

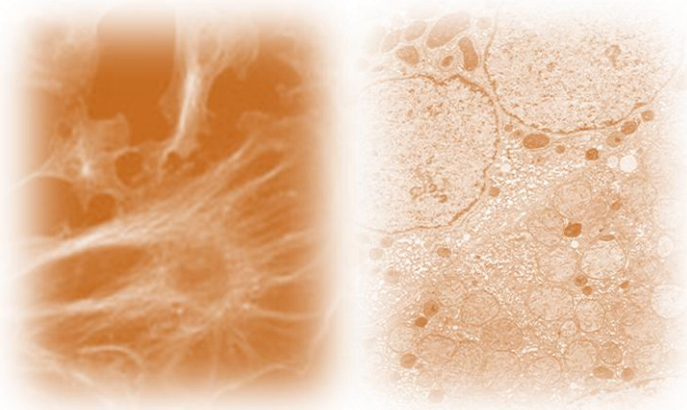


---

**Påvisning av *PDGFRA*-  
og *PDGFRB*-  
rearrangeringer i  
myeloide og lymfoide  
neoplasier**

**Helen Vålerhaugen**

**2010**



**Påvisning av**  
***PDGFRA*- og *PDGFRB*-rearrangeringer**  
**i myeloide og lymfoide neoplasier**

av

**Helen Vålerhaugen**

**Master i biomedisin**

**Avdeling helsefag**

Masteroppgave, 60 studiepoeng, utført ved Avdeling for Patologi,  
Radiumhospitalet og HiO

15. desember 2010



## Forord

Arbeidet bak denne masteroppgaven ble utført som del av arbeidet mitt ved Molekylærpatologisk laboratorium, Radiumhospitalet. Jeg er takknemlig for at min arbeidsgiver tillot en slik løsning. Det har vært en strevsom men lærerik periode. Heldigvis har jeg ikke dratt lasset helt alene. Mange har hjulpet meg på veien som jeg ønsker å rette en takk til. Aller først vil jeg nevne min veileder Anne Tierens. Det at jeg fikk en slik kunnskapsrik og dyktig veileder har vært til uvurderlig hjelp. En stor takk til Hege G. Russnes som sørget for at jeg fikk lov til å starte studiene og som stilte opp som biveileder. Hun har også kommet med gode innspill i slutfasen av skrivingen. Takk til Jan Delabie som hadde ideen til oppgaven. Det ble mer utfordrende enn jeg først hadde forestilt meg!

Jeg må nevne mine gode kollegaer ved laboratoriet som har fått unna alle analysene mens jeg har vært fritatt fra den daglige rutinen. En ekstra takk til Heidemarie Svendsen som har vært hjelpsom med preparering av kontroller og prøver. Videre må jeg takke Jeanne-Marie Berner som har kommet med mange gode tips til skrivingen, og som sammen med Bente Risberg har lest korrektur for meg. Men også resten av molpat-gjengen som har bidratt i det daglige (Abdirashid, Gunhild, Heidi, Hien, Lene, Margunn, Sarah og Silje). I tillegg må Elisabeth Emilsen nevnes som har dyrket cellelinjene jeg benyttet. Tusen takk alle sammen!

Og tilslutt må mine kjære nevnes som kan ta æren for at jeg kom meg igjennom på normert tid. Mamma og pappa som stilte opp som barnevakter. Mannen min Roy-Eirik som har tatt hovedansvaret for hjemmet og passet godt på våre to små, Synnøve og Stella. Hans datakunnskaper kom også endelig til nytte.

Moss, 15. desember 2010.

Helen Vålerhaugen

## Sammendrag

Myeloide og lymfoide neoplasier med genetiske avvik i platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (*PDGFRA*) og platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (*PDGFRB*) er sjeldne sykdommer. Sykdommen er ofte forbundet med eosinofili, men dette kan variere. Det er viktig å påvise disse sykdommene, siden de er forbundet med forhøyet tyrosinkinaseaktivitet og derfor kan respondere på behandling med tyrosinkinasehemmere. Det hyppigste avviket skyldes en intrakromosomal delesjon på kromosom 4q12 som fusjonerer genet for FIP1-like 1 (*FIP1L1*) med genet for *PDGFRA*. Sykdommen presenterer seg stort sett som kronisk eosinofil leukemi. Når det gjelder *PDGFRB*-relaterte sykdommer, vil pasientene ofte presentere seg som kronisk myelomonocytær leukemi og mer sjelden atypisk kronisk myelogen leukemi. Det hyppigste genetiske avviket her er t(5;12)(q31-33;p12), som danner ets variant 6 (*ETV6*)-*PDGFRB*-fusjonsgen. Men også andre translokasjoner av *PDGFRA* og *PDGFRB* er beskrevet.

Det ble etablert to forskjellige tester for påvisning av *FIP1L1*-*PDGFRA*-fusjonsgen, en i DNA- og en i RNA-ekstrakt. Testen som benytter RNA er både hurtig og enkel å utføre. Den kan påvise lavere mengde tumorceller sammenlignet med DNA-testen. Begge testene er trolig like sensitive og spesifikke, men for få prøver ble analysert til å trekke en endelig konklusjon. I tillegg ble det utviklet en allel-spesifikk kvantitativ real-time PCR for å måle minimal restsykdom. Denne testen kan påvise 1 mutert celle i  $10^5$  normale celler og har et kvantitativt område på minimum 4 log.

For å påvise alternative *PDGFRA* og *PDGFRB*-genrearrangeringer ble det utviklet screeningstester for å påvise et forhøyet transkriptnivå av tyrosinkinasedomenet. Genuuttrykket ble normalisert på to måter. Først med referansegnet *ABL1*, deretter med immunoglobulindomene-transkript til respektive reseptorgen. Begge pasientprøvene og cellelinje med kjent genrearrangering testet positivt ved denne fremgangsmåten. Men i noen av cellelinjene og i en pasientprøve hvor det ikke er beskrevet *PDGFR*-genrearrangeringer, ble det også påvist forhøyet transkriptnivå ved normalisering med *ABL1*. Dette var derimot ikke tilfelle dersom normalisering ble gjort med immunoglobulindomenet, og dette demonstrerer at sistnevne metode mest sannsynlig er mer spesifikk. Et resiprokt transkript vil kun uttrykkes ved et fåtall tilfeller og det er ikke forventet at dette vil være i samme nivå som det onkogene fusjonsgentranskriptet.

## Abstract

Myeloid and lymphoid neoplasms with abnormalities of platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (*PDGFRA*) gene and platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (*PDGFRB*) gene are rare diseases. The patients usually present with eosinophilia, but not always. It is important to identify these disorders since the aberrant tyrosine kinase activity can make the disease responsive to tyrosine kinase inhibitors. The most frequent abnormality associated with *PDGFRA* rearrangement is due to an intra chromosomal deletion on 4q12, which fuses the FIP1-like 1 (*FIP1L1*) gene to *PDGFRA*. Presentation is generally as chronic eosinophilic leukemia. In the case of *PDGFRB*-related disorders, the patients often present with chronic myelomonocytic leukemia or seldom with atypical chronic myeloid leukemia. In the former disorder, there is usually a t(5;12)(q31-33;p12) with formation of an ets variant 6 (*ETV6*)-*PDGFRB* fusion gene. Variant translocations associated with *PDGFRA* as well as *PDGFRB* have been recognized

Two different PCR-tests have been established to detect the *FIP1L1*-*PDGFRA*-fusion, one using DNA extract and the other RNA extract. The test using RNA is quick and easy to perform. It allows detection of a lower amount of tumor cells than the DNA test. Both tests seem equally sensitive and specific, but the number of analyzed samples was too low to reach a final conclusion. In addition, an allele-specific oligonucleotide quantitative real-time PCR assay was designed to measure minimal residual disease. This assay can detect one mutated cell in a background of  $10^5$  normal cells and has a quantitative range of at least 4 log.

To detect alternative *PDGFRA* and *PDGFRB* rearrangements, we developed a screening test to measure increased transcript levels of the tyrosine kinase domain of the respective genes. Gene expression levels were normalized by two different approaches. First, normalization was performed to the reference gene *Abi1* and secondly to the transcripts of the receptors immunoglobulin domain. Both our patients and cell line with known rearrangements tested positive using these approaches. However, in some of the cell lines and 1 patient sample, in which no *PDGFR*-gene rearrangement was described, increased transcript levels were found using normalization to *Abi1*. This was not the case when normalizing was performed against the immunoglobulin domain demonstrating that the latter approach is likely more specific. In the few cases, in which a reciprocal transcript will be expressed, it is unlikely that this is at the same level as the oncogenic fusion transcript.

## Forkortelser

6-FAM: 6 - <i>Carboxyfluorescein</i>	IL: Interleukin
<i>ABL1</i> : c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	Ile: isoleucin
aKML: atypisk kronisk myelogen leukemi	<i>JAK2</i> : Janus kinase 2
<i>ALB</i> : albumin	JM: juxtamembrandomenet
ALL; akutt lymfoblastisk leukemi	KEL, NOS: kronisk eosinofil leukemi, not otherwise specified
AML: akutt myelogen leukemi	KEL: kronisk eosinofil leukemi
APL: akutt promyelocyt leukemi	KI: innskutt kinaseregiondomene
ASO: allelspesifikk oligonukleotid	KIT: stamcelle faktor reseptor
ATP: adenosintrifosfat	<i>KIT</i> : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
BBQ: BlackBerry Quencher	KML: kronisk myelogen leukemi
<i>BCR</i> : breakpoint cluster region	KMML: kronisk myelomonocytær leukemi
BM: benmarg	<i>KRAS</i> : v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog;
bp: basepar	LB: Luria-Bertani
cDNA: komplementær DNA	LSC: leukemiske stamceller
<i>CEBPA</i> : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	LT-HSC: long term HSC
<i>CHIC2</i> : cysteine-rich hydrophobic domain 2	m: middelverdi
CLP: lymfoid progenitor (common lymphoid progenitor)	mRNA: messenger(budbringer) RNA
CMP: myeloid progenitor (common myeloid progenitor)	MDS/MPN; myelodysplastisk/myeloproliferativ neoplasi
Cq: kvantifiseringssyklus	MDS: myelodysplastisk syndrom
CSF1R: kolonistimulerende faktor 1-reseptor	MEP: megakaryocyt/erytrocytt progenitor (megakaryocyte/erythrocyte progenitor)
CT: C-terminal hale	MGB: minor groove binder
cTK: cytoplasmatiske tyrosinkinase	<i>MLL</i> : myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
DNA: deoksyribonukleinsyre	MMR: major molecular response
dNTP: deoksynukleotid trifosfat	MPN: myeloproliferativ neoplasi
EAC: Europe against cancer program	MPP: multipotent progenitor
E.coli: Escherichia coli	MRD: minimal restsykdom (minimal residual disease)
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid	mRNA: messenger RNA
<i>ETV6</i> : ets variant 6	<i>MYH11</i> : myosin, heavy chain 11, smooth muscle
F: forover	NB: normalblod
<i>FGFR1</i> : fibroblast growth factor receptor 1	NB-10: normalblodblanding fra 10 givere
<i>FIP1L1</i> : FIP1 like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	n-BM: normalbenmarg
FISH: fluorescens in situ hybridisering	NK: natural killer
FLT3: FLT3-ligand reseptor	nM: nanomolar
<i>FLT3</i> : fms-related tyrosine kinase 3	<i>NPM1</i> : nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
GMP: granulocyt-makrofag progenitor (granulocyte-macrophage progenitor)	<i>NRAS</i> : neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
<i>GUSB</i> : glucuronidase, beta	NTC: negativtemplat kontroll
HES: ideopatisk hypereosinofil syndrom	P: probe
HSC: hematopoetisk stamcelle (hematopoietic stem cell)	PB: perifert blod
I: isoleucin	
IE: ideopatisk eosinofili	
IG: immunglobulin	
IgH: immunglobulin tungekjede	

PBS: Fosfatbuffret saltvann  
PCR: polymerasekjede reaksjon  
*PDGFRA*: platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide  
*PDGFRB*: platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide  
PDGFR $\alpha$ : platederivert vekstfaktor reseptor alfa  
PDGFR $\beta$ : platederivert vekstfaktor reseptor beta  
*PML*: promyelocytic leukemia  
PTB: fosfotyrosinbindende domene  
PTD: delevis tandem duplikasjon (partial tandem duplication)  
*PTPN11*: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11  
pTyr: fosforylert Tyr  
qPCR: real-time PCR/ kvantitativ PCR  
R: revers  
*RARA*: retinoic acid receptor, alpha  
RBC: røde blodceller  
g: relativ sentrifugalkraft  
RefG: referansegen  
RNA: ribonukleinsyre  
RT: revers transkripsjon  
RTK: tyrosinkinasereseptor

*RUNX1*: runt-related transcription factor 1  
*RUNX1T1*: runt-related transcription factor 1, translocated to, 1 (cyclin D-related)  
sd: standardavvik  
SH2: Src homologidomene 2  
SM: systemisk mastocytose  
SOCS: cytokinsignaleringsuppressor  
ST-HSC: short term HSC  
T: threonin  
TBE: tris/borat/EDTA  
*TCR $\gamma$* : t-celle reseptor, gamma  
*TCR $\beta$* : t-celle reseptor, beta  
TE: tris EDTA  
Thr: threonin  
TK: tyrosinkinase  
TK1: tyrosinkinasedomene 1  
TK2: tyrosinkinasedomene 2  
Trp: Tryptofan  
Tyr: tyrosin  
U: enheter/ Units  
 $\mu$ M: mikromolar = picomol/ $\mu$ l=pmol/ $\mu$ l  
VK: variasjonskoeffisient  
W: tryptofan  
WHO: Verdens helseorganisasjon  
*WT1*: Wilms tumor 1  
Y: tyrosin

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	3
Sammendrag .....	4
Abstract.....	5
Forkortelser .....	6
1 Innledning.....	10
1.1 Normal og leukemisk hematopoese.....	10
1.2 Tyrosinkinaser og deres betydning ved kreftutvikling .....	15
1.2.1 PDGFR $\alpha$ og PDGFR $\beta$ .....	16
1.3 Myeloid og lymfoid neoplasi med eosinofili .....	18
1.3.1 Myeloid og lymfoid neoplasi med <i>PDGFRA</i> -genrearrangering.....	19
1.3.2 Myeloid neoplasi med <i>PDGFRB</i> -genrearrangering.....	22
1.4 Minimal restsykdom (MRD).....	23
2 Formål med oppgaven.....	25
3 Material og metode.....	27
3.1 Negative kontroller.....	27
3.2 Positive kontroller .....	27
3.3 Pasientprøver .....	27
3.4 DNA-ekstrahering.....	27
3.5 Preparering av materiale til RNA.....	28
3.6 RNA-ekstrahering .....	28
3.7 Konsentrasjonsmåling .....	28
3.8 cDNA-syntese .....	28
3.9 Påvisning av <i>FIP1L1-PDGFR</i> A i DNA.....	29
3.10 Sekvensering.....	30
3.11 Primer og probedesign.....	31
3.12 Påvisning av <i>FIP1L1-PDGFR</i> A i RNA .....	31
3.13 Kvantitativ ASO-qPCR <i>FIP1L1-PDGFR</i> A .....	32
3.14 Kvantitering av <i>PDGFRA</i> og <i>PDGFRB</i> -genuttrykk ved RT-qPCR .....	33
3.15 Tillaging av standard ved kloning .....	33
3.15.1 Tillaging av PCR-produkt.....	34



3.15.2	Kutting og ligering av PCR-produkt .....	36
3.15.3	Ligering og kloning.....	36
3.15.4	Rensing av plasmid .....	37
3.15.5	Linearisering av plasmid og standardkurvefortynning.....	37
3.16	Kvantitativ RT-qPCR for <i>GUSB</i> og <i>ABL1</i> .....	38
3.17	Kvantitering av <i>PDGFRA</i> og <i>PDGFRB</i> -genuttrykk ved RT-qPCR .....	39
3.18	Statistisk analyse .....	40
4	Resultater .....	41
4.1	Påvisning av <i>FIP1L1-PDGFRB</i> -fusjonsgen ved hjelp av L-gPCR.....	41
4.2	Påvisning av <i>FIP1L1-PDGFRB</i> -fusjonsgentranskript ved hjelp av multipleks RT-qPCR.....	42
4.3	Kvantitering av <i>FIP1L1-PDGFRB</i> ved ASO-qPCR .....	44
4.4	Kvantitering av <i>PDGFRA</i> -transkript ved RT-qPCR.....	45
4.5	Kvantitering av <i>PDGFRB</i> -transkript .....	48
5	Diskusjon .....	54
5.1	<i>FIP1L1-PDGFRB</i> .....	54
5.2	MRD med ASO-qPCR .....	56
5.3	<i>PDGFRA</i> og <i>PDGFRB</i> -genuttrykk.....	58
5.4	Utredning ved eosinofili .....	61
6	Videre arbeid.....	63
7	Oppsummering.....	63
8	Litteraturliste.....	64
9	Vedlegg 1.....	68
9.1	kontroller:.....	68
9.2	Utstyr:.....	69
9.3	Kjemikalier og analysekitt: .....	69
10	Vedlegg 2.....	72
10.1	Polymerase kjedereaksjon (PCR).....	72
10.2	Kvantitativ real-time PCR.....	72
10.3	Sekvensering.....	74
10.4	Kloning.....	74
10.5	Rensing av plasmid .....	75
11	Vedlegg 3.....	76

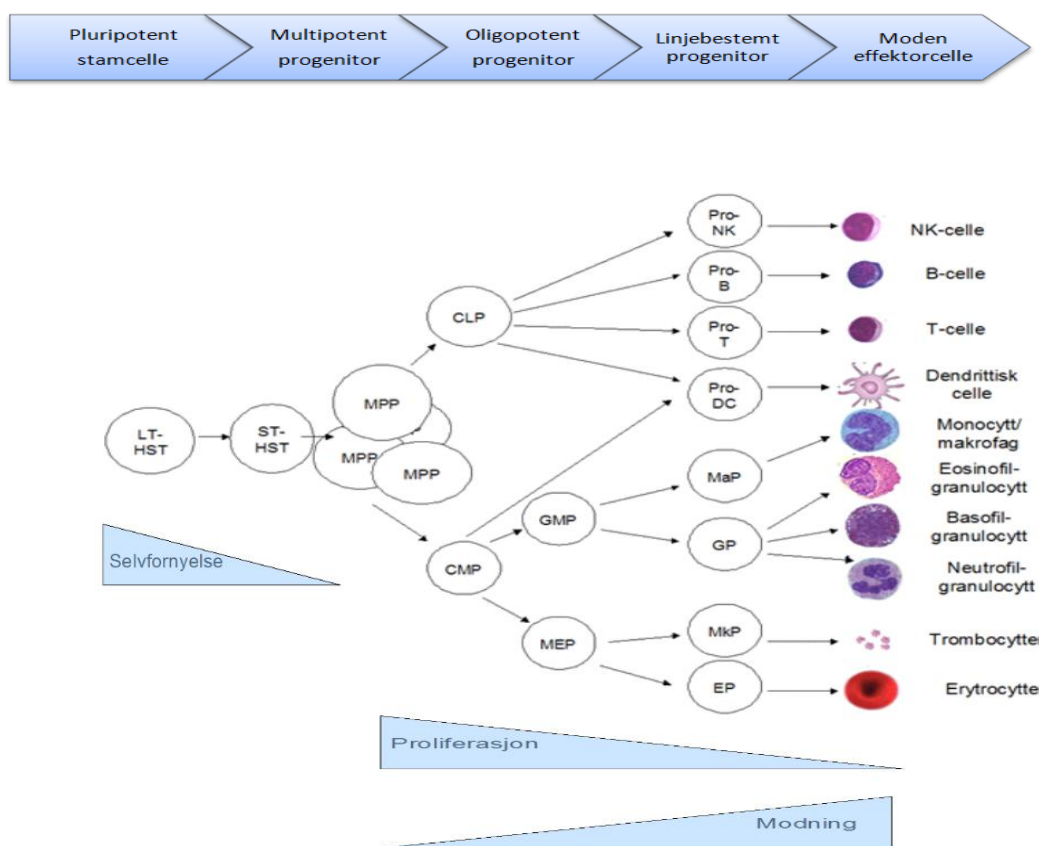
## 1 Innledning

Hvert år får rundt 26 000 personer i Norge en kreftdiagnose [1]. Risikoen for å utvikle kreft øker med alderen og er noe høyere for menn enn for kvinner [1]. Omkring 8,2 % av alle nyoppdagede krefttilfeller oppstår i det bloddannende eller lymfatiske system, og mangfoldet er stort [1]. Det er tre hovedgrupper av hematologiske krefttyper: leukemier, lymfomer og myeloproliferative neoplasier. Nærmere 150 undergrupper er definert av Verdens Helseorganisasjons "WHO's klassifisering av tumor i hematopoetisk og lymfoid vev" og tallet har økt i takt med en stadig bedre forståelse av sykdommenes utvikling, genetikk og biologi [2]. Korrekt klassifisering er ikke bare viktig for at den enkelte pasient skal få den beste tilpassede behandlingen som er tilgjengelig, men også for at det skal kunne utvikles bedre behandlingsstrategier og nye medisiner.

Morfologi, cytokjemi, immunhistokjemi, cytogenetikk og kliniske opplysninger har lenge vært viktige verktøy ved diagnostisering av disse sykdommene. I løpet av det siste tiåret har sykdommenes genetiske profil og fenotype blitt bedre kartlagt. Hematopoetiske neoplasier deles først og fremst inn etter linjetilhørighet, modning og differensiering. For å stille enkelte diagnoser kan det være nødvendig å påvise spesifikke genetiske avvik. Visse genetiske funn kan også ha betydning for prognose og behandling [2].

### 1.1 Normal og leukemisk hematopoese

Dannelse av blodceller, hematopoesen, foregår i benmargen og for T-cellene også i brisselen [3]. Hvert døgn skiftes det ut nesten  $10^{11}$  blodceller [4]. Alle blodets celler stammer fra en felles multipotent hematopoetisk stamcelle (HSC). Fra HSC vil en gradvis og irreversibel differensiering av cellene skje (se figur 1). Hos voksne er det et svært lite antall HSC i benmargen og disse befinner seg stort sett utenfor cellesyklus [4-5]. Systemet er både effektivt og fleksibelt nok til å opprettholde homeostase ved den kontinuerlige utskiftingen av modne effektorceller, samt øke produksjonen ved en blødning eller infeksjon.



**Figur 1:** Hematopoesen. HSC er opphavet til alle blodets celler. Den kan deles inn i to grupper, hvor den ene kan kopiere seg selv ubegrenset (LT-HSC) og den andre har en tidsbegrenset evne til selvfornyelse (ST-HST). Gjennom differensiering taper stamcellen denne evnen. Fra ST-HSC dannes multipotente progenitorceller (MPP). MPP har stor proliferasjonskapasitet og kan differensiere til celler både i den myeloide og lymfoide rekken. MPP danner enten oligopotente lymfoide progenitorceller som er forløperen til B-lymfocytter, T-lymfocytter og NK-celler eller oligopotente myeloide progenitorceller (CMP). CMP er forløper både til granulocyt, monocyt, megakaryocyt, erytroid progenitorer (MEP). MEP kan trolig også utvikles direkte fra MPP. GMP differensierer videre til linjebestemte progenitorceller som terminerer i modne monocytter, mastceller (ikke vist i figuren), nøytrofile-, basofile- eller eosinofile granulocytter, mens det fra MEP tilslutt dannes erytrocytter og trombocytter. Dendrittiske celler kan stamme fra både CMP og oligopotente lymfoide progenitorceller (CLP). Etter hvert som cellene differensierer vil evnen til proliferasjon tapes og de blir gradvis forpliktet til å følge en bestemt retning. Med unntak av hukommelses B- og T-cellene (ikke vist i figuren) vil en moden hematopoetisk celle fullstendig ha mistet evnen til proliferasjon og selvfornyelse [4, 6].

CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; EP, erythrocyte progenitor; GMP, granulocyte-macrophage progenitor; GP, granulocyte progenitor; LT-HSC ,long-term hematopoietic stem cell; MEP, megakaryocyte/erythrocyte progenitor; MkP, megakaryocyte progenitor; MaP,monocyte/macrophage progenitor; MPP,multipotent progenitor; Pro-B, pro B-lymphocyte; Pro-DC, pro dendritic cell; Pro-NK, pro natural killer; Pro-T, pro T-lymphocyte; ST-HSC ,short-term hematopoietic stem cell.

For å overleve er HSC helt avhengig av benmargens mikromiljø, det spesifikke området kalles stamcellenisje [4]. Mikromiljøet er også viktig for regulering av migrasjon, selvfornyelse og differensiering [5]. Differensiering av de ulike progenitorcellene er nøye regulert av linje- og cellespesifikke transkripsjonsfaktorer, og det kan være små variasjoner i genuttrykk som er avgjørende for cellenes endelig differensiering. I tillegg reguleres hematopoesen ekstracellulært av en rekke vekstfaktorer og cytokiner via autokrin, parakrin og endokrin signalering. Dersom det oppstår ubalanse i en eller flere av reguleringsmekanismene kan en rekke ulike sykdommer oppstå. For at det skal utvikle seg til neoplasi, må det skje en eller flere genetiske og/eller epigenetiske hendelser som påvirker cellenes evne til selvfornyelse, proliferasjon, differensiering og apoptose [4-5, 7-8].

Felles for de hematopoetiske neoplasier er at dette er klonale sykdommer hvor alle de berørte cellene er etterkommer etter en felles mutert celle. Dermed vil alle cellene i en neoplasi ha samme mutasjon som en gang ga cellen et vekstfortrinn. Men selv om kreft er en klonal sykdom betyr det ikke at den består av en homogen masse identiske celler. Kreftceller er derimot svært heterogene [9]. En hematologisk neoplasi kan bestå av forskjellige effektorceller og ulike forstadier til disse. Cellene er både fenotypiske og genotypisk distinkte. De er forskjellige biologisk og funksjonelt, men også deres ekspanderende evne er svært forskjellig. To modeller for å forklare heterogeniteten til en tumor eksisterer. Den ene er stokastisk hvor en mener at det kun er en tilfeldig indre og ytre påvirkning av biologisk homogene celler som bidrar til kreftcellenes heterogenitet, og det er tilfeldig hvilken celle som får selvfornyessevne [9]. I den andre modellen vil kreftcellene og utviklingen av sykdommen ligne mer på en normal vevs- eller celleutvikling der det er en kreftstamcelle som troner øverst i hierarkiet [9]. Noen sykdommer følger den siste modellen, f.eks. er det vist at leukemiske stamceller (LSC) eksisterer ved akutt leukemi [4, 9]. LSC har både evne til selvfornyelse og multipotent kapasitet, som er egenskaper den deler med HSC [9]. Videre vil LSC forsyne tumoren med celler som kan differensiere en eller flere veier. Disse cellene vil ha begrenset evne til proliferasjon og selvfornyelse akkurat som progenitorceller i hematopoesen [9].

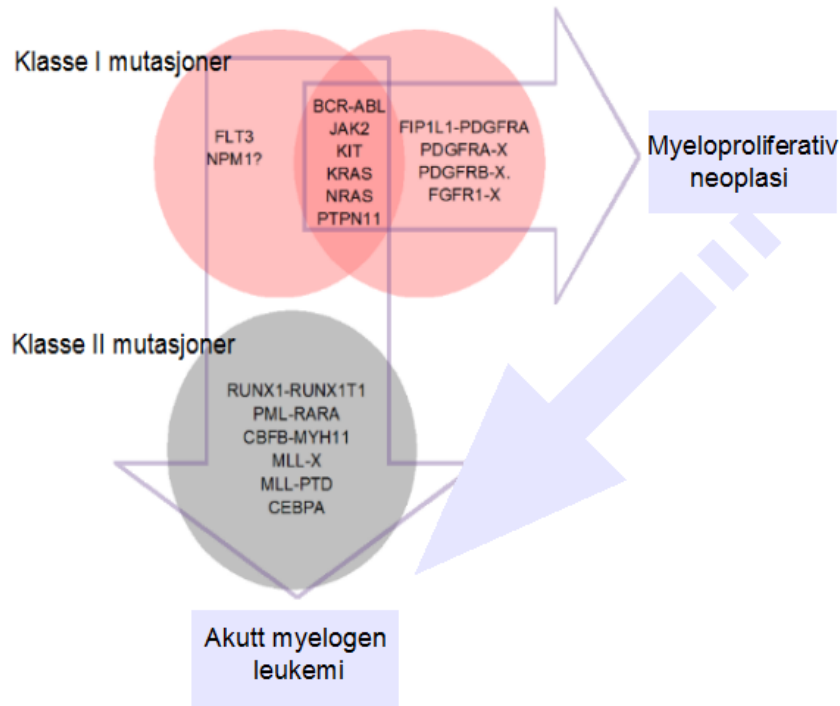
Fra hvilken celle stammer LSC og hvordan kan leukemi oppstå? Man mener at LSC kan oppstå både i HSC, men også i mer modne progenitorceller som gjenvinner evnen til selvfornyelse [9].

De myeloide neoplasier kan deles inn i 5 hovedgrupper, som det igjen er flere undergrupper av. Myeloproliferativ neoplasie (MPN) utgår fra hematopoetiske stamceller. MPN har < 20 % blaster i blod eller benmarg, men ofte er antall blaster normalt. Tilstanden kjennetegnes ved økt proliferasjon av myeloide celler, som i hovedsak modner normalt. Resultatet er en massiv opphopning i blodbanen av en eller flere celler i den myeloide rekken [2, 10]. Myelodysplastisk syndrom (MDS) er kjennetegnet av både proliferasjon og apoptose av de myeloide forstadiene. Dette resulterer i en cellerik benmarg, men hvor det samtidig er perifer cytopeni.

Myeloproliferativ / myelodysplastisk neoplasie (MPN/MDS) har derimot egenskaper både av myelodysplasi og myeloproliferativ neoplasie [2]. Akutt myelogen leukemi (AML) diagnostiseres når det finnes > 20% blaster i benmarg eller blod, eller dersom det påvises spesifikke cytogenetiske avvik [2]. Den siste gruppen er de myeloid og lymfoide neoplasier med eosinofili og genetiske avvik i platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (*PDGFRA*), platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (*PDGFRB*) eller fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) [2].

Flere genetiske hendelser må skje for at det skal kunne utvikles en leukemi/neoplasie og disse deles inn i to klasser. Type I mutasjoner gir cellene et overlevelses- eller proliferasjonsfortrinn. Type II mutasjoner påvirker differensiering og indirekte også apoptose, siden modne effektorceller går i apoptose [11]. Ved AML er startskuddet gjerne en forstyrrelse i en signalvei nødvendig for differensiering. Cellene forblir da umodne forstadier hvor evnen til proliferasjon (og selvfornyelse) opprettholdes, samtidig som de unnslipper apoptose [8]. Men en type II mutasjon er ikke alene tilstrekkelig for å utvikle en akutt leukemi, en type I mutasjon må skje i tillegg [11]. Type I mutasjoner er ofte mutasjoner i tyrosinkinasegener som fremmer overlevelse og proliferasjon [11], se figur 2. Et eksempel er translokasjonen mellom *BCR*-genet (breakpoint cluster region) på kromosom 22 og *ABL1*-genet (c-ABL1 oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) på kromosom 9 ved kronisk myelogen leukemi (KML). Hybridproteinet som dannes er en konstant aktiv tyrosinkinase og er essensiell for sykdomsutvikling. Ved KML vil det være en massiv opphopning av differensierte,

men funksjonelt umodne granulocytter [2]. Ved progresjon av sykdommen akkumuleres mutasjoner, modningen stopper opp og sykdommen går over i en blastkrise som har likhetstrekk med akutt leukemi [12]. Det er først når dette skjer at det i KML dannes en leukemisk stamcelle [9].



**FIGUR 2:** Forenklet fremstilling av mutasjoner ved utvikling av myeloid neoplasi. Klasse I mutasjoner fremmer proliferasjon og overlevelse. Dette er ofte mutasjoner som bidrar til konstant tyrosinkinasesignalerings som *FLT3*, *BCR-ABL1*, *KIT*, *JAK2*, *PDGFRA*, *PDGFRB* og *FGFR1* eller gener som ligger nedstrøms i signaleringskaskaden som *NRAS* og *KRAS* [3, 13, 14]. Klasse I mutasjoner kan også være gen som regulerer tyrosinkinasesignalerings, som tyrosinofosfatase *PTPN11* og gen involvert i proteinsyntesen som *NPM1*. Klasse I mutasjoner er pådrivere for utvikling av både for MPN og AML. Men for utvikling av AML må det i tillegg skje en klasse II mutasjon som hindrer differensiering og dermed indirekte apoptose. *CEBPA* er en transkripsjonsfaktor nødvendig for dannelse av GMP og granulocytter. Den er uttrykt i HSC hvor den kontrollerer selvfornyelse, den er også involvert i differensiering fra CMP til GMP (se også figur 1) [13]. *CEBPA* kan være mutert ved ulike subtyper AML, i 7-8 % totalt [13]. *RUNX1-RUNX1T1* nedregulerer andre transkripsjonsfaktorer, blant annet *CEBPA* og *RUNX1*, og genfusjonen er påvist i 12-15 % av AML [13]. *RARA* er nødvendig for differensiering av promyelocytter, og den er translokert ved en distinkt undergruppe AML som heter akutt promyelocytær leukemi [8]. Andre mutasjoner som påvirker differensiering av myeloide celler er *CBFB-MYH11*, *MLL-PTD* og *MLL*-translokasjoner. Genetiske ustabilitet og sekundære mutasjoner skjer ved progresjon av en myeloproliferativ neoplasi.

*ABL1*, c-ABL1 oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase; *BCR*, breakpoint cluster region; *CEBPA*, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha; *FGFR1*, fibroblast growth factor receptor 1; *FIP1L1*, FIP1 like 1 (*S. cerevisiae*); *FLT3*, fms-related tyrosine kinase 3; *JAK2*, Janus kinase 2; *KIT*, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *MLL*, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog),

Drosophila); *MYH11*, myosin, heavy chain 11, smooth muscle; *NPM1*, nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin); *NRAS*, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; *PDGFRA*, platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide; *PDGFRB*, platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide; *PML*, promyelocytic leukemia; *PTD*, delevit tandem duplikasjon; *PTPN11*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; *RARA*, retinoic acid receptor, alpha; *RUNX1*, runt-related transcription factor 1; *RUNX1T1*, runt-related transcription factor 1, translocated to, 1 (cyclin D-related).

## 1.2 Tyrosinkinaser og deres betydning ved kreftutvikling

Historien bak de fleste myeloide neoplasier er ofte genmutasjoner som rammer tyrosinkinaser (TK) [14]. TK er viktige signaloverførere i alle celler. De er involvert i en rekke funksjoner nødvendig for utvikling, vekst, differensiering og overlevelse men også bevegelse og andre mer celledoespesifikke funksjoner [15]. TK katalyserer overføring av en fosfatgruppe fra adenosintrifosfat (ATP) til aminosyren tyrosin (Tyr, Y) i spesifikke regioner av substratproteinet [15]. TK kan deles inn i to hovedgrupper enten tyrosinkinase reseptorer (RTK) eller cytoplasmatiske tyrosinkinaser (cTK) [16]. cTK befinner seg fritt i cytoplasma, i kjernen eller indirekte koblet til cellemembranen [16]. cTK holdes inaktive i cellen enten ved binding til inhibitoriske proteiner og lipider eller gjennom inhibitoriske intramolekylære områder på proteinet. For å aktivere tyrosinkinase må de inhibitoriske proteiner dissosiere eller proteinet fosforyleres med etterfølgende strukturell endring og inaktivering av det autoinhibitoriske domenet.

RTK er transmembrane proteiner. De består av et ligandbindende domene ekstracellulært og et intracellulært katalytisk domene i form av en tyrosinkinase [15]. I fravær av bundet ligand er RTK inaktive ufosforylerte monomere eller tetramere polypeptidkjeder [15]. Aktivering skjer ved ligandbinding ekstracellulært som sørger for konformasjonsendring eller dimerisering av monomere reseptorer, slik at svakt aktive reseptorkinaser kan transautofosforylere hverandre [15]. Kinasedomenet består av en 20-25 lang aminosyrekjede (aktiverende segment/loop) som regulerer kinaseaktiviteten gjennom fosforylering [15]. Transautofosforylering kan også skje utenfor kinasedomenet, blant annet i juxtamembrandomenet og den c-terminale halen, og for noen RTK vil dette sørge for en konformasjonsendring som er nødvendig for at det regulatoriske området kan fosforyleres og kinasen aktiviseres [15]. pTyr vil fungere som bindingssteder for signalproteiner eller adaptorproteiner med SH2 (Src homologidomene 2) eller PTB (fosfotyrosinbindende) domene, dermed vil signalet videreformidles i cellen [15-17].

Like viktig som aktivering er hurtig deaktivering av TK-signalering. Dette kan skje ved endosomal reseptorinternalisering og lysosomal degradering eller ved

reseptorubiquitylering og degradering i proteosomer. Også binding til et inhibitorisk protein som SOCS (cytokin signaleringssuppressor) eller defosforylering av reseptoren ved hjelp at tyrosinfosfataser sørger for å avslutte et signal [18].

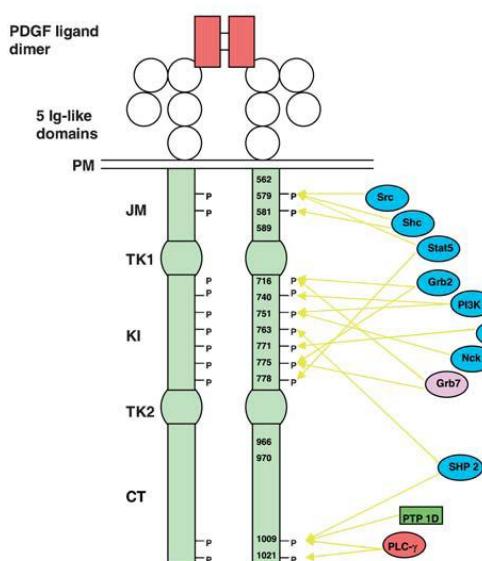
Unormal og konstant aktiv tyrosinkinase er påvist ved en rekke myeloproliferative neoplasier [14]. Både RTK og cTK kan utsettes for mutasjoner som endrer deres aktivitet eller funksjon slik at resultatet er økt proliferasjon og overlevelse av myeloide celler. Aktiverende mutasjoner kan være:

1. Kromosomale translokasjoner som bringer tyrosinkinasens katalytiske del sammen med et annet gen slik at et hybridprotein med endret funksjon eller aktivitet dannes.
2. Enkeltbasemutasjoner, små innskutte segmenter, delesjoner og genduplikasjoner som kan gi konstant aktiv og/eller forhøyet tyrosinkinaseaktivitet.

### 1.2.1 PDGFR $\alpha$ og PDGFR $\beta$

Platederivert vekstfaktor reseptor alfa (PDGFR $\alpha$ ) og beta (PDGFR $\beta$ ) er begge tyrosinkinasereseptorer, og sammen med KIT (stamcelle faktor reseptor), FLT3 (FLT3-ligand reseptor) og CSF1R (kolonistimulerende faktor 1-reseptor) tilhører de PDGF-reseptorfamilien [15]. Med unntak av PDGFR $\alpha$  er alle viktige signaloverførere i hematopoesen [19].

PDGFR $\alpha$  og PDGFR $\beta$  er begge transmembrane reseptorer som dimeriseres og aktiveres ved binding av ligand ekstracellulært. Strukturelt er de likt bygd, se figur 3.



**Figur 3.** Fremstilling av PDGFR $\beta$ -reseptoren og signaloverførere involvert ved aktivering. Ligand bindes ekstracellulært, dette området består av fem immunoglobulinliknende strukturer. Reseptoren krysser plasmamembranen som en  $\alpha$ -heliks. Intracellulært er det katalytiske tyrosinkinasedomene (TK1 og TK2) delt i to av et innskutt kinaseregiondomene (KI). Både en C-terminal hale (CT) og det autoinhibitoriske juxtamembrandomenet (JM) er viktige regulatoriske områder. Når reseptoren aktiveres autofosforyleres intracellulære tyrosin (avmerket med aminosyrenummer), disse binder så spesifikke signalproteiner slik at signalet videreføres.

Figuren og informasjon er hentet fra [18].



Mellom membranen og tyrosinkinasedomenet befinner juxtamembrandomenet (JM) seg. JM sørger for at reseptorer som tilfeldig kolliderer i plasmamembranen ikke kommer nært nok til å aktivere hverandre [15]. PDGFR-familien har 4 Tyr i JM-domenet, hvorav 2 lar seg fosforylere og 2 er nødvendig for strukturell hemming [15]. Studier tyder på at det i JM dannes en tredimensjonal struktur som stabiliserer både aktiverende segment/loop og C-halen i en inaktiv konformasjon [15].

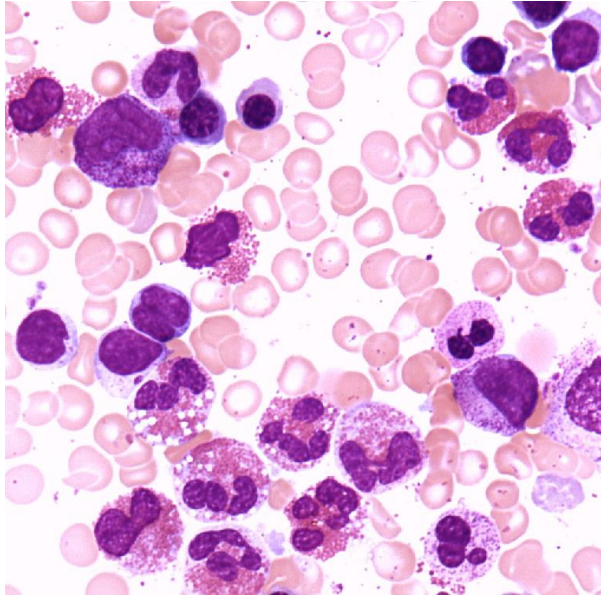
Platederivert vekstfaktor (PDGF) er ligand for PDGFR $\alpha$  og PDGFR $\beta$ . PDGF består av 4 isoformer (A, B, C og D) som transkriberes fra hvert sitt gen. PDGF bindes til reseptorene enten som homodimere eller heterodimere molekyler der de ulike dimerene har forskjellig affinitet til reseptorene, og dette bidrar til en regulert, fleksibel og spesifikk signalering [18]. Ved ligandbinding dimeriserer reseptorene slik at de kan transautofosforylere, aktivere hverandre og danne pTyr som proteiner med SH2- og PTB-domener bindes til for videreføring av signalet [18]. Eksempler på signaloverførere involvert er phosphotidylinositol 3'kinase, fosfolipase C- $\gamma$ , Src tyrosinkinasefamilien, ulike adaptormolekyler som Grb2 og transkripsjonsaktivatorer som STAT [18]. PDGFR $\alpha$  og PDGFR $\beta$  uttrykkes på overflaten til celler av mesenchymal opprinnelse [20]. PDGFR-signalering er viktig under fosterutvikling, men er også nødvendig for en rekke cellulære responser slik som overlevelse, celledeling, intercellulær signalering og metabolisme [18].

I hematopoetiske neoplasier kan genet *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide) eller *PDGFRB* (platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide) være rearrangert til andre gener slik at et kimerisk protein dannes, hittil er det mer enn 20 fusjonspartnere beskrevet [21]. Felles for alle genrearrangeringene er at deler av reseptorens N-terminale del byttes ut med et partnerprotein slik at tyrosinkinasen oppnår konstant katalytisk aktivitet i fravær av ligand. Dette skjer enten ved at reseptorens autoinhibitoriske domene forstyrres, eller ved at partnerproteinet har et eller flere dimeriseringsdomener som fører hybridproteinene sammen. I tillegg er fusjonspartneren ofte et gen som er allment og høyt uttrykt. Hybridproteinet vil så aktivere multiple signalveier involvert i proliferasjon og anti-apoptose slik at resultatet er utvikling av en neoplasi [21].

### 1.3 Myeloid og lymfoid neoplasi med eosinofili

Eosinofile granulocytter er effektorceller i blod og deres hovedfunksjon er bekjempelse av parasitter. Normalt er det omkring  $0,5 \times 10^9/l$  eosinofile granulocytter i blod, og det kan være mange årsaker til et forhøyet antall. Tilstanden kan være vanskelig å utrede og de kan enten være sekundære (reaktive) eller klonale. Dersom årsaken forblir ukjent benyttes betegnelsen ideopatisk eosinofili (IE) eller ideopatisk hypereosinofilt syndrom (HES). HES benyttes dersom det er over  $1,5 \times 10^9/L$  eosinofile granulocytter i blod som har vart over 6 måneder, i tillegg må det være tegn på organskade [22]. Inflammasjon, allergi, parasittinfeksjon, autoimmun sykdom, hudsykdom og medikamentell behandling er de hyppigste årsakene til sekundær eosinofili [23]. I tillegg kan det, ved både lymfom og lymfoblastisk leukemi, utvikles en sekundær eosinofili som følge av kreftcellers produksjon av mitogener [24].

Ved klonal eosinofili vil det derimot være en neoplastisk proliferasjon av eosinofile granulocytter. Dette kan oppstå som følge av mutasjoner i hematologiske stamceller eller i tidlige myeloide progenitorceller, derfor er ofte også andre myeloide og lymfoide celler involvert [2, 22]. Klonal eosinofili kan deles inn i tre sykdomsgrupper. I de fleste tilfellene vil eosinofilien være en del av en annen myeloproliferativ neoplasi. Systemisk mastocytose (SM), kronisk myelomonocytær leukemi (KMML), kronisk myeloid leukemi (KML), atypisk KML (aKML), myelodysplastisk syndrom (MDS), akutt myelogen leukemi (AML) og akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) er alle eksempler på dette [2, 24-25]. Den neste gruppen består av kronisk eosinofil leukemi, ikke nærmere spesifisert (KEL, NOS not otherwise specified). For å stille diagnosen KEL, NOS må det være forhøyet antall eosinofile granulocytter ( $\geq 1,5 \times 10^9/L$ ), økning i myeloblaster eller bevis for klonalitet, men fravær av spesifikke genetiske genrearrangeringer forbundet med andre MPN. Klonalitet kan være vanskelig å bevise og dersom det heller ikke er økt antall blaster benyttes ofte diagnosen HES dersom de andre betingelsene er oppfylt [2].



**Bilde1:** Benmargsutstryk farget med May Grünwald Giemsa. Prøven er fra en 48 år gammel mann (kasus 1). Benmargen er hypercellulær og 60 % av leukocytene er eosinofile granulocytter. Det er en lett venstreforskyvning i den nøytrofile og eosinofile rekken. De modne eosinofile har hypersegmenterte kjerner, mange med betydelig vakuolisering. Av de mer umodne eosinofile ses en blanding av eosinofil og basofil granulering. Bildet kan likne kronisk eosinofil leukemi, men også reaktive tilstander kan ha tilsvarende celleforandringer, diagnosen må bekreftes med molekulære analyser.

