26**

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>CURRENT KNOWLEDGE</b>	<b>13</b>
<b>1. The myeloid neoplasms</b>	<b>15</b>
<b>2. The myeloproliferative neoplasms</b>	<b>19</b>
2.1. Overview	19
2.2. Chronic myeloid leukemia	19
2.3. Polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis	20
2.3.1. Overview	20
2.3.2. The central role of somatic mutation <i>JAK2</i> V617F in the pathogenesis of non- <i>BCR-ABL</i> myeloproliferative neoplasms	22
2.3.3. <i>c-MPL</i> somatic mutations in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis	23
2.3.4. <i>CALR</i> somatic mutations in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis	24
2.3.5. Other somatic mutations in MPNs	25
2.3.6. Pre- <i>JAK2</i> factors?	26
2.3.7. The complications of the myeloproliferative neoplasms	31
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>33</b>
<b>1. Working hypothesis and general objectives</b>	<b>35</b>
<b>2. Study 1 – The distribution of <i>JAK2</i> V617F mutation in a cohort of patients with MPNs. The contribution of <i>JAK2</i> 46/1 haplotype to the occurrence of MPNs</b>	<b>37</b>
2.1. Background and objectives	37
2.2. Material and methods	37
2.2.1. Patients and controls	37
2.2.2. Genotyping the <i>JAK2</i> V617F mutation	38
2.2.2.1. Tetra-primer PCR technique	39
2.2.2.2. Nested PCR-RFLP technique	40
2.2.3. Optimizing tetra-primer PCR and nested PCR-RFLP techniques for the semiquantitative evaluation of the mutant clone <i>JAK2</i> V617F	41
2.2.4. PCR-RFLP technique for genotyping the <i>JAK2</i> rs10974944 (C>G) SNP	41
2.2.5. Statistical analysis	42
2.3. Results	43
2.3.1. Comparison between tetra-primer PCR and nested PCR-RFLP techniques used for genotyping the <i>JAK2</i> V617F mutation	43
2.3.2. The distribution of <i>JAK2</i> V617F mutation in the cohort of patients	43
2.3.3. The distribution of the <i>JAK2</i> rs10974944 (C>G) SNP in patients and controls	45
2.3.4. The relationship between the rs10974944 SNP and deep venous thrombosis	49
2.4. Discussion and conclusions	49



<b>3. Study 2 – Analysis of the <i>MTHFR</i> and <i>STAT5b</i> polymorphisms, and the somatic mutation <i>BRAF</i> V600E in MPNs</b>	<b>53</b>
3.1. Background and objectives	53
3.2. Material and methods	55
3.2.1. Patients and controls	55
3.2.2. Genotyping the <i>BRAF</i> V600E mutation	56
3.2.3. Genotyping the <i>MTHFR</i> 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms	56
3.2.4. Genotyping the <i>STAT5b</i> rs6503691 (C>T) polymorphism	58
3.2.5. Statistical analysis	58
3.3. Results	59
3.3.1. The distribution of <i>BRAF</i> V600E mutation	59
3.3.2. The distribution of <i>MTHFR</i> 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms	59
3.3.3. The distribution of <i>STAT5b</i> rs6503691 (C>T) SNP	61
3.4. Discussion and conclusions	63
<b>4. Study 3 – The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and <i>MTHFR</i> mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia</b>	<b>67</b>
4.1. Background and objectives	67
4.2. Material and methods	67
4.2.1. Patients	67
4.2.2. Genotyping for <i>Factor V</i> Leiden mutation	68
4.2.3. Genotyping for <i>Prothrombin</i> G20210A mutation	69
4.2.4. Genotyping the <i>MTHFR</i> 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms	69
4.2.5. Statistical analysis	70
4.3. Results	70
4.3.1. The contribution of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and <i>MTHFR</i> mutations to the thrombotic risk of MPN patients – univariate analysis	70
4.3.2. The contribution of other biological features to the thrombotic risk of MPN patients – univariate analysis	71
4.3.3. Multivariate analysis for assessing the thrombotic risk in MPN patients	74
4.4. Discussion and conclusions	75
<b>5. General discussion</b>	<b>77</b>
<b>6. General conclusions</b>	<b>81</b>
<b>7. Originality and innovative contributions of the PhD thesis</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>85</b>

**Key-words: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis, *JAK2* V617F, *JAK2* 46/1, major thrombosis**

The **Current knowledge** section is structured in two chapters: „The myeloid neoplasms” and „The myeloproliferative neoplasms”.

The first chapter provides a brief description of the different types of myeloid neoplasms. The second chapter is structured in three sub-chapters. The first one provides an overview of the myeloproliferative neoplasms. The second one describes the most studied myeloproliferative neoplasm, chronic myeloid leukemia, and its associated genetic anomaly, the *BCR-ABL* fusion. The third one represents the preamble of the personal contribution, as it describes the diseases studied in this thesis, that are polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. This sub-chapter has a special focus on the somatic mutations encountered in the myeloproliferative neoplasms, especially *JAK2* V617F, which will be further analyzed in the personal contribution. Several factors pre-*JAK2* are also discussed, with a special focus on the *JAK2* 46/1 haplotype, which will be analyzed in the personal contribution.