En sjelden gang skyldes de eosinofile neoplasier rearrangeringer av *PDGFRA*, *PDGFRB* eller fibroblastvekstfaktor reseptor 1 (*FGFR1*) genene. Avvik i disse genene gir opphav til tre sjeldne og heterogene neoplasier. Celler både i den myeloide eller lymfoide rekken kan være involvert [2, 21]. Alle er aggressive tilstander som ubehandlet kan ha et dramatisk forløp med massiv organskade i blant annet lunge, hjerte og nervesystem [2]. I et fåtall av tilfellene kan neoplasien transformere til AML [21]. For *PDGFRB*-relaterte neoplasier er opphavscellen en multipotent progenitorcelle som gir opphav til myeloide celler, men for *PDGFRA*- og *FGFR1*-relatert neoplasi er opprinnelsescellen derimot en pluripotent stamcelle som kan differensiere både til lymfoide og myeloide celler [2].

Av ukjent årsaker rammes flest menn (> 90 %) og selv om eosinofili er uttalt i de aller fleste tilfellene kan også dette variere [2, 21]. Siden neoplasier er heterogene, men kjennetegnes av konstant aktiv tyrosinkinase, ble de klassifisert under paraplyen "Myeloid og lymfoid neoplasi med eosinofili og avvik i *PDGFRA*, *PDGFRB* eller *FGFR1*" i den fjerde utgaven av WHO tumorklassifisering av hematopoetisk og lymfoid vev [2].

### 1.3.1 Myeloid og lymfoid neoplasi med *PDGFRA*-genrearrangering

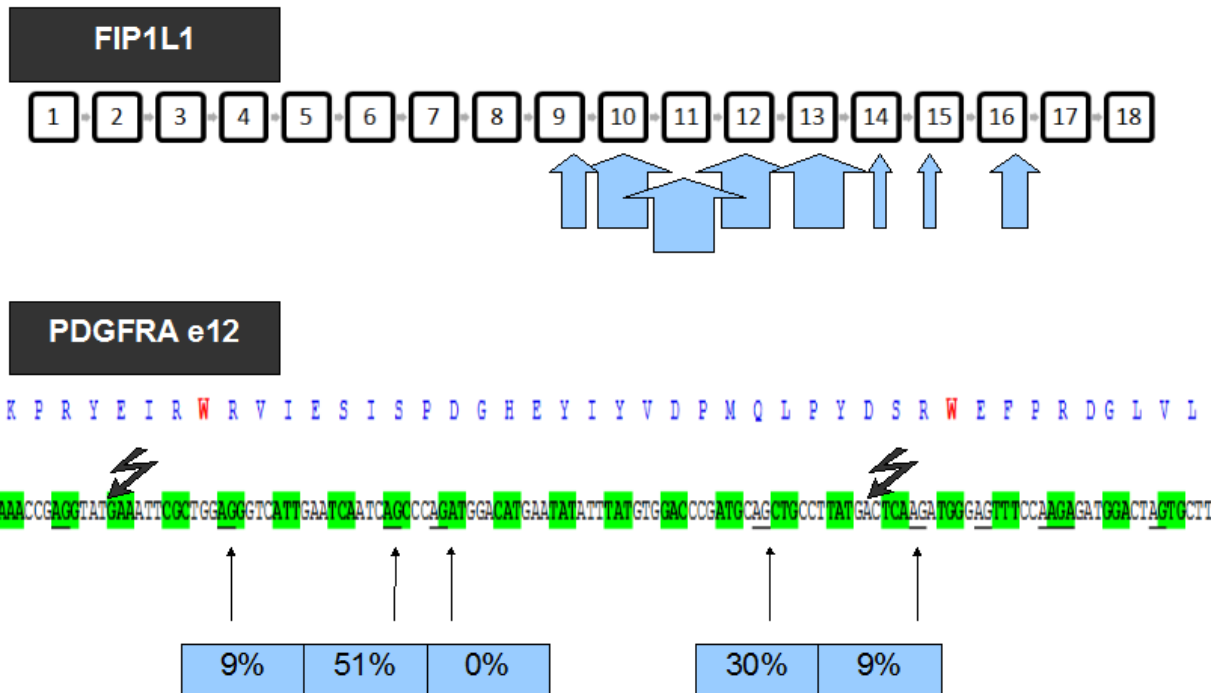
Den hyppigste genrearrangeringen av *PDGFRA* er til *FIP1L1* (FIP1 like 1 (*S.cerevisiae*))-genet, som kommer av en intrakromosomal deleksjon på kromosom 4q12. *FIP1L1-PDGFRA*-genfusjon ble først beskrevet av Cools og medarbeidere [26]. I en gruppe pasienter som hadde effekt av tyrosinkinasebehandling (imatinib),

ble det hos en pasient påvist translokasjonen (1;4)(q44;q12). Dette utpekte *PDGFRA* som et mulig kandidatgen. Men istedenfor å finne en fusjonspartner på kromosom 1, fant de derimot at *PDGFRA* var fusjonert til et gen 800 kb oppstrøms for *PDGFRA* på samme kromosom. Fusjonsproteinet som dannes består av en trunkert 5'-ende av FIP1L1-proteinet N-terminalt og en trunkert 3'-ende av PDGFR $\alpha$ -proteinet C-terminalt.

Delesjonen påvises hyppigst hos pasienter med kronisk eosinofil leukemi (KEL), men den er også beskrevet i pasienter med akutt myelogen leukemi og T-lymfoblastisk leukemi med eosinofili [2]. KEL er en aggressiv sykdom der eosinofile granulocytter og mastceller infiltrerer vev og frigjør cytokiner, enzymer og proteiner som gjør stor skade. Endomyokard fibrose er den alvorligste følgen med dannelse av trombose, men også alvorlige lungesyntomer kan oppstå [2]. Det er viktig å påvise genfusjonen fordi behandling med tyrosinkinasehemmere gir veldig god og langvarig respons hos disse pasientene [2]. Morfologisk kan det være vanskelig å skille KEL fra andre årsaker til eosinofili, siden det ofte ikke er økt antall blaster i blod eller benmarg.

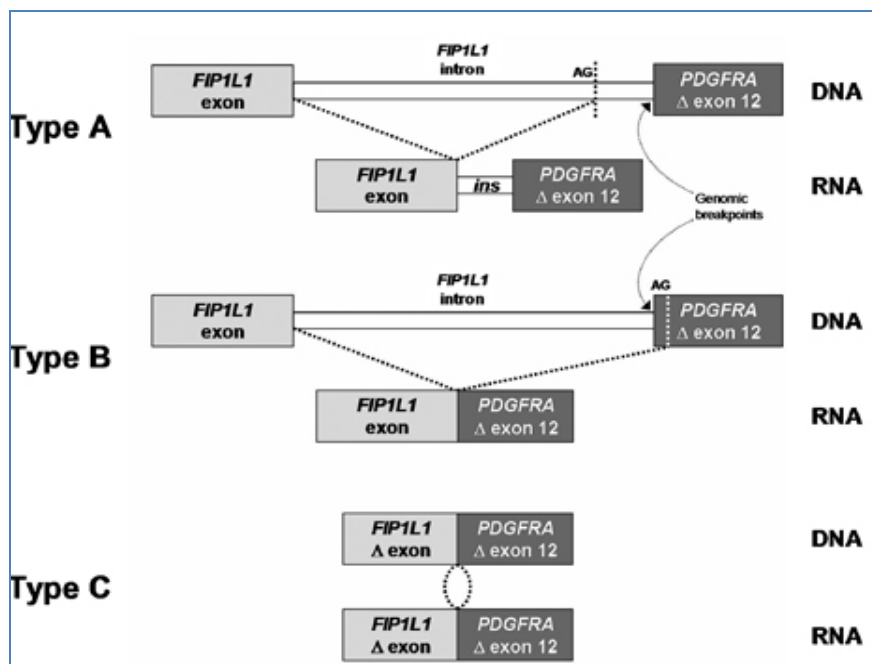
Ved *FIP1L1-PDGFRA*-genrearrangering kan brudd i *FIP1L1* skje i et stort område, til nå har brudd fra intron 9 til og med intron 16 blitt beskrevet (nummerering i følge ENST00000337488, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) [26-28]. Brudd i *PDGFRA* skjer stort sett innen et lite område av ekson 12 som koder for deler av JM-domenet, men også brudd i intron 11 er beskrevet og da vil ekson 12 forkortes pga alternativ spleising (se figur 4) [21, 26].

FIP1L1 har ingen kjente dimeriseringsområder og er ikke direkte involvert i fusjonsproteinet transformerende egenskap av hematopoetiske celler [29]. Derimot vil *FIP1L1-PDGFRA* alltid ende i en forkortelse av det autoinhibitoriske JM-domenet, enten som følge av genomisk brudd eller alternative spleiseseter intern i området, og dette er tilstrekkelig for kinaseaktivering [21, 29].



**Figur 4.** Involverte ekson i ulike *FIP1L1*-*PDGFRA*-transkript hittil beskrevet. Øverst; fordeling av *FIP1L1*-ekson i ulike fusjonsgenstranskript. Størrelsen på pilene indikerer hyppigheten. Brudd skjer oftest innenfor intron 11, etterfulgt av intron 10 og 13. Andre brudd er beskrevet kun en til et fåtall ganger (i9, e13, e14, i14, i15, e16 og i16). Nederst; *PDGFRA* ekson 12, WW-domenet. Alle brudd beskrevet i ekson 12 har skjedd mellom nukleotid 13 til 106 (⚡). Det er 5 mulige akseptorspleiseseter innenfor WW-domenet, og figuren viser hyppighet til de enkelte. I tillegg er det 4 andre mulige spleiseseter i ekson 12, men ingen av disse er blitt påvist til nå. Informasjonen er hentet fra [27]. i, intron; e, ekson.

PDGFR-reseptorenes autoinhibitoriske JM-domenet dannes av et område mellom to tryptofan (Trp, W) aminosyrer som danner tre antiparallelle  $\beta$ -plater, en struktur som likner WW-domenet [30]. Det er nettopp mellom disse to tryptofanene at *FIP1L1* fusjonerer til *PDGFRA* [27]. Tre typer fusjonstranskript er beskrevet, se figur 5 [27, 31]. Alternativt spleiset transkript kan også påvises hos de fleste pasienter [31-32]



**Figur 5.** Oversikt over 3 *FIP1L1-PDGFRB* mRNA-transkript beskrevet. Type A benytter et eller flere kryptisk akseptorspleisesete internt i *FIP1L1*-intron, slik at en eller flere deler av intronsekvensen beholdes, men også innskudd av andre gensegmenter kan skje. Innskutt sekvens kan være inntil 76 nukleotider lang. Type B har et normalt *FIP1L1*-spleiset ekson og benytter et kryptisk akseptorsete i ekson 12 av *PDGFRB*. Ved type C skjer bruddet i begge gener innenfor et ekson og det dannes et hybrid ekson uten bruk av kryptiske akseptorseter. Type A og B er omtrent like hyppig, type C er beskrevet hos 10 %. Figur og informasjon er hentet fra [27].

I sjeldne tilfeller kan *PDGFRB* også rearrangere til gener på andre kromosom. Til nå har det blitt beskrevet 5 varianter, der translokasjonen *BCR-PDGFRB* er den hyppigste [33-34].

### 1.3.2 Myeloid neoplasi med *PDGFRB*-genrearrangering

Myeloide neoplasier med translokasjon i 5q31~33 som involverer *PDGFRB* er sjeldne sykdommer. Diagnosen er ofte KMML med eosinofili, men det kan også være KEL og aKML. Alle aldersgrupper kan rammes og det er en overvekt menn [2].

Til nå er over 20 fusjonspartnere til *PDGFRB* er beskrevet. Translokasjonen fører til dannelse av et hybridprotein som N-terminalt består av fusjonspartneren og C-terminalt består av *PDGFRB*-kinasedomenet. Felles for alle fusjonspartnerne er at de har dimeriseringsdomener som bidrar til konstant kinaseaktivitet i fravær av bundet ligand [21, 35-40]. Den hyppigste translokasjonen er t(5;12)(q31~33;p13) som danner *ETV6-PDGFRB*-fusjongs-gentranskript. Dersom det påvises en translokasjon som involverer den kromosomale regionen 5q31-33, er *PDGFRB* bare en mulig

kandidat, og det bør bekreftes med molekylære tester [2]. Dette skyldes at det er flere gener involvert i proliferasjon og differensiering av eosinofile granulocytter som er lokalisert i umiddelbar nærhet. Interleukin (IL) 3, IL4, IL5, IL13 og granulocytt makrofag koloni-stimulerende faktor er alle lokalisert i samme kromosomale region [40]. Tabell 1 viser noen av translokasjonene som involverer *PDGFRB*.

Alle gener som translokerer til *PDGFRB* inneholder ett eller flere dimeriseringsdomener som fører tyrosinkinase sammen slik at de transfosforilerer og aktiverer hverandre [21]. De fleste brudd i *PDGFRB* skjer oppstrøms for JM-domenet, slik at dette forblir intakt. Men også brudd i ekson 12 er beskrevet hvor WW-domenet forkortes [21]. Om WW-domenet er inntakt eller ei, har ikke den samme betydning for *PDGFRB*-genrearrangeringer som tilfellet er ved *PDGFRA*-genrearrangering [21].

Cyto-genetik	Partnergen	Resiprøkt transkript	PDGFRB	Beskrivelse	Ref.
t(1;3;5)(p36;p21;q33)	<i>WDR48</i>	Ikke påvist	Intron11	Eosinofili	[36]
t(1;5;11) kompleks	<i>GPIAP1</i>	Ikke påvist	Ekson 11	Eosinofili	[41]
t(2;5)(p21;q33)	<i>SPTBN1</i>	Ikke utført		Leukocytose og eosinofili	[42]
t(3;5)(p21;q31)	<i>GOLGA4</i>	Ikke påvist	Intron 10	Eosinofili	[36]
t(4;5)(q21;q33)	<i>PRKG2</i>	Ikke utført		Eosinofili og mastocytose	[42]
t(4;5;5)(q23;q31;q33)	<i>PRKG2</i>	Ikke påvist	Forkortet ekson 12	Leukocytose og basofili	[41]
t(5;9) (q31-32;p22-?24.3)	<i>KANK1</i>	Ikke utført	Ekson 9	Trombocyttemi	[39]
t(5;10)(q33;21)	<i>H4/D10S170</i>	Ikke påvist	Ekson 11	Eosinofili	[43]
t(5;12)(q31-33;q24)	<i>GIT2</i>	Påvist	Ekson 11	Leukocytose og eosinofili	[41]
t(5;12)(q33;p13)	<i>ETV6</i>	Ikke påvist	Ekson 9, 10 og 11	Leukocytose og eosinofili	[40, 44-47]
t(5;12)(q33;p13.3)	<i>ERC1</i>	Påvist	Ekson10+11	AML	[37]
t(5;14)(q33;q32)	<i>KIAA1509</i>	Ikke påvist	Intron10	Eosinofili	[38]
t(5;15)(q33;q13)	<i>BIN2</i>	Ikke påvist	Forkortet ekson 12	Eosinofili	[36, 40]
t(5;16)(q33;p13)	<i>NDE1</i>	Ikke utført	Intron 10	Eosinofili	[48]
t(5;17)(q33-34;q11.2)	<i>MYO18A</i>	Påvist	Intron 9	Eosinofili	[35]

**Tabell 1:** oversikt over noen fusjonspartnere til *PDGFRB* hos pasienter som har respondert på imatinib behandling. Selv om de fleste har eosinofili gjelder ikke dette alle, det er også beskrevet tilfeller med basofili og trombocyttemi. Alle brudd har skjedd i et lite område av *PDGFRB*-genet fra intron 9 til ekson 12.

#### 1.4 Minimal restsykdom (MRD)

Måling av minimal restsykdom er et viktig verktøy for å bestemme behandling, se på respons og for tidlig å kunne detektere et residiv. Flere metoder benyttes rutinemessig til dette formålet. Ved å påvise genforandringer vil dette være et mål på resttumor, uten at en direkte påviser tumorceller. Real-time PCR benyttes til å kvantitere tumorspesifikke translokasjoner eller genrearrangeringer i DNA og for å kvantifisere tumorspesifikt fusjonsgen (FG) eller et unormalt forhøyet ekspresjonsnivå

i RNA. Flowcytometrisk immunofenotyping derimot benyttes til telling av MRD på cellenivå. Ved PCR metodene kan man påvise ned til 1 tumorcelle blant  $10^4$  til  $10^6$  normale celler, eller en 3-4 logs reduksjon i ekspresjonsnivå. Dette er det analytiske minimumskrav for at pasienter som ikke responderer godt eller får tilbakefall kan identifiseres tidlig [49]. Rutinemessig følges pasienter med KML, akutt lymfoblastisk leukemi (ALL) og akutt promyelocyt leukemi (APL) med en eller flere av disse analysene.



## 2 Formål med oppgaven

### 1. Etablering av diagnostisk test for påvisning av *FIP1L1-PDGFR*-genrearrangering

Siden *FIP1L1-PDGFR*-genrearrangering skyldes en mikrolelesjon i kromosom 4q12, lar den seg ikke detektere ved tradisjonell karyotyping. Interfase fluorescens in situ hybridisering (FISH) og påvisning av fusjonsgentranskript ved hjelp av RT-PCR er metoder som hyppigst benyttes [26]. Ved FISH benyttes ofte en *CHIC2*-probe som bindes til et gen som deleteres ved en *FIP1L1-PDGFR*-fusjon. FISH kan være teknisk vanskelig siden det ofte er få celler med delesjon og høy bakgrunnsfluorescens grunnet eosinofile. RT-PCR er også vanskelig siden transkriptet kan være lavt uttrykt og er heterogent, ofte må nested-PCR benyttes [28]. Noen rapporterer at FISH er robust, men ikke like sensitiv som RT-PCR [28], mens andre mener RT-PCR og FISH er like gode i diagnostisk øyemed [31]. Siden begge fremgangsmåtene har sine svakheter og falske negative resultater forekommer, anbefales det at både RT-PCR og FISH benyttes samtidig for å oppnå en god sensitivitet [33]. Nylig ble det beskrevet en metode der genrearrangeringen kan påvises i DNA ved hjelp av en multipleks PCR for lange amplikon [50]. Analyser for påvisning av genrearrangering i DNA og RNA skal etableres og sammenlignes.

### 2. Etablering av kvantitativ PCR for måling av MRD

De fleste pasienter med *FIP1L1-PDGFR* responderer godt på lave doser imatinib (100 mg/dag) og for noen er 100 mg/uke nok for vedlikeholdsbehandling. Dette er lavt sammenlignet med pasienter med *BCR-ABL1*-fusjons-gen som behandles med 400 mg/dag [51]. Men også ved *FIP1L1-PDGFR* kan sykdommen gå inn i en blastkrise hvor sykdommen transformerer til akutt leukemi [51]. I tillegg er det beskrevet somatiske mutasjoner ved *FIP1L1-PDGFR* som fører til at pasientene ikke lenger responderer på behandlingen [26]. Det er derfor viktig å kunne tilby MRD analyser også for denne pasientgruppen. Måling av MRD vil lettest gjøres i DNA, siden det kan være flere spleisevarianter i en og samme pasient [28].

### 3. Etablering av analyser for kvantitering av *PDGFR* og *PDGFRB*-genuttrykk

Ved karyotyping påvises kromosomavvik som numeriske forandringer og translokasjoner. Metoden baserer seg på kortidsdyrkning av tumorceller for å indusere mitoser. Dersom tumorcellene ikke lar seg dyrke eller det er submikroskopiske forandringer, vil metoden gi et falskt negativt resultat. Derfor gjøres ofte PCR og/eller FISH parallelt. Publiserte arbeider har vist at kvantitering av *PDGFRA/B*-transkriptenes kinasedomene kan være egnet som screeningsmetode for å påvise mulige genetiske translokasjoner [52-53]. Derfor skal det etableres analyser for kvantitering av transkriptenes 3'ende (kinasedomenet). Begge gruppene rapporterte om pasienter med et forhøyet nivå der verken en genrearrangering, translokasjon eller mutasjon kunne påvises [52-53]. Siden det resiproke transkriptet sjeldent påvises ved en *PDGFRA*- eller *PDGFRB*-translokasjon, skal det også etableres analyser for kvantifisering av 5'ende (immunglobulindomenet). Tanken er at dette enkelt kan skille translokasjoner fra andre årsaker til forhøyet genuttrykk, slik at spesifisiteten kan forbedres.

### 3 Material og metode

For fullstendig oversikt over reagens, kontroller, instrumenter og leverandører henvises det til vedlegg 1. For en mer utfyllende metodeteori henvises det til vedlegg 2. Restriksjonsenzymkutting, ligering, cDNA-syntese, sekvensreaksjon og PCR ble utført med 2720 Thermal Cycler og alle real-time analyser med 7900HT Real Time System (begge fra AppliedBiosystems, Foster City, USA)

#### 3.1 Negative kontroller

Perifert blod tilsatt EDTA (NB)(n=20) og benmargsaspirat tilsatt heparin (n-BM)(n=8) fra friske givere ble preparert som beskrevet under. I tillegg ble en blanding av 10 normalblod (NB10) benyttet som negativ templatkontroll og i fortynningsrekker.

Cellelinjene KG-1a, MONO-MAC-6, THP-1, KASUMI-1, TOM-1, REH, K-562, KARPAS-299, 697, ME-1, NB-4 og HSB-2 ble benyttet i forsøkene. Cellelinjene var dyrket som anvist fra leverandør, preparert og fryst ned som beskrevet under. Alle cellelinjene er kommersielt tilgjengelig og stammer fra pasienter med leukemi eller lymfom. For en fullstendig oversikt henvises det til vedlegg 1.

#### 3.2 Positive kontroller

Cellelinjen EOL-1. Den stammer fra blod til en 33 år gammel mann med eosinofil leukemi og er positiv for *FIP1L1-PDGFR* [54]

Cellelinjen KASUMI-3. Den stammer fra benmarg til en 57 år gammel mann med AML-M0, hvor *PDGFR*-genet er duplisert. Cellelinjen responderer på imatinib [54].

#### 3.3 Pasientprøver

Perifert blod tilsatt EDTA (PB) og benmargsaspirat tilsatt heparin (BM) fra totalt 17 pasienter med eosinofili som var tilsendt laboratoriet for utredning ble analysert. Det var 11 menn og 6 kvinner i alderen 26 til 81 år. Eosinofilien varierte fra lett forhøyet til en massiv økning (1-55 %).

#### 3.4 DNA-ekstrahering

DNA-ekstrahering ble utført ved hjelp av Biorobot EZ1. Ekstraheringsprosedyren er halvautomatisert og benytter magnetiske kuler dekket med silikat. Først lyses cellene i en væske som inneholder kaotropisk salt. I dette miljøet bindes nukleinsyrer til silikathinnen. Deretter vaskes kulene for å fjerne alle andre komponenter før DNA-bindingen reverseres ved å tilsette en elueringsbuffer som inneholder lite salt.

PB eller BM tilsatt EDTA ble ekstrahert direkte med EZ1 DNA Blood 350 µl Kit. Heparinisert BM og cellelinjer ble vasket i 3 volum romtemperert PBS, sentrifugert ved 250 g i 5 minutter før supernatanten ble helt av og prosedyren gjentatt. Pelleten ble resuspendert i 1 ml PBS og 10 µl av løsningen ble tilsatt 0,2 % trypanblå overført til et celletellingskammer og telt i Countess Automated Cell Counter. DNA ble videre ekstrahert med EZ1 Tissue Kit i Biorobot EZ1 etter først å ha lysert og fordøyd ca.  $5 \times 10^6$  celler i 190 µl G2-buffer med 10 µl Proteinase K i 1-2 timer ved 56 °C. DNA ble eluert i 100 µl elueringsbuffer.

### 3.5 Preparering av materiale til RNA

Før RNA-ekstrahering av PB og BM ble leukocytter isolert. Det ble tilsatt 2 volum romtemperert erytrocyttlyseringsløsning (RBC lysis solution) til 1 volum prøve, blandet 10 minutter på rotor før sentrifugering ved 250 g i 7 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble kastet. Deretter ble 3 ml kald PBS tilsatt og prosedyren gjentatt. Antall celler ble telt og fordelt som beskrevet over. Cellelinjer ble vasket i PBS før ekstrahering.

### 3.6 RNA-ekstrahering

RNA ble ekstrahert med RNeasy Mini Kit i QIAcube etter først å ha lysert ca.  $1 \times 10^7$  celler i 650 µl RLT-buffer. I RLT lyseres cellemembraner og RNAsen inaktiveres. Under ekstraheringsprosedyren homogeniseres materialet med QIAshredder, lysatet tilsettes etanol og buffere med høyt saltinnhold noe som bidrar til at RNA > 200 nt bindes til spinnkolonnens silikatmembran. Etter flere vasketrinn reverseres bindingen til membranen ved å tilsette 30 µl nukleasefritt vann. Metoden anriker mRNA siden annet RNA i cellene er < 200 nt.

### 3.7 Konsentrasjonsmåling

Renhet, DNA- og RNA-konsentrasjon ble målt ved hjelp av NanoDrop-spektrofotometer, se vedlegg 2. Et rent DNA-ekstrakt har  $A_{260}/A_{280}=1,8$  og et rent RNA-ekstrakt har  $A_{260}/A_{280}=2,0$  [55].

### 3.8 cDNA-syntese

RNA ble revers transkribert (RT) til cDNA ved hjelp av SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit. Dette kittet inneholder modifisert termostabil M-MLV revers transkriptase med redusert RNase H-aktivitet, randomprimere, buffere med  $MgCl_2$  og nukleotider (dNTP) i tillegg til RNase-inhibitorer. I et totalvolum på 20 µl ble 1000 ng

RNA tilsatt 1x VILO Reaction Mix, 1x SuperScript Enzym Mix og nukleasefritt vann. Primerne ble hybridisert ved 20 °C i 10 minutter, etterfulgt av revers transkripsjon ved 42 °C i 1 time og avsluttet ved 85 °C i 5 minutter for å inaktivere enzym.

### 3.9 Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A i DNA

For metodeteori henvises det til vedlegg 2. Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A ved hjelp av genomisk PCR for amplifisering av lange produkt (L-gPCR) ble utført som tidligere beskrevet [50]. Kort oppsummert består testen av 15 forover *FIP1L1*-primere designet for hver 5 kb med unntak av et område i intron 10 der det er et spenn på 12 kb. Disse benyttes i tre multipleks reaksjoner med en felles revers primer homolog til *PDGFR*A intron 12. I tillegg testes DNA-kvalitet med L-gPCR for *ABL1*-genet. For primersekvenser, posisjon og størrelser, se tabell 2.

Expand Longe Template PCR System og buffersystem 2 for 9-12 kb segmenter ble benyttet. En reaksjonsløsning på 25 µl bestående av 1 x Buffer 2 (med 2,75 mM  $MgCl_2$ ), 500 µM dNTP, 3,75 U Expand Long Template enzyme mix, nukleasefritt vann, 300 nM av hver primer og inntil 250 ng DNA. Reaksjonen foregikk i 2 minutter ved 94 °C, etterfulgt av 10 sykluser ved 94 °C i 10 sekunder, 64 °C i 30 sekunder og 68 °C i 10 minutter. Deretter ytterligere 25 sykluser der 68 °C trinnet ble økt med 20 sekunder hver syklus. Hvert oppsett inkluderte en positiv kontroll (EOL-1), negativ DNA-kontroll og negativ templatkontroll.

PCR-produktene ble sjekket med Agilent DNA 12000 Kit med Agilent 2100 bioanalyser som separerer og semikvantifiserer dobbeltrådig DNA i størrelsesområdet fra 100 til 12000 bp. Metoden er en form for kapillærelektroforese hvor små mikrokanaler på en liten chip fylles med gelmatriks. Hvert PCR-produkt appliseres til små brønner tilsatt DNA-interkalerende farge og størrelsesmarkører. Produktene separeres så etter størrelse i et elektrisk felt, registreres av en detektor og resultatet visualiseres i form av et elektroferogram. Hvert produkt dannet i en PCR vil generere en topp i elektroferogrammet, oppløseligheten er rundt 10 basepar (bp). Høyden til en topp er proporsjonal med mengden produkt dannet. Både lav og høy størrelsesmarkør er tilsatt alle brønnene i chipen, de danner en topp på 50 og 17000 bp. Størrelses og kvantifiseringsnøyaktighet er henholdsvis på ±15 og ±25 %.

Multipleksmiks	Posisjon i <i>FIP1L1</i>	Primersekvens 5'-3'
<b>1</b>	F-Intron 5 (16446)	TCTTGGTCATTAACCACCCACCA
	F-Intron 10 (27893)	CTCGGCCAGATCACTTACCTTTTG
	F-Intron 11(45268)	AAATGTGGAGTTTGAGGCATTGCT
	F-Intron 13 (61316)	GTGGCGAGTTGCTCATATCTAGGG
	F-Intron15 (75413)	TTGGAACATGCCTTTCTCCACCT
<b>2</b>	F-Intron 9 (20394)	AAATAGGGCCATGATGAGCAGGA
	F-Intron10 (39103)	ATGCTGGGTTTCCAACGTTCTGT
	F-Intron11 (49512)	GGGTTGTGAAACAATTTGGTGGTC
	F-Intron13 (65623)	AGGGGAAAGAAGAGGGACGTTTG
	F-Ekson 16 (80318)	GACACCAGCAAGCAGTGGGACTA
<b>3</b>	F-Intron9 (25891)	CTTTGCCTCATGGGAAAGGAGAG
	F-Intron11 (43597)	TGAACCTAAAAGGGCCAGACAACA
	F-Intron12 (53761)	GTGGGCCTGAGTTTTGATTGTGA
	F-Intron14 (70224)	CCCGATATCAAACAGGGCAAAG
	F-Intron16 (85357)	CCCCTGCCACACAGATGTAAT
<b>I miks 1-3</b>	<b>R-PDA intron 12</b>	<b>TGTGCAAGGGAAAAGGGAGTCTT</b>
<b>ABL1</b>	F-ABL1(128728)	TTCTGGGGAAATTGCCTGTCATT
	R-ABL1(134118)	AAACATTCTGCCGCATCTGGATT

**Tabell 2:** Primer og probesekvenser til *FIP1L1-PDGFR* L-gPCR. Tabellen viser primerposisjon i *FIP1L1* (NG\_008644.1) som tilsvarer primerposisjon publisert tidligere, men de er 5043 nukleotider forskjøvet [50]. Primerposisjon i *ABL1* (NG\_012034.1), som gir et 5390 bp langt produkt. F: foroverprimer, R: reversprimer.

### 3.10 Sekvensering

Både positive og uspesifikke *FIP1L1-PDGFR* produkter ble kontrollert ved sekvensering, se vedlegg 2 for metodeteori. Først ble overskudd av nukleotider og primere fjernet med exonuklease I og shrimp alkalinfosfatase (ExoSap-IT) ved å blande 2.5 µl PCR-produkt med 1 µl ExoSap-IT. Løsningen ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter og inaktivert ved 80 °C i 20 minutter. Sekvensreaksjonen ble utført ved 96 °C i 1 minutt etterfulgt av 25 sykluser med 96 °C i 10 sekunder og 60 °C i 4 minutter med en reaksjonsmiks som inneholdt 2 µl BigDye Terminator v1.1 miks, 1 µl 5x Sequencing Buffer, 5-10 ng PCR produkt og 1 pmol primer (R-PDA intron12 mM) i et totalvolum på 10 µl. Før analysering på ABI PRISM 3130 Genetic Analysis ble 5 µl sekvenseringsreaksjon tilsatt 10 µl XTerminator solution og 45 µl SAM solution (BigDye XTerminator Purification Kit), ristet ved 2000 rpm i 30 minutter og sentrifugert 2 minutter 1000 g. Analysering ble utført i henhold til leverandørens anbefalinger. Sekvensene ble så analysert med Sequencing Analysis v5.4 og sjekket mot *PDGFRA* (NM\_006206) og *FIP1L1* (NG\_008644.1) ved hjelp <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> eller ved generelt søk i <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### 3.11 Primer og probedesign

Primere og prober til real-time PCR (qPCR) ble designet ved hjelp av Primer Express v3.0 (AppliedBiosystems) og Primer-BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). AppliedBiosystems kriterier for design av primere og prober til qPCR ble tatt hensyn til så langt dette var mulig [56]. Spesifisiteten ble sjekket med BLAST-søk, dessuten ble områder med kjente polymorfier unngått. For analyser som skulle benyttes til kvantitering ble størrelser over 150 bp unngått. For RT-qPCR analyse ble minst en av primerne lagt i ekson-ekson overgang slik at genomisk DNA ikke lar seg amplifisere. For RNA-spesifikke primere hybridiserte 3'-enden kun 2-4 baser inn i tilstøtende ekson. Alternativ spleising ble tatt hensyn til ved designing, og primere ble forsøkt lagt utenom disse. Primere og prober ble løst i 1xTE-buffer til 20 (100) pmol/ul og lagret ved -20 grader.

### 3.12 Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A i RNA

I tillegg til påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A i DNA ble det også etablert en test for påvisning av rearrangeringen i RNA ved revers transkriptase real-time PCR (RT-qPCR). Selv om analysen utføres ved real-time PCR skal den kun benyttes til å gi ut et kvalitativt resultat. Primere og prober ble designet som beskrevet over. Totalt 7 forover-primere (F) lagt i *FIP1L1* spredt fra ekson 1 til 16. Disse ble benyttet i kombinasjon med en generell FAM-merket TaqMan MGB-probe (P) homolog til et område nedstrøms for WW-domenet i ekson 12 og en generell revers-primer (R) lagt i ekson 12-13 av *PDGFR*A, se tabell 3. Testen ble optimalisert ved hjelp av cDNA fra EOL-1. Singelpleks-resultater ga positivt resultat for primerne i *FIP1L1* ekson 1, ekson 2-3, ekson 7-8, ekson 10 og ekson 12 med kvantifiseringscyklusverdi (Cq) på hhv. 41, 39, 32, 22 og 20, som viser at alle de mulige primerne for EOL-1 fungerer. Ved multipleksing endret ikke Cq-verdien seg nevneverdig (< 1 syklus).

Primer/gen	Sekvens 5'-3'	Posisjon
FIP1L1-1	F-GGTCGAGCGCCTAGTGTCG	Ekson 1
FIP1L1-2	F-CAGTGCTAATCCTCCATCTGGAAT	Ekson 3-4
FIP1L1-3	F-CATGGCGTAAACCTGGTGCT	Ekson 7-8
FIP1L1-4	F-TGGGCTTCCACCGAGCA	Ekson 10
FIP1L1-5	F-CAGGCGACGGGCAAAT	Ekson 12
FIP1L1-6	F-TCCGACTGTCAGCACTGCTC	Ekson 13
FIP1L1-7	F-GGTTCTGCTCCTTCGTGGC	Ekson 16
R-PDGFR	R-ACCCCAAGACCCGACCAA	Ekson 13-12
P-PDGFR	P-FAM(MGB)CCAAGAGATGGACTAGTGC	Ekson 12

**Tabell 3:** *FIP1L1-PDGFR*A RT-qPCR. Primer og probesekvenser. Ekson-nummerering ifølge Ensembl, *FIP1L1* (ENST00000337488) og *PDGFR*A (ENST00000257290).

Totalt 2,5 µl cDNA (125 ng) ble tilsatt 1 x Universal Master Mix, 300 nM primere, 200 nM probe og nukleasefritt vann i en totalreaksjon på 25 µl, og analysert med 7900HT Real Time System, ved 50 °C i 2 minutter, 95 °C i 10 minutter og 45 sykluser med 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 minutt. Positive og negative kontroller var inkludert i hvert oppsett. Nedre deteksjonsgrense ble undersøkt ved å lage en logaritmisk fortynningsrekke av cDNA fra EOL-1 i cDNA fra 10 normalblod (NB-10). Resultatet ble analysert med baselinje mellom 3-15 og automatisk beregning av terskel, men denne kan justeres dersom nødvendig. RNA-kvalitet og -kvantitet sjekkes med RT-qPCR for *GUSB* (glucuronidase, beta) og/eller *ABL1*, se senere.

### 3.13 Kvantitativ ASO-qPCR *FIP1L1-PDGFR*A

En generell reversprimer (R-PDGFR intron12: GGAGGTTACCCCATGGAACTTAC) benyttes sammen med en generell ekson 12-probe identisk med den benyttet i RT-qPCR *FIP1L1-PDGFR*A. For hver pasient designes det 1-2 forover allelsespesifikke primere (ASO) homolog til DNA sekvensen, der 3'-enden av primeren maksimalt skal ligge 4-5 nukleotider over bruddpunktet eller eventuelt kun i *FIP1L1* så nært inntil bruddet som mulig. Først sjekkes de ulike primerne med positiv prøve og NB10. Den ASO som gir lavest Cq, høyest økning i fluorescens ( $\Delta Rn$ ) og er negativ i NB10 velges.

I en 50 µl reaksjon tilsettes 1 x Universal Master Mix, 300 nM av hver primer, 100 nM probe, nukleasefritt vann og 250 ng DNA (40 000 celler). Reaksjonen analyseres på 7900HT som beskrevet. Oppfølgingsprøver kvantifiseres ved å benytte DNA fra diagnostisk prøve som standard fortynt i DNA fra NB10. Det lages en 10-log fortynningsrekke ned til  $10^{-5}$ , med en ekstra fortykning på  $5 \times 10^{-4}$ . Alle prøver testes med 3 paralleller og alle standarder med 2 paralleller i det høye område og 3 i det lave. I tillegg analyseres DNA fra 3 NB-10 og 3 negative kontroller (NTC).

Kvantifiserbart område og nedre deteksjonsgrense vurderes etter kriterier beskrevet tidligere [49]. Kort oppsummert vil kvantitativt område være innenfor øvre og nedre standard, der 10x fortykningene ligger 2,6-4 Cq fra hverandre og 2x fortykningene 0,5-1,5 Cq fra hverandre. Slope skal ligge mellom 3,1 til 3,9. Paralleller må ikke avvike mer enn 1,5  $\Delta Cq$  og korrelasjonskoeffisient må være  $\geq 0,98$ . Nedre deteksjonsgrense er laveste standard som er positiv. NB-10 og NTC må være negative.



Templatet kvantifiseres også med qPCR for albumin-genet(*ALB*) (F-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT, R-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT, P-6FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-BBQ). Det brukes samme betingelser som beskrevet over, men alle prøvene analyseres både med 50 og 250 ng for å detektere eventuelle hemmende substanser i ekstraktet. DNA fra NB-10 benyttes til å lage en 4 punkters standardkurve fra 31 ng (5000 celler) til 313 ng (50 000 celler). Et kvantitativt resultat ved ASO-qPCR justeres med resultatet fra *ALB* qPCR. Dersom 50 og 250 ng gir et resultat som tyder på en hemming, eller dersom beregnet verdi er <0,50 eller >2,0, må årsaken til dette undersøkes før MRD kan beregnes.

*ALB* beregnes med formelen:

$$ALB = \frac{\text{Målte kopier}_{ALB}}{\text{Kopier analysert}_{ALB}}$$

Minimal resttumor beregnes med formelen:

$$MRD = \frac{\text{Målte kopier}_{ASO}}{\text{Kopier analysert}_{ASO}} \times \frac{ALB_{standard}}{ALB_{prøve}}$$

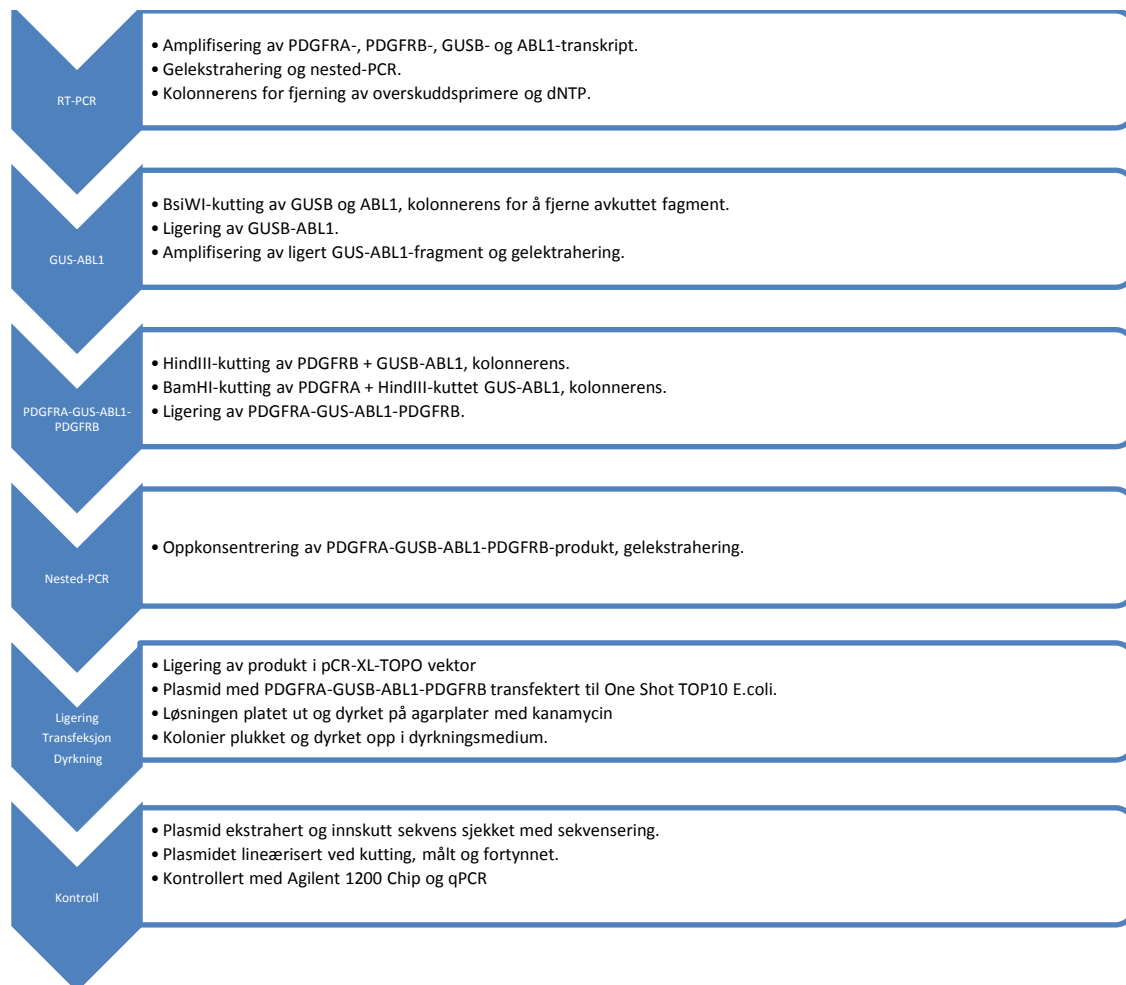
### 3.14 Kvantitering av *PDGFRA* og *PDGFRB*-genuttrykk ved RT-qPCR

For å kunne kvantitere et gentranskript i en prøve slik at resultatet kan sammenlignes med andre prøver og kontroller, må resultatet justeres for variasjoner i RNA-kvalitet, RNA-kvantitet og cDNA-syntesens effektivitet. Dette gjøres ved å kvantitere et eller flere referansegentranskript (RefG) som resultatet deretter normaliseres med. Et referansegent må være stabilt uttrykt i det prøvematerialet som skal undersøkes og bør ikke påvirkes av sykdomsforløp, behandling eller andre faktorer. Vi har valgt å bruke *GUSB* og *ABL 1* som ble evaluert i en studie utført av Europe Against Cancer program (EAC) [57].

### 3.15 Tillaging av standard ved kloning

Siden det ikke er tilgjengelig kommersielt standardmateriale for kvantitering av *PDGFRA*- og *PDGFRB*-transkript måtte dette lages. Det ble derfor konstruert en gensekvens som besto av *PDGFRA*-, *PDGFRB*-, *GUSB*- og *ABL 1*-transkript. Denne sekvensen ble så ligert inn i en plasmidvektor som deretter ble transfektert til *E.coli* bakterier. Etter dyrkning av de transfekterte bakteriene, ble plasmidvektor rensset,

kontrollert og linearisert. Plasmidvektor bevares på -20C til senere bruk. På den måten kan både *PDGFRA*, *PDGFRB* og RefG kvantifiseres med en og samme plasmidstandard, se figur 6.



**Figur 6:** Trinnvis fremstilling av prosedyren for tillaging av plasmidstandard.

### 3.15.1 Tillaging av PCR-produkt

For at gentranskriptene skulle kobles sammen i riktig rekkefølge og kun en gang i sekvensen fikk primerne en 5'hale med kuttsetter for restriksjonsenzym, med unntak av *GUS*-transkriptet som hadde egnet kutteområdet internt i sekvensen. Det ble valgt restriksjonsenzymmer som lager 4 basers overheng og som ikke kuttet andre steder i transkriptet. Primerne ble designet slik at det etter kutting ble et 4 basers "overheng" i 3'-enden av forover tråd (5'-3'-retning) som var komplementær til et fire baser "underheng" på revers tråd (3'-5'-retning) i 5'-enden av det neste transkriptet. For å sjekke for mulige interne kutteområder i transkriptene ble NEBcutter2 programvare fra NewEnglandsBiolabs benyttet, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>. For primersekvenser, se tabell 4.

Gen	Primer	5'hale	Sekvens 5'-3'
<i>PDGFRA</i>	F-5'PDGFRA_449		ACACTCAGACAGAAGAGAATGAGCTT
	R-3'PDGFRA_2043	BamHI	tacttgaggatccGGATCTGGCCGTGGGTTT
<i>GUSB</i>	F-GUSB		TGCAGGGTTTTACCAGGATCCA
	R-GUSB	BsiWI	gcgattcgtacgCTCTCTCGCAAAGGAACGCTGC
<i>ABL1</i>	F-ENF1003	BsiWI	attagccgtacgTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
	R- ENR1063	HindIII	agcaataagcttGATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>PDGFRB</i>	F-5'PDGFRB_814	HindIII	taacgtaagctt GGCTCTACATCTTTGTGCCAGAT
	R-3'PDGFRB_2513		AGTGATGATATAGATGGGTCCTCCTT

**Tabell 4:** primersekvenser for amplifisering av gentranskript. Noen primere har fått en 5'hale med kuttesekvens. Restriksjonsenzymet og tilhørende sekvens er merket med grønt, i tillegg det også lagt en tilfeldig sekvens på 6 nukleotider for å sikre optimal kutting. Transkriptene skal ligeres sammen i den rekkefølgen som angitt i tabellen. *GUSB*-amplikon har et internt BamHI kuttesete nær 5'enden av sekvensen.