The **personal contribution**, the most important part of the thesis, is structured in three studies. All of the experiments were performed in the laboratory of the Medical Genetics at „Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca. All the patients included in the studies are diagnosed in the Hematology Clinic from Cluj-Napoca. Thus, we may say it was a research performed entirely in Cluj-Napoca, even though the results are of national and international interest.

### **Study 1 – The distribution of *JAK2* V617F mutation in a cohort of patients with MPNs. The contribution of *JAK2* 46/1 haplotype to the occurrence of MPNs**

My aims were to implement in Cluj-Napoca the routine diagnosis for the somatic mutation *JAK2* V617F, the molecular marker of the polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, and to retrospectively analyze it in all patients diagnosed in the Clinic of hematology from Cluj-Napoca. Meanwhile, I aimed to analyze the relationship between the *JAK2* 46/1 haplotype, and MPNs and somatic mutation *JAK2* V617F.

This study included 149 patients with MPNs (69 with PV, 65 with ET and 15 with PMF), and 150 controls. I genotyped the *JAK2* V617F mutation by two techniques: tetra-primer PCR and nested PCR-RFLP. In order to genotype the *JAK2* 46/1 haplotype, I developed an own PCR-RFLP technique.

*JAK2* V617F mutation was seen in 61 patients with PV (88.4%), 37 patients with ET (57%) and 9 patients with PMF (60%).

*JAK2* 46/1 haplotype was seen significantly more frequently in patients than in controls ( $p$ -value<0.0001), and also in *JAK2*-positive patients than in those *JAK2*-

negative (p-value = 0.001). However, it was similarly distributed in *JAK2*-negative patients and in controls (p-value = 0.29).

In conclusion, *JAK2* V617F mutation characterized almost all patients with PV and around 60% of patients with ET and PMF. *JAK2* 46/1 haplotype strongly predisposes to the acquisition of the somatic mutation *JAK2* V617F.

### **Study 2 – Analysis of the *MTHFR* and *STAT5b* polymorphisms, and of the somatic mutation *BRAF* V600E in MPNs**

This study evaluated several putative pre-*JAK2* factors, beside the *JAK2* 46/1 haplotype, namely the *MTHFR* 677 C>T, 1298 A>C and *STAT5b* rs6503691 polymorphisms. The study also analyzed the somatic mutation *BRAF* V600E in a large cohort of patients with myeloid neoplasms.

The two *MTHFR* polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP and AS-PCR techniques in 208 patients with MPNs (90 with PV, 101 with ET and 17 with PMF) and 245 controls. The *STAT5b* rs6503691 polymorphism was analyzed by PCR-RFLP technique in 302 patients with MPN (90 with PV, 101 with ET, 18 with PMF and 93 with CML). Finally, the somatic mutation *BRAF* V600E was analyzed by AS-PCR technique in 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms.

None of the polymorphisms analyzed (*MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C and *STAT5b* rs6503691) contributed significantly to the pathogenesis of the MPNs. *BRAF* V600E mutation was completely absent in the whole cohort of 402 patients with different myeloid neoplasms.

### **Study 3 – The relationship between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and *MTHFR* mutations and the first major thrombotic episode in polycythemia vera and essential thrombocythemia**

Major thrombosis represents the most frequent complication in PV and ET patients. The thrombotic events frequently seen in these patients have a complex, but not yet fully understood pathogenesis. This study evaluated the relationship between *Factor V* Leiden, *Prothrombin* G20210A mutations, and *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms, and the risk of major thrombosis of these patients.

This study comprised 86 patients with PV, of which 34 (39.5%) had major thrombosis, and 95 patients with ET, of which 22 (23.1%) had major thrombosis.

The multivariate analysis revealed that, among the four mutations analyzed, only *Factor V* Leiden significantly increased the risk of major thrombosis in MPN patients (OR = 4.3; 95% CI = 1.2 – 15.9; p-value = 0.02). Other factors strongly associated with major thrombosis were: the male sex (OR = 3.5; 95% CI = 1.6 – 7.6; p-value = 0.002), the *JAK2* V617F mutation (OR = 6.9; 95% CI = 2.2 – 21.2; p-value = 0.001), and the haematocrit (OR = 3.5; 95% CI = 1.6 – 7.6; p-value = 0.06). Thus, the multiparametric model most accurate predicting the risk of major thrombosis in

Romanian patients with PV and ET comprises: the *Factor V* Leiden mutation, the male sex, the *JAK2* V617F mutation and the haematocrit.

Patients with PV and ET probably should be screened for *Factor V* Leiden mutation during the initial work-up.

## 6. General conclusions

1. I managed to bring in Cluj-Napoca the diagnosis for the *JAK2* V617F mutation and to test it retrospectively in all patients diagnosed in Cluj-Napoca in the last two decades.

2. Testing for *JAK2* V617F is now routinely performed as one of the first steps of the diagnostic algorithm in all suspected cases of PV, ET and PMF.