*PDGFRA* og *PDGFRB* ble amplifisert med Expand Long Template PCR System i hver sin reaksjon. 125 ng cDNA fra normalblod, 1xBuffer1 (1,75 mM MgCl<sub>2</sub>), 350 µM av hver dNTP, 300 nM av respektive primere og 3,75 U Expand Long Template enzyme mix og tilsatt nukleasefritt vann i et totalvolum på 25 µl. All pipettering ble gjort på is. Reaksjonen ble utført ved 94 °C i 2 minutter, 10 sykluser ved 94 °C i 10 sekunder, 60 °C i 30 sekunder og 68 °C i 4 minutter, deretter 25 sykluser der tiden ved 68 °C ble økt med 20 sekunder for hver syklus. *GUSB* og *ABL1* ble amplifisert med 125 ng cDNA fra normalblod, 1x AmpliTaq GOLD PCR Master Mix og 300 nM primere i et totalvolum på 25 µl. Reaksjonen foregikk ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 35 sykluser ved 95 °C i 30 sekunder, 60 °C i 30 sekunder og 72 °C i 45 sekunder.

Både *ABL1* og *PDGFRA* ga uspesifikke bånd og måtte gelrenses. Produktet ble tørket ned i vakumsentrifuge, løst i nukleasefritt vann og 1x gelloadingbuffer, separert på en 1,5 % NuSieve 3-1 agarosegel med 1 x TBE-buffer ved 80 V i 2-3 timer. Gelen var tilsatt 1X SYBR® Safe DNA gel stain og bånd ble visualisert på en Visi-Blue Transilluminator.

Produkt i riktig størrelse ble skåret ut av gelen med en skalpell og rensset med QIAquick Gel extraction Kit etter leverandørens anbefalinger, vedlegg 2. DNA ble eluert i 30 µl nukleasefritt vann.

Det var nødvendig med nested-PCR for å få tilstrekkelig med produkt. Dette ble gjort med samme betingelser som tidligere beskrevet, og med 0,5 µl PCR-produkt som templat.

### 3.15.2 Kutting og ligering av PCR-produkt

Før og etter restriksjonenzymkutting ble primere, nukleotider og avkuttete fragment fjernet med QIAquick PCR Purification Kit etter leverandørens anbefaling, DNA ble eluert i 30 µl nukleasefritt vann, se vedlegg 2. Produktene ble kontrollert med kapillærelektroforese.

Kutting og ligering ble gjort trinnvis. Omkring 1 µg GUSB- og ABL1-produkt ble kuttet i 1x Neb2-buffer, 30 units BsiWI ved 55 °C i 1 time. Enzymet ble inaktivert i 20 minutter ved 80 °C. Konsentrasjonen ble målt på NanoDrop spektrofotometer. GUSB og ABL1 ble blandet i forholdet 1:1 før ligering, antall kopier ble beregnet med formel:

$$\text{Antall molekyler} = \frac{\text{mengde}(\text{ng}) * \text{avogadros tall}(\text{molekyler/mol})}{\text{lengde}(\text{bp}) * 1\text{E}9(\text{ng/g}) * 650\left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \text{ per bp}}$$

Avogadros tall:  $6.022 \times 10^{23}$  molekyler/mol. Hvert bp veier gjennomsnittlig 650 Dalton (g/mol) [58].

I et totalvolum på 30 µl ble det tilsatt ca. 250 ng GUSB og ABL1 ( $1 \times 10^{12}$  molekyler), 1xT4 DNA Ligase Reaction buffer og 1U T4 DNA ligase. Ligeringsreaksjonen foregikk i romtemperatur i 10 minutter etterfulgt av inaktivering ved 65 °C i 10 minutter. Nested-PCR ble satt opp på ligert produkt med F-GUSB og R-ABL1-HindIII primere og samme betingelser som beskrevet over, deretter ble bånd på omtrent 400 bp ekstrahert fra gel. PDGFRA og GUSB-ABL1 kuttet med 10 U/µg BamHI i 1 x Buffer BamHI ved 37 °C i 1 time og etterfulgt med 80 °C i 20 minutter. PDGFRB og BamHI-kuttet GUSB-ABL1 kuttet med 10 U/µg HindIII i 1 x Neb2-buffer i 37 °C i 1 time og inaktiveres ved 65 °C i 20 minutter. Etter kutting ble produktene rensset med QIAquick PCR Purification Kit og konsentrasjonen ble målt. Ca. 5 µl av PDGFRA, GUSB-ABL1 og PDGFRB ble blandet sammen med 1X T4 DNA Ligasebuffer og 1U T4 DNA Ligase i 20 µl totalvolum. Ligering ble utført ved 14 °C i 1 time og varmeinaktivert ved 75 °C i 10 minutter. Tilslutt ble hele den konstruerte sekvensen amplifisert opp med Expand Long Template PCR System 1, F-5'PDGFRA (449), R-3'PDGFRB (2513) og 1 µl ligeringsmiks som tidligere beskrevet.

### 3.15.3 Ligering og kloning

For forklaring av prinsippet for TOPO XL-kloning, se vedlegg 2. Kloning ble utført med TOPO XL PCR Cloning Kit etter instruksjon. Kort oppsummert ble ligering utført

ved å blande 4 µl gelekstrahert PCR-produkt med 1 µl pCR-XL-TOPO vektor. Løsningen ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter og deretter ble 1 µl 6 x TOPO Cloning STOP Solution ble tilsatt, blandet forsiktig, sentrifugert og oppbevart på is.

Transfeksjon ble utført ved å tilsette 2 µl av ligeringsreaksjonen til ett rør One Shot TOP10 E.coli chemically competent cells. Røret med cellene ble blandet forsiktig og innkubert ½ time på is og deretter varmesjokkbehandlet ved 42 °C i 30 sekunder i vannbad før de ble satt tilbake på is i 2 minutter. Deretter ble 250 µl romtemperert S.O.C-medium tilsatt og cellene inkubert ved 37 °C 1 time ved risting (225 rpm). Totalt 100 µl av cellene ble spredd på Luria-Bertani (LB)-plater med 50 µg/ml kanamycin og inkubert over natt ved 37 °C.

Totalt 15 kolonier ble plukket og overført til hvert sitt rør tilsatt 5 ml LB-medium med 50 µg/ml Kanamycin og dyrket overnatt ved 37 °C ved 225 rpm.

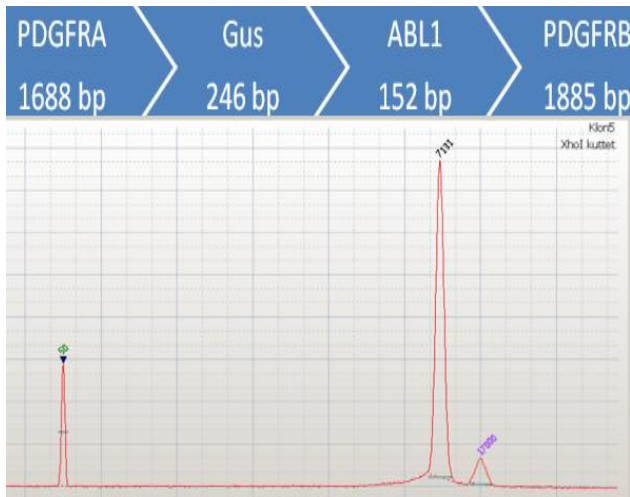
#### **3.15.4 Rensing av plasmid**

Rensing av plasmid ble gjort med QIAGEN Plasmid Mini Kit som beskrevet i protokollen, se vedlegg 2 for mer informasjon.

Innskutt sekvens ble kontrollert med sekvensering. Sekvensering ble gjort fra begge sider med F-M13 og R-M13-primere. Dessuten ble en intern primer (F-3'PDGFRA\_1987, se tabell 5) benyttet for å se om overgangene mellom PDGFRA, GUSB, ABL1 og PDGFRB var korrekt. Til hver reaksjon ble 200 ng plasmid tilsatt. Sekvensene ble sjekket mot den teoretiske sekvensen (vedlegg 3) ved hjelp av bl2seq <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

#### **3.15.5 Linearisering av plasmid og standardkurvefortynning.**

Siden sirkulært plasmid er supercoilet kan dette påvirke effektiviteten ved en PCR. Restriksjonsenzymet XhoI ble valgt fordi det kutter kun en gang i plasmidsekvensen men ikke i innskutt DNA. Totalt 4 µg av utvalgt klon ble tilsatt 1x Buffer H, 1 µl XhoI i et totalvolum på 80 µl. Kutting ble utført ved 1 time ved 37 °C før enzymet ble inaktivert ved 65 °C i 20 minutter.



**Figur 7:** Øverst vises sammensetningen av konstruert sekvens. Under vises linearisert plasmid med innskutt sekvens som er analysert med kapillærelektroforese. Plasmidkonstruktet danner en distinkt topp på 7131 bp. I tillegg sees to størrelsesmarkører på 50 og 17000 bp i elektroferogrammet. Lengden til plasmidet stemmer med forventet størrelse av plasmid + innskutt sekvens (DNA pCR XL-TOPO; 3519 bp, konstruert sekvens; 3652 bp).

Bruksløsning med  $1 \times 10^6$  kopier/ $\mu$ l plasmid i  $1 \times$  TE-buffer ble lagd og oppbevart i 1,5 ml rør (Eppendorf LoDNA Binding rør) ved  $-70^\circ\text{C}$ . Denne fortyningen er utgangspunkt for tillaging av 6 log fortynningsrekker i  $1 \times$  TE-buffer som oppbevares ved  $4^\circ\text{C}$  og benyttes innen 1 måned.

### 3.16 Kvantitativ RT-qPCR for *GUSB* og *ABL1*

*GUSB* og *ABL1* benyttes som referansegene for å normalisere *PDGFRA*- og *PDGFRB*-genuttrykk. De ble også benyttet som kvalitetskontroll av RNA til den kvalitative FIP1L1-*PDGFRA* RT-qPCR.

Det ble benyttet samme primere og prober som tidligere var validert av EAC, selv om det er noen små problemer med analysene [57]. *ABL1*-testen er ikke spesifikk for mRNA og det kan dannes produkt som kommer opp etter syklus 35 i DNA [57]. Den ene *GUSB*-primeren er komplementær til en enkeltbase-polymorfi (rs1061361) med heterozygot frekvens på 0,199. Det ble derfor designet en ny F-*GUSB*-primer oppstrøms for polymorfien. Men denne fungerte ikke bedre enn primeren som var publisert, og ble derfor ikke benyttet videre i forsøkene.

Analysene ble utført som tidligere beskrevet [57]. En reaksjonsmiks på  $25 \mu\text{l}$  ble tilsatt 125 ng cDNA,  $1 \times$  Universal Mastermiks, 300 nm primere og 200 nm probe og analysert som tidligere beskrevet

Primer- og probe-sekvenser:

**GUSB:** ENF1102 GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT, ENR1162  
CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA, ENPr1142 CCAGCACTCTCGTCGGTGACTIONTCA.

ABL1: **ENF1003** TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT, **ENR1063**  
GATGTAGTTGCTTGGGACCCA, **ENPr1043** CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT  
(hydrolyseprobene (ENPr) er merket med 6FAM og BBQ).

Alle prøver og standarder ble analysert i duplikater. Positive og negative kontroller var inkludert i hvert oppsett, i tillegg til en 6 log fortyningsserie av plasmid (fra 10 til 10<sup>6</sup> kopier). Baselinje ble satt mellom syklus 3-13 og terskelen justert til 0,2.

### 3.17 Kvantitering av *PDGFRA* og *PDGFRB*-genuttrykk ved RT-qPCR

Genet som koder for *PDGFRA* ligger på kromosom 4q12 (NM\_006206, ENSG00000134853) og strekker seg over 70 kb. Ved transkripsjon dannes et 6576 nukleotid (nt) langt mRNA som består av 23 ekson. Proteinet består av 1089 aminosyrer (CCDS3495). Det er beskrevet 9 spleisevarianter, hvorav 5 er proteinkodene. Disse variantene er påvist i placenta, uterus, føtalt vev, kondrocytter og teratokarsinom ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Genet som koder for *PDGFRB* er på kromosom 5q33.1 (NM\_002609, ENSG00000113721) og er totalt 43224 bp langt. *PDGFRB* består av 23 ekson og danner et 5717 nt langt transkript (ENST00000261799). Det er kun en spleisevariant påvist. Proteinet består av 1106 aminosyrer (CCDS 4303.1)([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Det ble designet to RT-qPCR tester for begge gen, se tabell 5. De respektive primerne og prober ble lagt til områder som henholdsvis koder for kinasedomenet (3'-enden) og immunglobulindomenet (5'-enden). Ved å påvises et forhøyet uttrykk av kinasedomenet kan dette brukes som en screeningsmetode for å detektere mulige *PDGFRA*- og *PDGFRB*-genrearrangeringer, denne fremgangsmåten er tidligere beskrevet [52-53]. Siden det ikke bare er *PDGFRA*- eller *PDGFRB*-genrearrangeringer som kan føre til et forhøyet genuttrykk, ble 5'-ende RT-qPCR designet for å kunne skille rearrangeringer fra andre årsaker. Immunglobulindomenet vil alltid tapes ved en *PDGFR*-genrearrangering og til tross for at de fleste *PDGFR*-translokasjoner er balanserte, påvises det sjeldent et resiprokt transkript, se tabell 1. Derfor forventes det at antall transkript av kinasedomenet er høyere enn immunglobulindomenet ved en rearrangering, mens det ikke vil være en forskjell ved de andre årsakene til et forhøyet genuttrykk.



Det var ikke mulig å designe testene til *PDGFRA* spesifikke nok slik at de ikke detekterte alternativt spleiset transkript, med disse transkriptene var ikke påvist i hematologiske celler.

Totalt 1 µl cDNA (50 ng) ble tilsatt 1 x Universal Master Mix, 50-900 nM av hver primer (se tabell 5), 200 nM probe og nukleasefritt vann i en totalreaksjon på 10 µl, og analysert som tidligere beskrevet. Positive og negative kontroller ble inkludert i hvert oppsett, i tillegg til en 6 log fortyningsserie av plasmid (fra 10 til 10<sup>6</sup> kopier). Baselinje ble satt mellom syklus 3-13 og terskel justert til 0,2.

Test	Primersekvens 5'-3'	Posisjon	Bp	nM i reaksjon
5'PDGFRA	F-ACACTCAGACAGAAGAGAATGAGCTT	(449) e3	79	900
	R-GGTACAAAGGCTACATCTGGGTCT	(527) e4_e3		900
	P- AAGGCAGGCACATTT	(476) e3		200
3'PDGFRA	F-CGGTCCCAACCTGTCATGA*	(1987) e13	57	300
	R-GGATCTGGCCGTGGGTTT	(2043) e14_e13		900
	P- TTGCAGTGAAGATGCT	(2009) e13		200
	F-CCAAGAGATGGACTAGTGCTTGGT	(1903) e12_13	141	900
5'PDGFRB	F- GGCTCTACATCTTTGTGCCAGAT	(814) e3_4	68	50
	R- GATGAATAGTTCCTCGGCATCAT	(881) e4		900
	P- CACCGTGGGCTTC	(839) e4		200
3'PDGFRB	F- CAGTGAGAAGCAAGCCCTTATGT	(2396) e14	118	900
	R- AGTGATGATATAGATGGGTCCTCCTT	(2513) e15-14		900
	P- CTGAAGATCATGAGTCACC	(2424) e14		200

**Tabell 5:** Primer- og probesekvenser til kvantitering av *PDGFRA/B*-genuttrykk. Tabellen viser også amplikonlengde i bp, ekson(e) og posisjon (ENST00000257290 for *PDGFRA* og ENST00000261799 for *PDGFRB*). \*F-PDGFRA-e13-primer var ikke egnet og ble byttet ut med F-e12\_e13 primer, se forklaring under resultater og diskusjon. Hydrolyseprobene (P) er alle lagd med minor groove binder (MGB) og merket med 6FAM.

### 3.18 Statistisk analyse

Korrelasjon mellom kontinuerlige variable ble gjort med ikke parametrisk Spearmans rank test. Ikke parametrisk Mann-whitney U test ble benyttet til å sammenligne forskjeller mellom uavhengige grupper. P-verdier under 0,05 ble tolket som statistisk signifikant. Parametriske metoder ble benyttet til å beregne grenseverdier.

Variasjonskoeffisienten (VK) ble beregnet for innen og mellom serievariasjon.



## 4 Resultater

### 4.1 Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A-fusjonsgen ved hjelp av L-gPCR

Analysen ble utført som beskrevet i kapittel 3.9. Cellelinjen EOL-1 lot seg amplifisere i alle tre multipleks PCR-miksene, og det ble dannet produkt omkring 9000 bp (miks1), 5000 bp (miks2) og 420 bp (miks3). Ved sekvensering ble bruddpunktene identifisert til intron 12 nt 54069-70 for *FIP1L1* (NG\_008644.1) og ekson 12 nt 16150-51 i *PDGFR*A (NT\_022853.15). Dette svarer til bruk av *FIP1L1*-primer Int11 (40225) for miks1, Int11 (44469) for miks 2 og Int12 (48718) for miks 3, som tilsvarende produkt på hhv. 8922, 4678 og 429 bp.

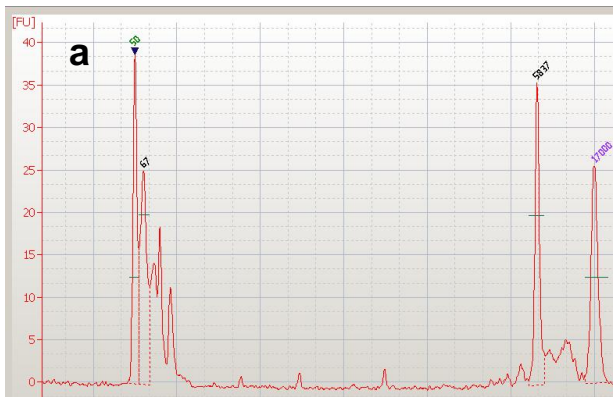
Totalt 16 pasientprøver (7 PB og 9 BM) ble analysert. DNA-konsentrasjonen varierte mellom 40 til 176 ng/μl (median 63) og renheten fra 1,8 til 2,0 (median 1,9). Alle prøvene hadde optimal DNA-kvalitet, testet med *ABL1* L-gPCR som gir et produkt på 5390 bp. Ved analysing av *ABL1* L-gPCR ved kapillærelektroforese varierte størrelsene mellom 4604-5311 kb (median 4950) og alle var > 9x over nedre størrelsesmarkør. Alle pasientprøvene var negative for *FIP1L1-PDGFR*A L-gPCR med unntak av kasus 1 hvor det ble påvist en distinkt topp i alle tre mastermiksene, størrelsene varierte fra 1002 til 12 641 bp, se figur 9b. Produktet ble sekvensert og bruddpunktet identifisert, se figur 9c. Produkt i miks 1 er dannet med F- Intron13 (61316), miks 2 med F- Intron 13 (65623) og miks 3 med F-Intron12 (53761).

Metoden varierte noe fra dag til dag. Semikvantitering ved kapillærelektroforese av EOL-1 ufortynnet og fortynnet til 10 % i NB10 viste en dag til dag variasjonskoeffisient på 16-31 % for miks 2 (4678 bp) og 59-66 % for miks 3 (429 bp), men produktene var alltid sterke nok til å tolkes positivt. Det lengste produktet (miks 1, 8922 bp) var ved enkelte oppsett negativt ved analysing av 100 % EOL-1.

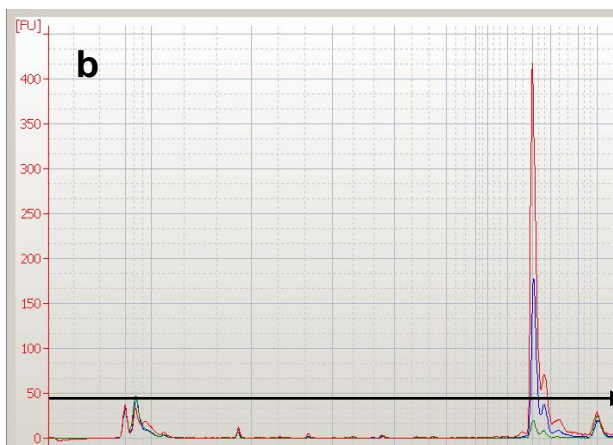
Uspesifikk amplifisering forekom også i enkelte negative prøver og kontroller, også dette varierte fra dag til dag, se figur 8a. I miks 2 dannes uspesifikke produkter rundt 5.5 kb, men også i miks 1 og 3 kunne uspesifikk amplifisering forekomme. Størst var problemet dersom det ble analysert mindre DNA enn det testen var optimalisert for. Disse produktene ble forsøkt sekvensert ved gjentatte anledninger, men uten hell.

Nedre deteksjonsgrense av L-gPCR og kapillærelektroforese ble testet ved å fortynne EOL-1 i NB10, se figur 8b. For å unngå falske positive resultat må en positiv

topp være minst 2 ganger høyere enn øvre og nedre markør. For miks 2 var 5 % EOL-1 positiv og for miks 3 var 1 % EOL-1 positiv. Men siden metoden er designet for å kunne danne 5000 bp lange produkt, ble nedre deteksjonsgrense satt til 5 % muterte celler. Dette er tilstrekkelig for de aller fleste bruddpunkt, med unntak av et område i FIP1L1-intron 10 hvor det mangler en primer. Dersom det skjer et brudd her, kan dette gi et produkt mellom 5-12 kb. Amplifisering av så lange produkt vil ikke alltid la seg gjøre.



**Figur 8a:** Bildet viser en uspesifikk topp på omkring 5837 bp. Dette produkt dannes i PCR-miks 2 ved analysering av enkelte negative prøver og kontroller.



**8b:** fortyning av EOL-1 i NB10 analysert med miks 2. Spesifikt produkt er ca. 5000 bp. Rød topp er fra 10 % EOL-1, blå fra 5 % og grønn fra 1 %. Tydelig positivt resultat ved analysering av 5 % EOL-1. Minste fortyning (1 %) er svakere enn uspesifikke produkt og tolkes negativt. På hvert elektroferogram er også lav og høy størrelsesmarkør med (50 og 17000 bp).

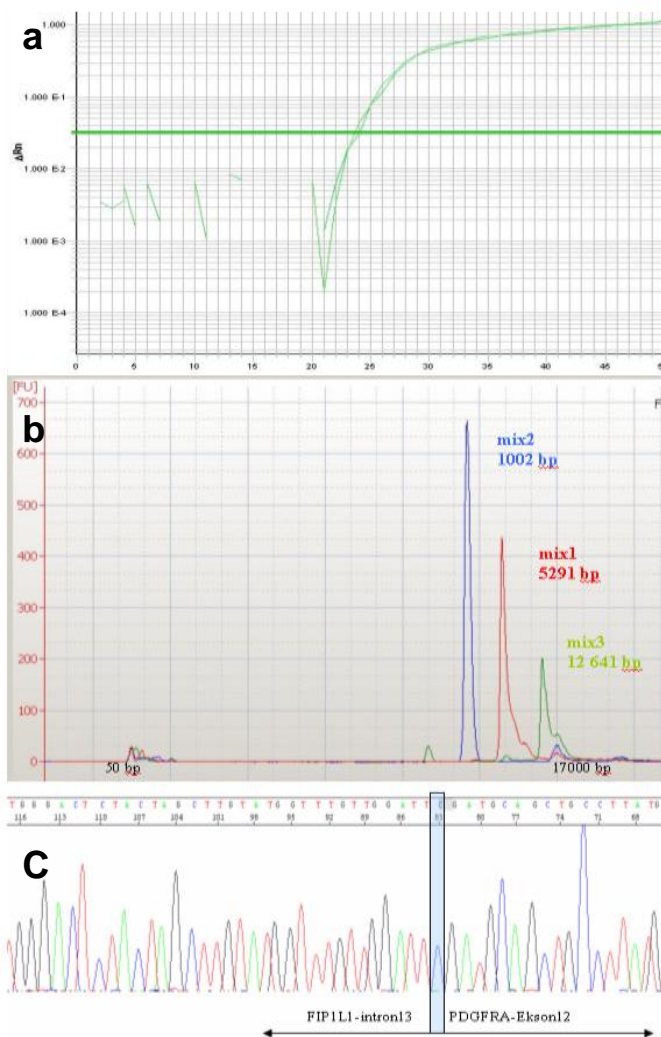
Fluorescensenheter (FU) på y-aksen tilsvarer mengde produkt dannet. Skalaen til de to bildene er forskjellig og horisontal pil i nederste bildet avmerker høyeste topp i øverste bilde.

#### 4.2 Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A-fusjonsgentranskript ved hjelp av multipleks RT-qPCR.

Analysen ble utført som beskrevet i kapittel 3.12. Nedre deteksjonsgrense ble undersøkt ved å lage en logaritmisk fortynningsrekke av cDNA fra EOL-1 i cDNA fra NB-10, og analysert med multipleks RT-qPCR for *FIP1L1-PDGFR*A. EOL-1 fortennet ned til 0,1 % ga et positivt resultat. Beregnet effektivitet for analysen er 1.88. Selv om dette er litt under det som er anbefalt effektivitet ved en kvantitativ real-time PCR ( $\leq 1,9$ ), er dette ikke et problem for en analyse som kun skal benyttes kvalitativt. Det

ble ikke påvist uspesifikk amplifisering, både RNA og DNA fra NB10 var negativt ved gjentatte analyseringer.

Totalt 14 pasientprøver (7 PB og 7 BM) ble analysert med multipleks RT-qPCR for *FIP1L1-PDGFR*A. Kasus 1 var sterk positiv og kom opp i Cq 23,8, se figur 9a. Alle andre pasientprøvene var negative. RNA-konsentrasjonen varierte mellom 30 til 392 ng/μl (median 130) og renheten fra 1,8 til 2,1 (median 2,0). RNA-ekstraktene ble kontrollert med RT-qPCR for referansegenet *GUSB* som beskrevet i kapittel 3,16, men uten bruk av standardkurve. For å kunne konkludere ved et negativt analyseresultat, må *GUSB* RT-qPCR komme opp før Cq 30. Alle pasientprøvene var innenfor gitte krav (fra Cq 19,8 til 28,8, median 21,9), med unntak av en prøve som var mottatt laboratoriet mer enn 48 timer etter prøvetakning. Denne ble ekskludert fra videre analysering.



**Figur 9:** Analyseresultater fra kasus 1 hvor det ble påvist *FIP1L1-PDGFR*A-genrearrangering.

**9a:** Multiplex RT-qPCR for *FIP1L1-PDGFR*A-genrearrangering. Kurven viser normalisert fluorescensverdi (y-akse) plottet mot PCR-syklus (x-akse), økningen i fluorescens korresponderer med dannelsen av PCR-produkt.

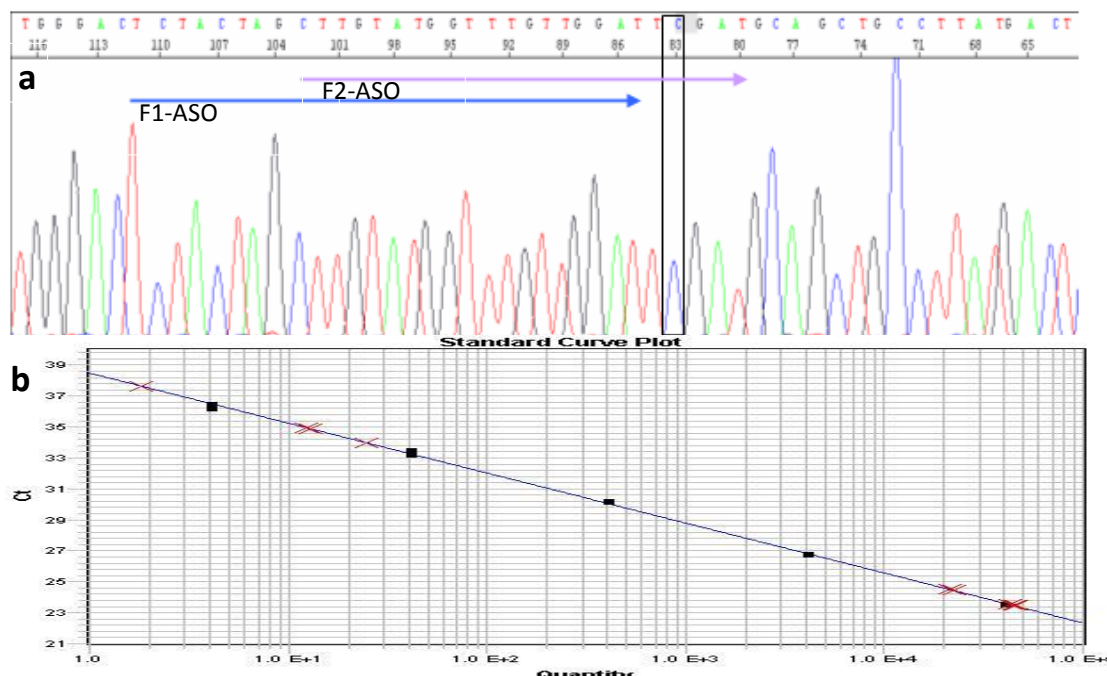
**9b:** Resultater ved *FIP1L1-PDGFR*A L-gPCR, alle 3 multipleks reaksjonene er analysert med kapillærelektroforese. X-aksen viser størrelse (bp), y-aksen viser prøvens fluorescens som korresponderer til mengde PCR-produkt dannet. Hver elektroferogram normaliseres mot to interne størrelsesmarkører på 50 og 17000 bp. Prøven er positiv i alle tre miksene; miks 1: 5291 bp, miks 2: 1002 bp og miks 3: 12 641 bp.

**9c:** Sekvenselktroferogram over genomisk bruddpunkt. C-base i bruddpunktet kan stamme fra begge gen. *FIP1L1*-brudd er i intron 13 (66556 nt, NG\_008644) og *PDGFR*A-brudd er i ekson 12, innenfor WW-domenet kodon 577 (16149 nt, NG\_022853.15).

### 4.3 Kvantitering av *FIP1L1-PDGFRA* ved ASO-qPCR

Analysen ble utført som beskrevet i kapittel 3.13. Den ble kontrollert ved å designe to ASO spesifikke til bruddpunktet til EOL-1 og benyttet sammen med generell reversprimer (R-PDGFRA intron12) og probe (P-PDGFRA ekson 12). Den ene ASO var designet over bruddpunktet (1EOL: CCCATCTAAAATTATCATTTGTATGTTTTTC) og den andre oppstrøms for bruddet i *FIP1L1* (2EOL:CATCTAAAATTATCATTTGTATGTTTTTCATATG). Primer 2EOL ble valgt fordi den ga lavest Cq og høyest  $\Delta R_n$ . Det ble lagd en 10-log fortynningsrekke av EOL-1 i NB-10 ned til  $1 \times 10^{-5}$ , som ble benyttet som standard. I tillegg ble NB-10 kontrollert. DNA fra normalblod var negativt, nedre kvantitative område var  $1 \times 10^{-4}$  og nedre deteksjonsgrense på  $1 \times 10^{-5}$ . Metoden fungerer dermed etter gjeldende krav.

På grunnlag av påvist *FIP1L1-PDGFRA*-fusjonsgen for kasus 1, ble det igangsatt imatinib-behandling. Det var derfor ønskelig å etablere ASO-qPCR for å følge behandlingsrespons. Dette ble utført etter samme prinsipp som beskrevet over for EOL-1, se figur 10.



**Figur 10a:** Kasus 1, *FIP1L1-PDGFRA*-sekvens, genfusjonen er avmerket med sort rektangel. To ASO ble designet og testet, det var ingen forskjell mellom Cq og  $\Delta R_n$  til disse. F1-ASO ble benyttet videre. **10b:** Standardkurve er generert med en fortynningsrekke av diagnostisk BM i NB10. Analysens effektivitet er 2,05. PB tatt 4 uker etter diagnostisk BM,

men før behandlingsoppstart var >99 % av diagnostisk BM. Nedre deteksjonsgrense var  $1 \times 10^{-5}$  og nedre kvantitative område  $1 \times 10^{-4}$ .

#### 4.4 Kvantitering av *PDGFRA*-transkript ved RT-qPCR

Analysen ble utført som beskrevet i kapittel 3.17. Ved en screening vil det først utføres analyser for kvantitering av kinasedomenet-transkript (3'PDGFRA) normalisert med et RefG-transkript (3'PDGFRA/RefG). Dersom dette er forhøyet, vil kvantitering av transkriptet som koder for immunoglobulindomenet (5'PDGFRA) utføres, og benyttes for normalisering (3'PDGFRA/5'PDGFRA).

For å benytte en slik screeningsanalyse må nivået i den friske populasjonen være kjent. Mengde *PDGFRA*-transkript ble undersøkt ved å analysere 20 NB og 8 n-BM både med 3'PDGFRA RT-qPCR og 5'PDGFRA RT-qPCR. Som forventet var nivået likt for begge testene i alle benmargskontrollene, med unntak av 1 prøve hvor 3'PDGFRA var forhøyet sammenliknet med 5'PDGFRA. Derimot ble det funnet i alle prøver fra NB et høyere genuttrykk av kinasedomenet sammenliknet med immunoglobulindomenet. Median 3PDGFRA/5'PDGFRA var 33 (omfang 8-286). Dette resultatet kunne bety at testen var uspesifikk, sensitiv for urenheter, sensitiv for degradering av RNA eller at 3'PDGFRA påviste alternativt spleiset transkript.

Forklaringen fantes i en publikasjon skrevet av Erquiaga og medarbeidere [59]. De påviste to alternative transkript (PDGFRA005 og PDGFRA004, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) i blod og benmarg som tidligere kun var påvist i teratokarsinomceller [59-60]. Disse transkriberes fra en intern promotor og har beholdt deler av intron 12, de mangler derfor området som koder for ekstracellulær-, transmembran- og juxtamembrandomenet [59]. For å teste ut om dette var årsaken til forhøyet 3'PDGFRA-transkripter, ble det designet to nye F-primere. Den ene var spesifikk for PDGFRA004 (ATTCTGCCTGCCACAGGT) og den andre for PDGFRA005 (CCGGGAAATGTTTCTCTCAGG). I tillegg ble primer som er homolog til begge transkript testet, denne er hentet fra artikkelen (PDA-i12fw: TCTGGAGTTTTTGGGTGTTAATGA) [59]. Disse ble benyttet sammen med opprinnelig revers primer og probe og testet på 3 forskjellige NB som i utgangspunktet hadde lavt, middels og høyt 3'PDGFRA kopitall. I tillegg ble cDNA fra EOL-1-cellelinje testet. Produkt for PDGFRA005 kom sent opp i EOL-1 (Cq >37) og var negativ i NB for alle primersett. PDGFRA004 varierte i Cq-verdier mellom 29,2-34,8 og for PDA-i12fw mellom Cq 30,9-31,6. Også EOL-1 positiv for PDGFRA004 og



PDA-i12fw (Cq 28,5 og 29,5). Resultatene viser at PDGFRA004-transkriptet er høyt uttrykt både i NB og EOL-1.

Det ble derfor designet en ny F-primer for kvantitering av 3'PDGFRA-transkript (F-PDGFRA (1903) e12\_13, se tabell 5). Denne ble designet slik at den ikke kunne amplifisere verken PDGFRA004 eller PDGFRA005-transkript. Primeren måtte derfor legges i ekson 12 og litt over i ekson 13, men fortsatt nedstrøms for alle beskrevne bruddpunkt i ekson 12. Testen vil derfor også amplifisere opp et lite område av transkript som koder for JM-domenet i tillegg til kinasedomenet. Produktet som dannes er nesten dobbelt så langt som opprinnelig designet test, men siden den fortsatt er < 150 bp ble opprinnelig reversprimer og probe beholdt.

Normalmaterialet ble testet på nytt, og nå ble det ikke påvist forskjell i nivået mellom 3'PDGFRA og 5'PDGFRA verken i normalblod eller benmarg. Begge testene påviste < 10 kopier i NB, siden kvantifisering i lavt område er usikkert ble normalisert verdi for 3'PDGFRA/5'PDGFRA avrundet til 1. I benmarg var median 3'PDGFRA/5'PDGFRA=1,2 (variasjonsbredde 0,9-1,8, n=8). I normalblod var median 5'PDGFRA-nivå 1,9 (variasjonsbredde 0-6,5, n=19) og median verdi i n-BM var 47 (variasjonsbredde 10-321, n=8). I normalblod var median 3'PDGFRA nivå 1,6 (variasjonsbredde 0,2-7,3, n=19) og median verdi i n-BM var 45 (variasjonsbredde 5-424, n=8)

For å etablere grenser for når et *PDGFRA*-transkript i kinasedomenet (3'PDGFRA) er forhøyet, ble verdiene i NB og n-BM først normalisert med RefG *ABL1* eller *GUSB*. Øvre referanseverdi ble definert som middelvei (m) + 3 standardavvik (sd), se tabell 6.

	m	sd	median	omfang	n	99%	Øvre ref.	95% KI-intervall
<b>3'PDGFRA/ABL1</b> NB	0,00035	0,0003	0,0003	0,0001- 0,0013	19	0,0013	0,0013	0,00115- 0,00146
<b>3'PDGFRA/ABL1</b> n-BM	0,0111	0,0125	0,0068	0,0019- 0,0375	8	0,037	0,0487	0,0382- 0,0592
<b>3'PDGFRA/GUSB</b> NB	0,00008	0,0000 6	0,00006	0,0001- 0,0003	19	0,0003	0,00028	0,000247- 0,00312
<b>3'PDGFRA/GUSB</b> n-BM	0,0026	0,0030	0,0010	0,0003- 0,0081	8	0,008	0,012	0,0091- 0,0141

**Tabell 6:** normaliserte 3'PDGFRA verdier mot *ABL1* og *GUSB* i NB og n-BM. Øvre referanseverdi er satt ved m + 3sd. m, middelvei; sd, standardavvik; n, antall; KI, konfidensintervall.

Normaliserte 3'PDGFRA verdier er omtrent 30 ganger høyere i benmarg enn i blod. Dersom verdiene normaliseres med ABL1 er de 4 ganger høyere enn om de normaliseres med GUSB, dette gjelder både i blod og benmarg.

Totalt 6 blod og 8 benmargsprøver fra 11 pasienter ble analysert med RT-qPCR for 3'PDGFRA, GUS, ABL1 og 5'PDGFRA. I benmarg varierte 3'PDGFRA/ABL1-normaliserte verdier mellom 0,0004-0,01 ( $\leq 0,05$ ) og 3'PDGFRA/GUSB-normaliserte verdier varierte mellom 0,00008-0,001 ( $\leq 0,012$ ). I blod varierte 3'PDGFRA/ABL1 verdier mellom 0-0,001 ( $\leq 0,001$ ), se figur 11. For 3'PDGFRA/GUSB varierte verdiene mellom 0-0,0002 ( $\leq 0,0003$ ). Forholdet mellom 3'PDGFRA og 5'PDGFRA var ikke forhøyet sammenliknet med normalmaterialet.

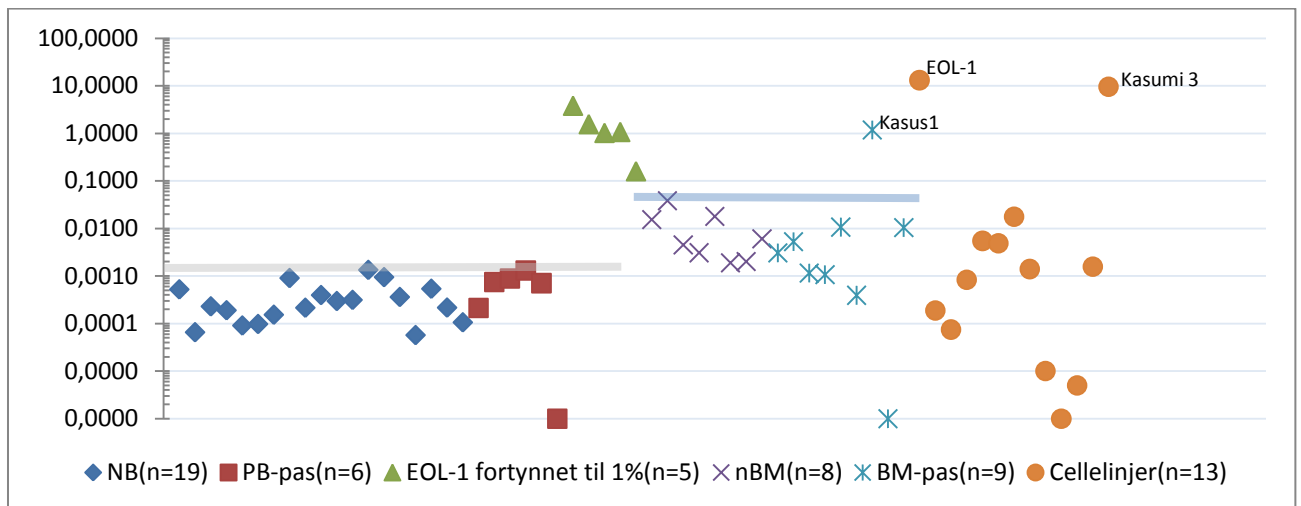
I tillegg ble benmarg fra kasus 1 med påvist *FIP1L1-PDGFRA* analysert.

Normaliserte verdier var betydelig forhøyet sammenliknet med n-BM, 3'PDGFRA/5'PDGFRA=2628, 3'PDGFRA/ABL1 =1,2 ( $\leq 0,05$ ) og 3'PDGFRA/GUSB =0,08 ( $\leq 0,012$ ).

Totalt 13 cellelinjer ble også analysert, se vedlegg 1. Av de negative cellelinjene var median verdi for 3'PDGFRA/ABL1 var 0,0008 (omfang 0-0,018). Median verdi for 3'PDGFRA/GUSB var 0,0003 (omfang 0-0,024). Karpas 299 var forhøyet sammenliknet med nivå i benmarg dersom den var normalisert med GUSB, 3'PDGFRA/GUSB= 0,024 ( $\leq 0,012$ ) men ikke dersom den var normalisert med ABL1, 3'PDGFRA/ABL1=0,018 ( $\leq 0,05$ ). Karpas 299 er en lymfomcellelinje med *NPM1-ALK*-fusjonsgen. Av årsaker forklart i kapittel 4.5 ble det besluttet at *GUSB* ikke skulle benyttes som referansegen. For EOL-1 cellelinje med *FIP1L1-PDGFRA*-fusjonsgen var resultatet for 5'PDGFRA 16 kopier og for 3'PDGFRA 682164 kopier. Normaliserte verdier var 3'PDGFRA/ABL1=13,1 ( $\leq 0,0013$ ) og 3'PDGFRA/5'PDGFRA=43529. For KASUMI-3 cellelinje med duplisert *PDGFRA*-gen var 3'PDGFRA/ABL1=9,59 ( $\leq 0,05$ ) og 3'PDGFRA/5'PDGFRA=0,61.

For å sjekke nedre deteksjonsgrense for analysen ble cDNA fra EOL-1 fortynnet i cDNA fra NB10 ned til 1 %. Minste fortynning ga verdier > 100 ganger høyere enn øvre referanseverdi i blod. Normaliserte verdier var henholdsvis 189 og 0,16 (normalområde  $\leq 0,0013$ ) for 3'PDGFRA/5'PDGFRA og 3'PDGFRA/ABL1, se figur 11. EOL-1 celler ble også fortynnet i leukocytter fra NB10 ned til 0,01 %. Også 0,1 %

EOL1 var forhøyet sammenlignet med blod 3'PDGFRA/ABL1=0,028 (normalområde blod  $\leq 0,0013$ ) men ikke sammenliknet med benmarg (normalområde benmarg  $\leq 0,049$ ). Det er kun hvis 3'-enden normaliseres med 5'-enden at nivået til 0,1 % fortsatt er betydelig forhøyet, 3'PDGFRA/5'PDGFRA=53,8.



**Figur 11:** y-aksen; 3'PDGFRA normalisert med ABL1, logaritmisk skala. De horisontale linjene tilsvarende øvre referanseområde for blod (grå) eller benmarg (blå).

Både 3'PDGFRA og 5'PDGFRA var lineære over 6 log, fra  $10^1$  til  $10^6$  kopier. Gjennomsnittlig effektivitet var hhv. 1,95 og 1,96. Korrelasjonskoeffisient var  $> 0,99$ . Variasjonskoeffisienten innen serie for 3'PDGFRA er 16 % og mellom serievariasjon for 3'PDGFRA var 24 % testet i øvre nivå av normale prøver (1000 kopier).

#### 4.5 Kvantitering av PDGFRB-transkript

Bakgrunn og metode er beskrevet i kapittel 3.17 og utføres etter samme prinsipp som for kvantitering av PDGFRA-transkript ved RT-qPCR, se kapittel 4.4.

For å etablere grenser for når et 3'PDGFRB-transkript er forhøyet, ble verdiene i NB og n-BM normalisert med ABL1 og GUSB. Øvre referanseverdi ble definert som  $m + 3 \text{ sd}$ , se tabell 7.

Forholdet mellom 3'PDGFRB og 5'PDGFRB ble også undersøkt. I NB var median 5'PDGFRB verdi 206 (variasjonsbredde 18-470,  $n=19$ ) og 174 (variasjonsbredde 33-284,  $n=7$ ) i n-BM. I NB var median 3'PDGFRB verdi 478 (variasjonsbredde 74-1015) og 315 (variasjonsbredde 78-487) i n-BM. Median forhold mellom 3'PDGFRB/5'PDGFRB var 2,0 i NB (variasjonsbredde 1,2-2,6, 99 persentil 2,6) og 1,5 i n-BM (variasjonsbredde 1,0-2,3, 99 persentil 2,3)



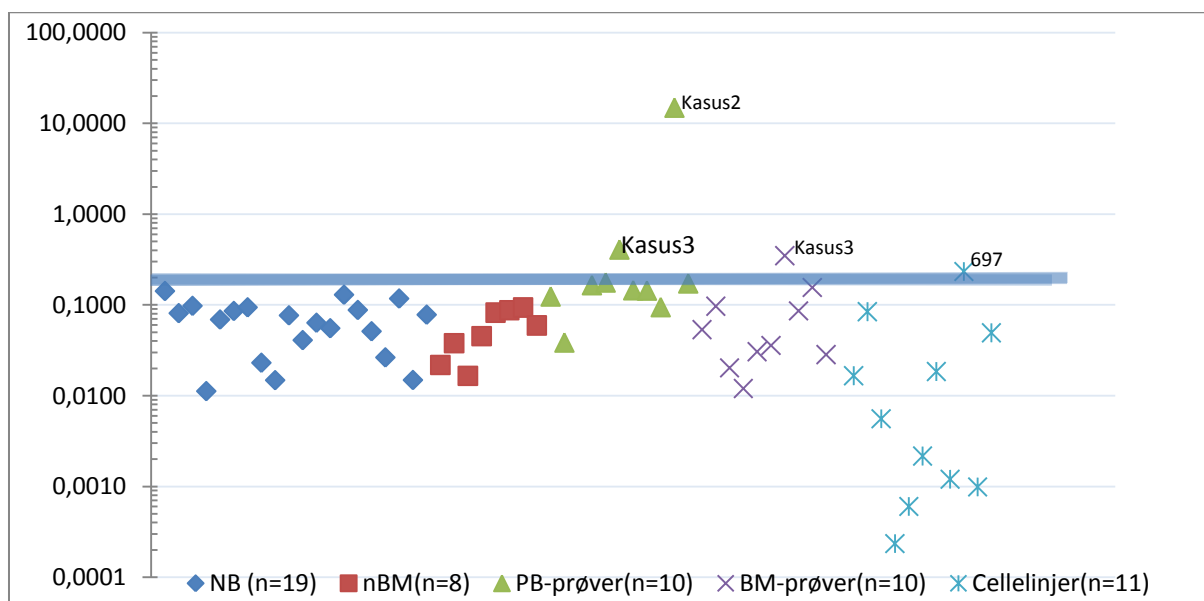
	m	s	media n	omfang	n	99%	Øvre ref.	95% KI- intervall
<b>3'PDGFRB/ABL1</b> NB	0,06	0,038	0,07	0,01-0,15	20	0,20	0,18	0,155-0,211
<b>3'PDGFRB/ABL1</b> n-BM	0,05	0,031	0,04	0,02-0,09	8	0,09	0,14	0,118-0,170
<b>3'PDGFRB/GUSB</b> NB	0,01	0,007	0,013	0,004-0,03	20	0,03	0,03	0,029-0,035
<b>3'PDGFRB/GUSB</b> n-BM	0,01	0,006	0,013	0,003-0,02	8	0,02	0,03	0,027-0,038

**Tabell 7:** normaliserte 3'PDGFRB verdier mot ABL1 og GUSB i NB og n-BM.

Det var ingen forskjell mellom normalisert nivå i blod og benmarg, med nivået er nesten 6 ganger høyere dersom de er normalisert med ABL1 sammenlignet med GUSB.