3. The techniques I used for genotyping the *JAK2* V617F, tetra-primer PCR and nested PCR-RFLP detect this mutation even at allele-burdens of 2-3%.

4. The serial dilutions of an almost 100% *JAK2* V617F DNA sample in a *JAK2* V617F negative one permit the relative quantitation of this mutation. Thus, I transformed the tetra-primer PCR and nested PCR-RFLP techniques in semi-quantitative tools for assessing the mutation load.

5. Even though both techniques have similar sensitivities, I prefer the tetra-primer PCR technique, because it is faster. The samples can be run in electrophoresis gels immediately after the amplification, which is not the case for the nested PCR-RFLP technique, which supposes two successive rounds of PCR plus an enzymatic digestion step.

6. I saw the *JAK2* V617F mutation in 88.4% of patients with PV, 57% of patients with ET and 60% of patients with PMF, data similar with those reported in literature.

7. Most of the patients with PV and PMF positive for *JAK2* V617F mutation were homozygotes (allele-burden > 50%), while most of the ET patients positive for *JAK2* V617F mutation were heterozygotes (allele-burden < 50%).

8. *JAK2* 46/1 haplotype strongly predisposes to the acquisition of the somatic mutation *JAK2* V617F. The rs10974944 SNP, for which I developed an own PCR-RFLP technique, is significantly associated with *JAK2* V617F-positive MPNs, but not with those negative.

**9.** Among the MPNs positive for the *JAK2* V617F mutation, the *JAK2* 46/1 haplotype is more prevalent in „homozygous“ patients than in the „heterozygous“ ones. Thus, *JAK2* 46/1 haplotype not only predisposes to the acquisition of the somatic mutation *JAK2* V617F, but also confers a selective advantage, concerning the survival and proliferation of the clone that acquired it.

**10.** The rs10974944 SNP is not associated with deep venous thrombosis.

**11.** The *BRAF* V600E mutation is not involved in the myeloid malign transformation, as it was completely absent in a large cohort of patients with various chronic and acute myeloid neoplasms.

**12.** The *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms are not associated with the occurrence of non-BCR-ABL MPNs (PV, ET and PMF).

**13.** The *STAT5b* rs6503691 polymorphism is not associated with the occurrence of MPNs (PV, ET, PMF and CML).

**14.** Major thrombosis (arterial and venous) was seen in 39.5% of PV patients and 23.1% of ET patients. Thus, major thrombosis was the most frequent complication seen in PV and ET patients.

**15.** *Factor V* Leiden mutation is a strong determinant of major thrombosis in PV and ET patients.

**16.** *Prothrombin* G20210 mutation and the *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms did not contribute to the risk of major thrombosis of PV and ET patients.

**17.** The *JAK2* V617F mutation significantly increases the risk of major thrombosis in PV and ET patients, in both univariate and multivariate analysis.

**18.** The male sex significantly increases the risk of major thrombosis in PV and ET patients, in both univariate and multivariate analysis.

**19.** The haematocrit significantly increases the risk of major thrombosis in PV patients, in both univariate and multivariate analysis.

**20.** Leukocytosis significantly contributed to the risk of major thrombosis in univariate analysis. However this finding lost its statistical significance in multivariate analysis.

## 7. Originality and innovative contributions of the PhD thesis

I consider my thesis is **original**, given the research topic itself. Non-BCR-ABL myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis) represent diseases less studied than other haematological malignancies. There are only several research groups studying these diseases. For instance, in Europe there are one-two groups in Italy, France, Spain, Great Britain, Germany, Switzerland, Austria and Hungary. I managed to gather haematologists from several centers in order to create a Romanian group for studying these diseases.

All the steps of my experimental research happened in the Laboratory of the Medical Genetics Department at the University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, without calling for help to external collaborators.

Among the **innovative contributions** provided by my thesis, I would like to mention:

- an own PCR-RFLP technique for genotyping the rs10974944 (C>G) SNP, that I developed together with my colleague Radu Popp;
- the evaluation of the *BRAF* V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms;
- the evaluation of the relationship between non-BCR-ABL MPNs and the *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms; such data were missing from the literature;
- the evaluation of the relationship between the MPNs and *STAT5b* rs6503691 SNP; such data were missing from the literature;
- the evaluation of the relationship between the rs10974944 SNP (*JAK2* 46/1 haplotype), on one hand, and the non-BCR-ABL MPNs and the somatic mutation *JAK2* V617F, on the other hand; there were only 5 studies performed in the world on thi topic;
- the evaluation of the relationship between the *Factor V* Leiden, *Protrombină* G20210A, and *MTHFR* 677 C>T and 1298 A>C mutations and polymorphisms, and the risk of major thrombosis of patients with PV and ET; there were only around 4 studies published in the world on this topic;
- the development of a multiparametric model for predicting the risk of major thrombosis in patients with PV and ET, incorporating both genetic and non-

genetic factors (Factor V Leiden and Prothrombin G20210A mutations, sex, WBC, counts, haematocrit, JAK2 V617F mutation).