Både 3'PDGFRB og 5'PDGFRB var lineære over 6 log, fra 10 til 10<sup>6</sup> kopier. Effektivitet var 1,94 og begge hadde en korrelasjonskoeffisient > 0,99. Innen serievariasjon for 3'PDGFRB var 10 %. Mellom serievariasjon for 3'PDGFRB var 11 % testet i øvre nivå av normale prøver (1000 kopier).

Totalt 20 blod eller benmargsprøver fra 12 pasienter ble analysert med RT-qPCR for 3'PDGFRA, GUS, ABL1 og 5'PDGFRB. Normaliserte verdier 3'PDGFRB/ABL1 i benmarg (n=10) varierte fra 0,01-0,35 (≤0,14) og i blod (n=10) lå verdiene mellom 0,04 -14,9 (≤0,18), se figur 12. Prøver fra to pasienter lå over øvre referanseverdi, dette gjaldt kasus 2 og 3. Totalt 11 cellelinjer ble også analysert, se vedlegg. Normaliserte verdier for 3'PDGFRB/ABL1 lå mellom 7x10<sup>-5</sup> til 0,23 (m+3sd =0,24). En cellelinje var lett forhøyet, se figur 12.



**Figur 12:** y-aksen; 3'PDGFRB normalisert med ABL1, logaritmisk skala. Den horisontale linjen tilsvarer øvre referanseområde for blod.

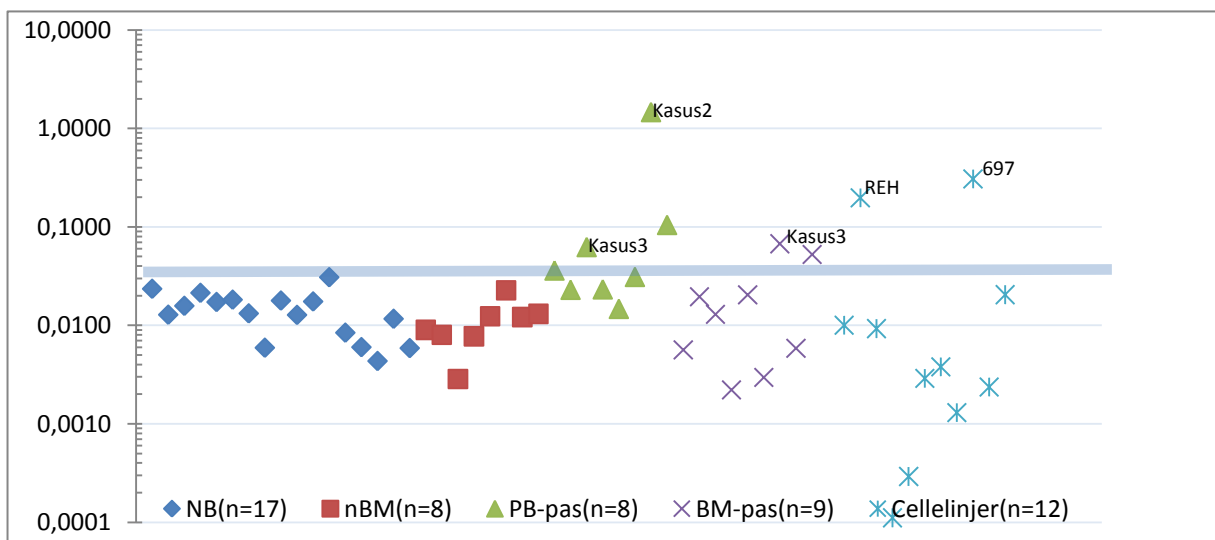
Kasus 2. En 58 år gammel mann som har fått diagnosen myeloid neoplasi med t(5;12)(q33;13). Ved en rutinekontroll fikk pasienten påvist leukocytose ( $45 \times 10^9/l$ ) og nærmere undersøkelser med tanke på myeloproliferativ neoplasi ble utført. I en benmargsbiopsi ble det påvist myeloid hyperplasi med en venstreforskjøvet granulopoiese med en lav grad av eosinofili, og uten påfallende endringer i erytropoiesen og trombopoiesen. Blodprøver ble sendt til cytogenetisk og molekylærgenetisk utredning. Mutasjonsanalyse av JAK2 (p.Val617Phe) og KIT (p.Asp816Val) samt analyse for BCR-ABL1-fusjonsgentranskript var alle negative. Karyotyping påviste t(5;12)(q33;13). Dette kan stemme med *ETV6-PDGFRB*-fusjonsgen som er beskrevet hos pasienter med kronisk myelomonocytær leukemi assosiert med eosinofili. Pasienten behandles med imatinib. Diagnostisk blodprøve ble kvantifisert, 3'PDGFRB/ABL1= 14,9 ( $\leq 0,18$ ) og 3'PDGFRB/5'PDGFRB=443. Blod og benmargsprøver tatt 12 og 15 måneder etter behandlingsoppstart er innenfor normalområdet.

For å undersøke sensitiviteten til PDGFRB-analysen ble både cDNA og RNA fra diagnostisk prøve (kasus 2) fortynnet ned til 0,1 % i tilsvarende materiale fra NB10. Resultatet var positivt ved 1 % prøve hvor 3'PDGFRB/ABL1=0,34-0,36 ( $\leq 0,18$ ). Også 3'PDGFRB/5'PDGFRB var lett forhøyet 2,6-6,7 ( $\leq 2,6$ ). Laveste fortytning 0,1 % var også svakt positiv for 3'PDGFRB/ABL1=0,29, men ikke 3'PDGFRB/5'PDGFRB.

Kasus 3: En 59 år gammel mann med eosinofili og mild nøytrofili, samtidig trombopeni. Blodprøver ble sendt til cytogenetisk og molekylærgenetisk utredning. Mutasjonsanalyse av JAK2 (p.Val617Phe) og KIT (p.Asp816Val) samt analyse for BCR-ABL1-fusjonsgentranskript var alle negative. Cytogenetisk undersøkelse påviste ingen kromosomale forandringer. Rekvirenten ønsket i tillegg analyser for screening *PDGFRA* eller *PDGFRB*-genrearrangering. Prøver ble sendt ved 2 anledninger, og både i blod og benmarg var 3'PDGFRB verdier 2x forhøyet sammenlignet med friske givere, samtidig var ikke 3'PDGFRB/5'PDGFRB forhøyet. Prøvene ble svart ut med lett forhøyede *PDGFRB*-transkripter av usikker årsak og uten sikre holdepunkter for en translokasjon av *PDGFRB*-genet. Morfologisk undersøkelse av benmargsbiopsi

viste en hypercellulær marg med hyperplasi både av megakaryocytoide og myeloide rekke. Megakaryocytene var dysplastiske og myelopoiesen var venstreforskjøvet, men det var god modning. Morfologisk diagnose var MPN/MDS. Behandling med imatinib er igangsatt, men det er for tidlig å si noe om respons.

Normalisert 3'PDGFRB-transkriptnivå varierte avhengig om det ble normalisert med ABL1 eller GUSB. Når 3'PDGFRB-transkript ble normalisert med GUSB var resultatet noe mer spredt enn ved normalisering med ABL1, dette gjaldt både i cellelinjer og i pasientprøvene, se figur 13. Normalisert nivå i benmargsprøvene (n=9) varierte mellom 0,002-0,07 ( $\leq 0,03$ ) og i blodprøvene (n=8) mellom 0,01-1,5 ( $\leq 0,03$ ). I tillegg til kasus 2 og 3 var det ytterligere 2 pasienter med lett forhøyede verdier dersom de ble normalisert med GUSB. Når resultatet fra de 11 cellelinjene ble normalisert med GUSB var resultatene også mer spredt enn ved normalisering med ABL1. To cellelinjer var betydelig forhøyet sammenlignet med normalmaterialet, dette var REH og 697 som begge er ALL cellelinjer. REH har en kompleks karyotype hvor blant annet 5q31-32 er translokert, men verken for REH eller for 697 er det opplyst om avvik i PDGFRB-genet.

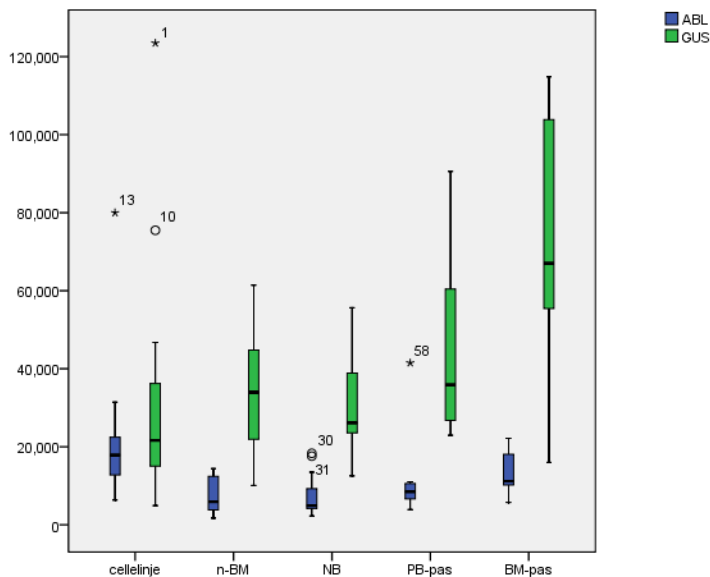


**Figur 13:** y-aksen; 3'PDGFRB normalisert med GUSB, logaritmisk skala. Den horisontale linjen tilsvarer øvre referanseområde for blod og benmarg.

*GUSB*- og *ABL1*-transkriptnivå i de ulike materialene ble derfor sammenlignet. Det er en sterk positiv korrelasjon mellom de to referansegenene både i NB og n-BM

(Spearman's korrelasjonskoeffisient  $\rho$  0,66,  $n=19$ ,  $p<0,01$  i NB og  $\rho$  0,79,  $n=8$ ,  $p<0,05$  i n-BM).

I pasientmaterialet var det en svak positiv korrelasjon mellom de to referansegenene ( $\rho$  0,22,  $n=16$ ,  $p=0,38$ ). Og i cellelinjene var det ingen sammenheng i transkriptnivå mellom *GUSB* og *ABL1* ( $\rho$  0,07,  $n=11$ ,  $p=0,832$ ).



Figur 14: BoksploTT over antall *ABL1*- og *GUSB*-transkripter i de ulike materialene testet.

Mann-Whitney U test påviste ingen signifikant forskjell i *ABL1*-transkriptnivå mellom normalblod (median 4905,  $n=20$ ) og normalbenmarg (median 5898,  $n=8$ ),  $U=76$ ,  $z=-0,203$ ,  $p=0,862$ . Testen avslørte heller ingen signifikant forskjell mellom nivået i blodprøver (median 8483,  $n=8$ ) og normalblod,  $U=53$ ,  $z=-1,373$ ,  $p=0,182$ . Det var heller ingen forskjell mellom benmargsprøver (median 11191,  $n=10$ ) og normalbenmarg,  $U=21$ ,  $z=-1,688$ ,  $p=0,101$ .

Det ble ikke påvist signifikant forskjell mellom antall *GUSB*-transkripter i NB (median 26154,  $n=19$ ) og n-BM (median 33962,  $n=8$ ),  $U=70$ ,  $z=-0,319$ ,  $p=0,775$ , og ikke mellom blodprøver (median 35906,  $n=8$ ) og normalblod,  $U=44$ ,  $z=-1,699$ ;  $p=0,095$ . Derimot var det signifikant forskjell mellom median *GUSB*-transkripter i benmargsprøver (median 67013,  $n=9$ ) og i normalbenmarg,  $U=13$ ,  $z=-2,21$ ,  $p=0,027$ ,  $r=0,54$ .

Selv om tallmaterialet her er lite, tyder resultatene våre på at *GUSB* ikke var like godt egnet som referansegen som *ABL1* til normalisering av *PDGFRA*- og *PDGFRB*-genuttrykk. Det ble derfor besluttet at kun *ABL1* skulle benyttes.

## 5 Diskusjon

Myeloide og lymfoide neoplasier med eosinofili assosiert med *PDGFRA*- eller *PDGFRB*-genrearrangeringer er sjeldne sykdommer. Selv om de første studiene påviste *FIP1L1-PDGFRA* hos mer enn 50 % av pasienter med HES, har senere studier kun påvist genfusjonen hos 3-20 % av pasientene [21, 26, 33, 61-62]. Årlig innsidens av HES ligger trolig et sted mellom 0,5 til 1 per 100 000 innbyggere [63]. Dersom disse tallene overføres til den norske populasjonen på 4,9 millioner, vil det være mellom 1 til 10 personer som rammes hvert år av en neoplasie med *FIP1L1-PDGFRA*-genfusjon. Kromosomale translokasjoner av *PDGFRA* eller *PDGFRB* er enda sjeldnere enn *FIP1L1-PDGFRA*-genfusjon.

Men til tross for at dette er sjeldne tilstander er det viktig å påvise *FIP1L1-PDGFRA*, *PDGFRA* og *PDGFRB*-translokasjoner, siden pasienter med avvik i disse genene responderer utmerket på imatinib-behandling [33].

### 5.1 *FIP1L1-PDGFRA*

For å redusere antall falske negative *FIP1L1-PDGFRA* analyseresultater anbefales det i litteraturen at både en FISH- og en RT-PCR- metode benyttes parallelt [33]. Dette skyldes at autofluorescens fra modne eosinofile granulocytter, kan redusere sensitiviteten ved FISH-analysen [26, 31]. Også ved RT-PCR er det beskrevet falske negative resultater [50]. Dette kan skyldes lavt nivå fusjonsgentranskriper, alternativ spleising og RNA-degradering, men kanskje også valg av primere. Score og medarbeidere påviste *FIP1L1-PDGFRA*-genrearrangeringen i DNA ved bruk av PCR for lange amplikon [50]. De påviste genfusjonen i prøver som tidligere kun var positive etter nested RT-PCR, men også i 2 prøver som tidligere var negative både ved nested RT-PCR og FISH [50].

Vi har valgt å etablere to ulike metoder for påvisning av *FIP1L1-PDGFRA*-genrearrangering, den ene i DNA og den andre i RNA. Det var ingen forskjell i sensitivitet mellom de to testene, men kun to positive prøver er hittil testet.

Det er fordeler og ulemper ved begge testene. Vår test for påvisning av *FIP1L1-PDGFRA* i RNA tar kort tid å utføre og kan detektere 1 mutert celle blant 1000 normale celler. Testen ble designet med tanke på at produktene som dannes skal være kortest mulig. Dette lot seg gjøre for de aller fleste beskrevne brudd og fusjonsgentranskript hvor det dannes produkter  $\leq 200$  bp. Unntaket er dersom det

skjer et brudd i intron 9 eller intron 16, samtidig som det dannes type A fusjonsgentranskript, se figur 5. Da vil et produkt bli inntil 413 bp langt. Selv om real-time PCR med hydrolyseprober kan detektere amplicon i denne størrelsen, vil dette kunne påvirke nedre deteksjonsgrense noe. Men brudd i intron 9 og 16 er sjeldent [27].

Både primere i ekson 1 og ekson 4 ble også inkludert selv om brudd oppstrøms for intron 9 ikke er beskrevet. Dette skyldes at transformasjonsforsøk har vist at kun de første 29 aminosyrene av *FIP1L1* ekson 1 er tilstrekkelig for aktivering av *PDGFRA*-kinasedomenet [26]. Dersom det skulle skje brudd nedstrøms for de brudd som hittil er beskrevet, kan testen også teoretisk detektere disse med unntak av et brudd i siste intron (*FIP1L1*-intron 18). Både kasus 1 med brudd i intron 13 og EOL-1 med brudd i intron 11 ga sterke positive resultat, dette beviser at testen fungerer for to av de mest hyppige bruddpunktene i *FIP1L1*. I tillegg fungerte alle primerne ved testing hver for seg, men det har ikke vært mulig å teste ekson-16 primer grunnet mangel på positiv kontroll.

Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A i DNA derimot krever litt høyere prosentandel muterte celler (5 %). Siden det enkelte ganger dannes uspesifikke produkter kreves det også noe erfaring for å tolke resultatet. Metoden er sensibel og påvirkes lett av små variasjoner i DNA-konsentrasjon og pipettering. Men også minimale temperaturforskjeller mellom ulike PCR-instrument av samme fabrikat, kan påvirke analysen. Et område i *FIP1L1*-intron 10 mangler dessuten en primer. Et brudd her kan føre til at et produkt kan bli mellom 5000 til 12 000 bp. Amplifisering i dette størrelsesområdet krever mer enn 10 % muterte celler og kanskje oppimot 100 %. Siden brudd i intron 10 er forholdsvis hyppig, øker dette faren for falske negative resultat. Men i motsetning til RNA-analysen, er denne analysen opprinnelig validert i et større pasientmateriale [50].

Nedre deteksjonsgrense varierte mellom 1- 5 % muterte celler avhengig av lengden på produktet, henholdsvis 400 og 5000 bp. Dette er i samsvar med publiserte resultater der pasienter med 3 % tumor testet positivt [50]. Både for kasus 1 og EOL-1 ble testen positiv i alle tre primermiksene og produkter på 13 kb lot seg amplifisere. Dette er 4,5 kb lenger enn det lengste produktet som Score og medarbeidere påviste [50].

Score og medarbeidere rapporterte også om en bedre sensitivitet ved bruk av DNA-analysen enn de fant ved bruk av en RT-PCR metode, men vår RT-qPCR er ikke sammenlignbar med deres test i RNA. De benyttet primere lagt i FIP1L1- ekson 7 og PDGFRA- ekson 13, og produktet ble analysert med gelelektroforese [50]. Dette primersettet vil gi lange produkter uansett hvor bruddene har skjedd, de lengste kan bli over 1200 bp. Vår RT-qPCR er designet slik at produktene er mindre, samtidig som deteksjonsmetoden er mer sensitiv. Men kun 2 positive prøver er hittil testet, derfor er det for tidlig å si noe om sensitiviteten til analysen.

Siden RT-qPCR-testen både er enkel, hurtig å utføre og kan detektere lavt nivå fusjonsgentranskript, bør den derfor benyttes som første analyse ved utredning av eosinofili og mistanke om myeloid og lymfoid neoplasi med avvik i *PDGFRA* eller *PDGFRB*. Dersom denne er negativ og andre mulige årsaker utelukkes, bør også analysen i DNA utføres. Disse to testene vil sammen kunne bidra til å øke sjansen for å påvise genrearrangeringen og følger dermed anbefalinger gjort i litteraturen om at to ulike tester bør utføres [33].

## 5.2 MRD med ASO-qPCR

Sensitive molekylære analyser er viktig for å følge respons eller mangel på respons ved behandling med imatinib. De fleste pasienter responderer godt på lave doser imatinib, men for noen kan det være nødvendig med høyere doser for å opprettholde komplett molekylær respons. Pasientene må trolig stå på imatinib-behandling livet ut siden denne behandlingen alene ikke kan utslette stamcellene som er *FIP1L1-PDGFRB*+ [33]. Det er derfor viktig med molekylære tester for å kvantitere MRD.

Somatiske mutasjoner i *PDGFRA* og påfølgende resistens mot imatinib er hittil beskrevet hos 5 pasienter [33]. Resistens mot imatinib kommer av missens mutasjon p.Thr674Ile som er analog til p.Thr315Ile mutasjonen påvist hos imatinib-resistente *BCR-ABL1*+ KML pasienter [33]. Trolig kan noen av disse respondere på andre tyrosinkinaseinhibitorer [33] og en MRD-analyse kan tidlig identifisere pasienter som ikke lenger responderer på imatinib.

Det ble derfor etablert en ASO-qPCR for måling av MRD i DNA, hvor en fortynningsrekke av diagnostisk materiale benyttes som standard. Til alle analysene inngår en hydrolyseprobe som er identisk med den som benyttes til FIP1L1-PDGFRB RT-qPCR i tillegg til en felles reversprimer. Dermed er det kun nødvendig å designe



spesifikk foroverprimer for hver pasient. Dette er samme fremgangsmåte som benyttes rutinemessig ved kvantitering av MRD hos ALL-pasienter. Nedre deteksjonsgrense ble  $1 \times 10^{-5}$  og kvantitativt område ble  $1 \times 10^{-4}$  både for EOL-1 og kasus 1. Dette er innenfor kravene satt for denne type analyser [49]. Ved å måle MRD i DNA er resultatet et mål på prosent muterte celler i en prøve, siden en diploid celle inneholder 6,2 pg DNA.

Score og medarbeidere beskrev også en allelspesifikk genomisk MRD-analyse hvor resultatet ble normalisert mot *ALB* qPCR. Kalkulering av *FIP1L1-PDGFR*A positivitet ble gjort relativt ved hjelp av  $\Delta$ Ct, median sensitivitet på 1 av 30 000 celler ble oppnådd. De rapporterte også om en 1-2 log bedre sensitivitet sammenlignet med MRD måling i RNA i det samme pasientmateriale [50]. Men beregning av resttumor ved hjelp av  $\Delta$ Ct kan by på problemer siden den krever at både referansegene og den spesifikke analysen har samme effektivitet. Dette kan være vanskelig å få til når det designes spesifikke tester for hver pasient.

Tidligere er RNA MRD analyser beskrevet hvor *FIP1L1*-eksonprimere proksimalt for bruddpunkt til hver pasient ble brukt i en RT-qPCR og hvor 3-5 log reduksjon av transkript kunne detekteres [31, 64]. Men det er mange ulemper å måle MRD i RNA. Siden ulike pasienter har varierende mengde fusjonstranskript ved diagnosetidspunkt, medfører dette at det ikke alltid er mulig å påvises en 3 log reduksjon i forhold til nivået før behandling [64]. Alternativ spleising gjør det også problematisk å designe en test som detekterer alle fusjonstranskriptene tilstede i en prøve. Dersom MRD måles i RNA, er det viktig at laboratorier som tilbyr denne type analyser har standardiserte protokoller. Allikevel er det ofte ikke mulig å sammenlikne resultatene mellom laboratoriene [65]. Derfor anbefales det å benytte samme referansemateriale, samt å benytte en konversjonsfaktor, slik at et individuelt resultat kan sammenliknes med et referanselaboratorium. En slik metode ble benyttet i en internasjonal studie ved kvantitering av *BCR-ABL1*-fusjonstranskript [66]. Selv om det skulle være ønskelig, er en slik fremgangsmåte vanskelig å etablere i sjeldne tilstander som KEL assosiert med *FIP1L1-PDGFR*A.

Et annet problem ved MRD-måling i RNA er at transkriptet alltid må normaliseres med et eller flere referansegene. RNA er en ustabil forbindelse og i gjennomsnitt degraderes 50 % RNA i døgnet in vitro. Men RNA-degradering er ikke et konstant

fenomen men er derimot forskjellig for ulike transkripter, i ulikt materiale og også mellom individer [67]. Dette kan føre til uriktige resultater når MRD måles i RNA og prøvene ikke er prosessert umiddelbart etter prøvetakning eller er tilsatt RNA-stabilisatorer[67].

### 5.3 *PDGFRA* og *PDGFRB*-genuttrykk

Siden ikke alle myeloide og lymfoide neoplasier med avvik i *PDGFR*-reseptorgenene skyldes *FIP1L1-PDGFR*A-genrearrangering, har vi også etablert to ulike metoder for å identifisere pasienter med sjeldne *PDGFRA*- eller *PDGFRB*-genrearrangeringer. Disse metodene baserer seg på at genuttrykket er økt ved en *PDGFRA*- eller *PDGFRB*-genrearrangering [52-53]. Ved den første metoden normaliseres transkriptnivået av kinasedomenet (3'-ende) til *PDGFRA* eller *PDGFRB* med referansegnet *ABL1*. Ved den andre metoden normaliseres kinasedomenet mot transkriptnivået av immunoglobulinomenet (5'-ende) til det respektive gen.

Vi har valgt å kvantifisere både 5'- og 3'-endetranskriptene for å øke spesifisiteten til analysene. Normalisering av 5'-ende vil også være nyttig siden det er vanskelig å etablere et representativt referanseområde ved normalisering med et referansegnet. Problemet med å etablere et slikt referanseområde for denne type analyser er at genuttrykk kan vise intra- og interindividuell variasjon som ikke nødvendigvis kan gjenspeiles i verdier målt hos friske voksne blod og benmargsgivere.

Pasientmaterialet kan komme fra alle aldersgrupper og de kan også ha andre underliggende sykdommer, behandles med ulike medikamenter eller ha ulik livsførsel som igjen kan påvirke genuttrykk [68]. Dessuten har hematologiske stamceller og forstadier ulikt ekspresjonsmønster ved normal hematopoese. Derfor kan ekspresjon av visse gener også variere mellom ulike neoplasier, fordi cellefordeling er forskjøvet. Et genuttrykk kan være unormalt sammenlignet med friske givere, men være normalt uttrykk for den celletypen som dominerer i prøven [68]. Normalverdiene ved normalisering med *ABL1* må derfor benyttes for å luke ut de som ikke har forhøyete verdier. Dersom en finner økt uttrykk bør videre undersøkelser utføres. Er nivået av 5'-ende betydelig lavere enn for 3'-ende kan dette støtte opp om at genet er rearrangert.

For å kvantifisere *PDGFRA* og *PDGFRB*-transkript ble det etablert et plasmid som inneholdt deler både *PDGFRA*-, *PDGFRB*- og referansegnet-transkripter. Bruk av

plasmidstandarder er stabilt og robust sammenlignet med cDNA eller RNA standarder. Dessuten er intakt *PDGFRA* og *PDGFRB*-genuttrykk lavt i normalblod og cellelinjer, og er derfor uegnet som standardmateriale. Ved at både det spesifikke genet og referansegnet kan kvantiteres fra samme standardrekke, vil små fortynningsfeil mellom ulike plasmidkonstrukt og fortynningsrekker elimineres. Det er også både enkelt og billig kun å benytte en plasmidrekke til kvantitering.

Normaliserte 3'*PDGFRA*/*ABL1*-verdier i normalblod kan sammenlignes med arbeidet til Erben og medarbeidere som hadde lagt foroverprimeren i det samme området som vår test, dermed unngikk også de å amplifisere trunkerte transkript [53]. Normalisert 3'*PDGFRA*/*ABL1* lå mellom 0,0001-0,0013 sammenlignet med deres resultater som lå mellom 0-0,0027. I normalbenmarg er nivået høyere enn i blod (0,002-0,04), Erben og medarbeidere testet ikke bm. Med unntak av kasus 1 og EOL-1 ble det ikke påvist forhøyede verdier verken i pasientmaterialet eller i cellelinjer.

Denne analysemetoden kan brukes til screening for påvisning av alle *PDGFRA*-genfusjoner, både til *FIP1L1* men også til andre mer sjeldne partnergen. Siden bruddene i *PDGFRA* skjer i det samme området uansett hvilke partnergen som er involvert.

Normaliserte *PDGFRB*-kinasedomenetranskripter (3'*PDGFRB*/*ABL1*) lå mellom 0,01-0,22 både i normalblod og normalbenmarg. Erben og medarbeidere fant derimot verdier mellom 0,97-22,2 [53]. Årsaken til forskjellene kan være ulike primersett og litt forskjellige amplicon. Erben og medarbeidere bruker dessuten 2 forskjellige plasmidstandarder, en for kvantitering av *PDGFRB*- og en for *ABL1*-transkripter. Dette kan ha resultert i små fortynningsvariasjoner som igjen kunne ha påvirket kvantiteringen. *PDGFRB* har ingen kjente spleisevarianter som kan forklare forskjellene. Det er derfor viktig at det etableres egne grenseverdier.

Av de 16 andre pasientene som ble testet var det i tillegg en pasient med lett forhøyet 3'*PDGFRB*/*ABL1* nivå (2x), men ingen økning i forholdet mellom 3'*PDGFRB*/5'*PDGFRB*. Erben og medarbeidere fant forhøyet 3'*PDGFRB*/*ABL1*-nivå hos 6,2 % (12 pasienter) hvor ingen genetiske avvik ble identifisert som kunne forklare dette [53]. De forhøyete verdiene var lett til moderat forhøyet, og lå mellom

23-102 sammenlignet med verdier i normalblod som lå mellom 0,97-22,2. En endring av den normale cellebalansen vil kunne påvirke *PDGFRB*-genuttrykk. *PDGFRB* er uttrykt både i myeloide og erytroide precursorceller i benmarg, og i modne monocytter og megakaryocytter [69]. *PDGFRB* er også påvist i T- og B-lymfocytter [19]. Siden *PDGFRB* normalt uttrykkes i flere hematopoetiske celler, bør lett forhøyede *PDGFRB*-transkripter tolkes med forsiktighet, dersom det samtidig er et normalt forhold mellom kinase- og immunoglobulinomemene transkripter. Ved analyse av imatinib responderende cellelinjen Kasumi-3 hvor *PDGFRA*-genet er duplisert, var 3'*PDGFRA*/ABL1 mer enn 100x forhøyet sammenlignet med normale kontroller.

Analyse av *PDGFRA* og *PDGFRB*-genuttrykk er en god screeningsmetode for å detektere *PDGFRA* eller *PDGFRB*-genrearrangeringer. Siden vi har kun ett kasus hver for disse rearrangeringene, kan det ikke antydes sensitivitet og spesifisitet til våre analyser. I arbeidet til Erben og medarbeidere hvor det var inkludert 58 pasienter med kjent genrearrangering og 191 pasienter uten kjent genrearrangering, var sensitiviteten 100 % og spesifisiteten 88 % for *PDGFRA* og 94 % for *PDGFRB* [53].

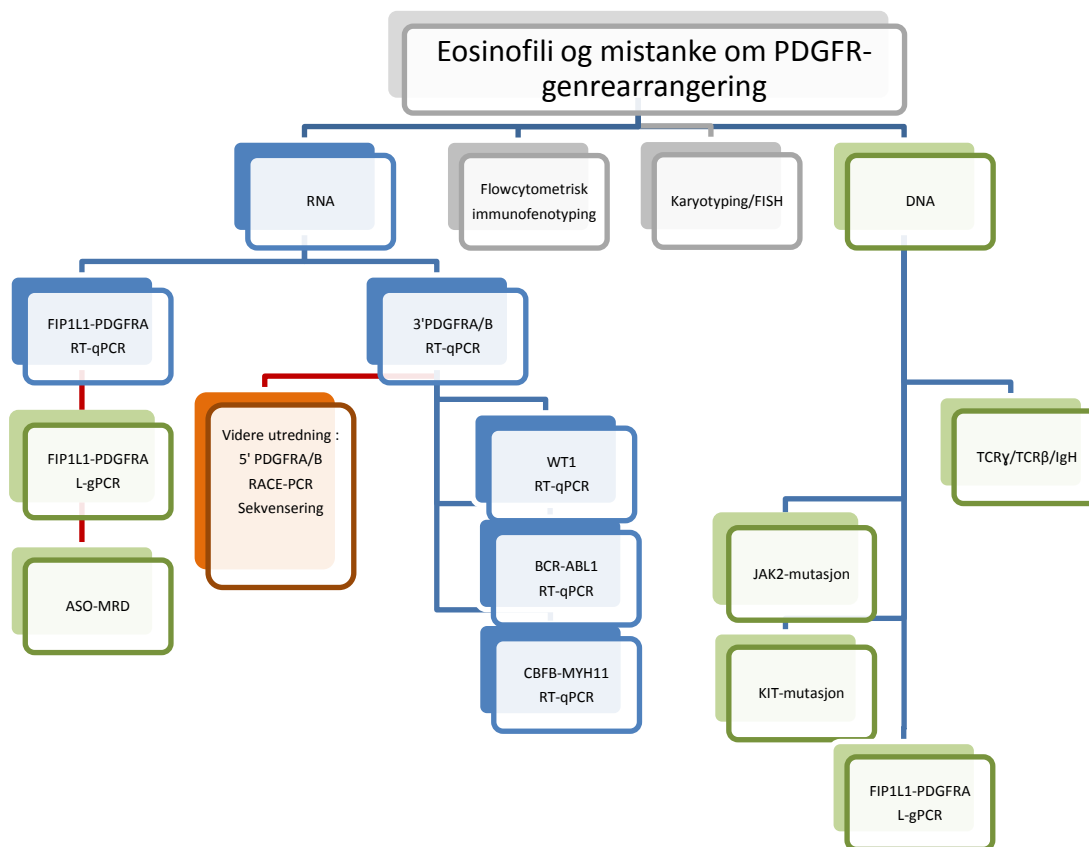
Det er viktig å analysere både 3'-ende *PDGFRA/B* normalisert mot 5'-ende *PDGFRA/B*, i tillegg til 3'-ende *PDGFRA/B* normalisert med ABL1. Dette gir sannsynlig en økt spesifisitet av vår analysen selv om antall pasienter inkludert i vår studie er for lavt til endelig evaluering.

Kvantitering av *PDGFRA* og *PDGFRB*-transkript kan også være en nyttig test for å følge behandlingsrespons, dersom det ikke lages en bedre ASO-test for kvantitering av MRD. Både 3'*PDGFRA* og 3'*PDGFRB* kan detektere lave nivåer muterte celler sammenlignet med andre metoder som FISH og karyotyping. Ved fortynningsforsøk har testene vært positive ned til 1 %, og sannsynlig også lavere siden prosentandel tumor ikke er kjent for pasientmaterialet. Både for kasus 1 og 2 kan det være mulig å detektere 2-3 log reduksjon i transkriptnivå. Men dersom det også tas hensyn til forskjellen mellom 3'-ende og 5'-ende kan det for kasus 1 (benmarg) teoretisk påvises > 3 log reduksjon i transkripter før nivået er innen det normale (3'*PDGFRA*/5'*PDGFRA*=2628) og for kasus 2 (blod) kan det påvises > 2 log reduksjon målt i blod (3'*PDGFRB*/5'*PDGFRB*=443).

#### 5.4 Utredning ved eosinofili

Påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A ved RT-qPCR og kvantitering av *PDGFR*A og *PDGFR*B-transkripter er viktige analyser ved utredning av pasienter med eosinofili. Se figur 15 for en oversikt over aktuelle analyser ved eosinofili og en mulig algoritme ved mistanke om neoplasi.

Dersom det ikke er morfologiske eller immunofenotypiske funn som tyder på annen neoplasi, bør først analyser for påvisning av *FIP1L1-PDGFR*A-genrearrangering og *PDGFR*A- eller *PDGFR*B-translokasjoner utføres. Dersom disse er negative bør andre molekylære mutasjonsanalyser utføres som er aktuelle ved en eosinofili, som *BCR-ABL1* ved KML og *CBFB-MYH11* ved AML [24]. *KIT*-mutasjonsanalyse bør utføres dersom det også påvises infiltrerende mastceller [58]. I tillegg bør *JAK2*-mutasjonsanalyse utføres fordi *JAK2*+ MPN med eosinofili kan forekomme [24]. Eosinofili kan oppstå sekundært til lymfoide neoplasier oftest i T-celle neoplasier fordi T-celler produserer eosinofile vekstfaktorer som IL-3, IL-5 og granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor [21]. Derfor bør PCR for *TCR* $\gamma$  og *TCR* $\beta$ -genrearrangering utføres for å påvise/utelukke en monoklonal T-celle populasjon [24]. Forhøyet *WT1*-genekspresjon har vist seg også nyttig til å skille de klonale fra reaktive årsaker [70]. Dessuten har påvisning av monoklonal *IgH*-genrearrangering tidlig identifisert pediatriske pasienter med HES som transformerte til en B-celle neoplasi [55]. Derfor kan det også være nyttig å inkludere B-cellemarkører for utredning av pasienter med eosinofili, siden en slik transformasjon er beskrevet både hos voksne og barn med HES [55].



**Figur 15:** Analysealgoritme ved utredning av eosinofili. Blå ruter er RNA-baserte analyser og grønne DNA-baserte analyser. Blå linjer viser videre analysering dersom analysene er negative, røde linjer er videre analysering dersom analysene er positive. Dersom det er mulig utføres først flowcytometri for å begrense analysene og kun gjøre de som er aktuelle. Ellers utføres analysene etter planen. Som primærskanning bør FIP1L1-PDGFR RT-qPCR og kvantitering av 3'PDGFRB utføres. Dersom disse er negative bør også 3'PDGFR utføres. WT1-geneekspressjon kan være aktuelle analyser i RNA for å påvise/utelukke en mulig neoplasi. BCR-ABL1 og CBFB-MYH11 benyttes til å utelukke hhv. KML og AML. TCR $\gamma$ -, TCR $\beta$ -, IgH-genrearrangering, JAK2- og KIT- mutasjonsanalyse analyseres i DNA. Hvilke av disse som er mest aktuelle bør vurderes ut fra kliniske opplysninger, morfologi og/eller flowcytometri. Dersom det er stor mistanke til KEL bør også FIP1L1-PDGFR L-gPCR utføres, siden denne metoden opprinnelig er validert i et stort materiale. Hvis det påvises forhøyede nivåer av 3'PDGFR eller 3'PDGFRB bør respektiv 5'PDGFR-analyse utføres. For å identifisere et partnergen kan RACE-PCR (rapid amplification of 5' cDNA-ends) gjøres og ved sekvensering kan enkeltbasemutasjoner påvises.

*FIP1L1-PDFRA* bør også utelukkes hos pasienter som er diagnostisert med KIT-negativ systemisk mastocytose, leukemi eller lymfom hvor det samtidig er et forhøyet nivå av eosinofile granulocytter. Dette skyldes at *FIP1L1-PDGFR* er påvist både

hos SM, hos ulike undergrupper av AML og hos pasienter med lymfoblastisk T-celle non-Hodgkins lymfom [33]. Det er dessuten anbefalt at pasienter som får påvist en 5q33 translokasjon bør utredes videre med FISH eller RT-PCR for å bekrefte at *PDGFRB* er involvert [22]. Screeningstestene vil være godt egnet til utredning av disse pasientgruppene.

## 6 Videre arbeid

I første omgang ble det valgt å etablere analyser for påvisning av *PDGFRA* og *PDGFRB*-genrearrangeringer fordi disse pasienter behandles effektivt med tyrosinkinasehemmere. På sikt kan det også være nødvendig å etablere hurtige og sensitive analyser for påvisning av *FGFR1*-translokasjoner, dersom det utvikles målrettet terapi også for denne pasientgruppen. Men per dags dato er det tilstrekkelig med karyotyping for å identifisere disse.

Det er viktig at diagnostiske laboratorier kontinuerlig utvider analyserepertoaret slik at nye genetiske funn som har prognostisk, diagnostisk og/eller terapeutisk betydning kan påvises, slik at pasienter skal få den mest optimale behandling og oppfølging som til en hver tid tilbys.

## 7 Oppsummering

Det ble etablert analyser for påvisning av *FIP1L1-PDGFRB*-genrearrangering, i tillegg til analyser for kvantitering av minimal restsykdom. Det viste seg også at kvantitering av *PDGFRA* og *PDGFRB*-transkripter var både hurtige og sensitive screeningmetoder for å påvise pasienter med et forhøyet nivå slik at disse kan utredes ytterligere. Disse testene er sammen med andre analyser et viktig bidrag for at pasienter med eosinofili kan klassifiseres i tråd med WHO's anbefalinger.

## 8 Litteraturliste

1. Krefregisteret, *Cancer in Norway 2008 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. 2009.
2. *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed, ed. S.H. Swerdlow, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. 2008.
3. Fey, M.F., *Normal and malignant hematopoiesis*. *Ann Oncol*, 2007. **18 Suppl 1**: p. i9-i13.
4. Chao, M.P., J. Seita, and I.L. Weissman, *Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008. **73**: p. 439-49.
5. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 631-44.
6. Weissman, I.L., D.J. Anderson, and F. Gage, *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 387-403.
7. Passegué, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(Suppl 1): p. 11842-11849.
8. Cammenga, J., *Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML*. *Leukemia*, 2005. **19**(10): p. 1719-28.
9. Dick, J.E., *Stem cell concepts renew cancer research*. *Blood*, 2008. **112**(13): p. 4793-807.
10. Cross, N.C. and A. Reiter, *Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases*. *Leukemia*, 2002. **16**(7): p. 1207-12.
11. Gilliland, D.G., *Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy*. *Semin Hematol*, 2002. **39**(4 Suppl 3): p. 6-11.
12. Calabretta, B. and D. Perrotti, *The biology of CML blast crisis*. *Blood*, 2004. **103**(11): p. 4010-22.
13. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(2): p. 105-17.
14. De Keersmaecker, K. and J. Cools, *Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale*. *Leukemia*, 2006. **20**(2): p. 200-5.
15. Hubbard, S.R., *Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(6): p. 464-71.
16. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(2): p. 172-87.
17. Reiter, A., C. Walz, and N.C. Cross, *Tyrosine kinases as therapeutic targets in BCR-ABL negative chronic myeloproliferative disorders*. *Curr Drug Targets*, 2007. **8**(2): p. 205-16.
18. Jones, A.V. and N.C. Cross, *Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(23): p. 2912-23.
19. Reilly, J.T., *Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis*. *Br J Haematol*, 2002. **116**(4): p. 744-57.
20. Hart, C.E. and D.F. Bowen-Pope, *Platelet-derived growth factor receptor: current views of the two-subunit model*. *J Invest Dermatol*, 1990. **94**(6 Suppl): p. 53S-57S.
21. Cross, N.C. and A. Reiter, *Fibroblast growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders*. *Acta Haematol*, 2008. **119**(4): p. 199-206.
22. Tefferi, A., J. Gotlib, and A. Pardanani, *Hypereosinophilic syndrome and clonal eosinophilia: point-of-care diagnostic algorithm and treatment update*. *Mayo Clin Proc*, 2010. **85**(2): p. 158-64.
23. Tefferi, A., M.M. Patnaik, and A. Pardanani, *Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic*. *Br J Haematol*, 2006. **133**(5): p. 468-92.



24. Valent, P., *Pathogenesis, classification, and therapy of eosinophilia and eosinophil disorders*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 157-65.
25. Fletcher, S. and B. Bain, *Eosinophilic leukaemia*. Br Med Bull, 2007. **81-82**: p. 115-27.
26. Cools, J., et al., *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(13): p. 1201-14.
27. Walz, C., et al., *The molecular anatomy of the FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fusion gene*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 271-8.
28. Lambert, F., et al., *A case of FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic eosinophilic leukemia with a rare FIP1L1 breakpoint*. J Mol Diagn, 2007. **9**(3): p. 414-9.
29. Stover, E.H., et al., *Activation of FIP1L1-PDGFR $\alpha$  requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFR $\alpha$  and is FIP1L1-independent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8078-83.
30. Irusta, P.M., et al., *Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38627-34.
31. Vandenberghe, P., et al., *Clinical and molecular features of FIP1L1-PDFGRA (+) chronic eosinophilic leukemias*. Leukemia, 2004. **18**(4): p. 734-42.
32. Loules, G., et al., *FIP1L1-PDGFR $\alpha$  molecular analysis in the differential diagnosis of eosinophilia*. BMC Blood Disord, 2009. **9**: p. 1.
33. Gotlib, J. and J. Cools, *Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR $\alpha$ : what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias*. Leukemia, 2008. **22**(11): p. 1999-2010.
34. Baxter, E.J., et al., *The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(12): p. 1391-7.
35. Walz, C., et al., *Identification of a MYO18A-PDGFRB fusion gene in an eosinophilia-associated atypical myeloproliferative neoplasm with a t(5;17)(q33-34;q11.2)*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(2): p. 179-83.
36. Hidalgo-Curtis, C., et al., *Fusion of PDGFRB to two distinct loci at 3p21 and a third at 12q13 in imatinib-responsive myeloproliferative neoplasms*. Br J Haematol, 2010. **148**(2): p. 268-73.
37. Gorello, P., et al., *A PDGFRB-positive acute myeloid malignancy with a new t(5;12)(q33;p13.3) involving the ERC1 gene*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 216-8.
38. Albano, F., et al., *Extramedullary molecular evidence of the 5'KIAA1509/3'PDGFRB fusion gene in chronic eosinophilic leukemia*. Leuk Res, 2008. **32**(2): p. 347-51.
39. Medves, S., et al., *KANK1, a candidate tumor suppressor gene, is fused to PDGFRB in an imatinib-responsive myeloid neoplasm with severe thrombocytopenia*. Leukemia, 2010. **24**(5): p. 1052-5.
40. Apperley, J.F., et al., *Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta*. N Engl J Med, 2002. **347**(7): p. 481-7.
41. Walz, C., et al., *Characterization of three new imatinib-responsive fusion genes in chronic myeloproliferative disorders generated by disruption of the platelet-derived growth factor receptor beta gene*. Haematologica, 2007. **92**(2): p. 163-9.
42. Gallagher, G., et al., *Fusion of PRKG2 and SPTBN1 to the platelet-derived growth factor receptor beta gene (PDGFRB) in imatinib-responsive atypical myeloproliferative disorders*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **181**(1): p. 46-51.
43. Kulkarni, S., et al., *Fusion of H4/D10S170 to the platelet-derived growth factor receptor beta in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders with a t(5;10)(q33;q21)*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3592-8.
44. David, M., et al., *Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders*. Blood, 2007. **109**(1): p. 61-4.

45. Carroll, M., et al., *The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14845-50.
46. Curtis, C.E., et al., *A novel ETV6-PDGFRB fusion transcript missed by standard screening in a patient with an imatinib responsive chronic myeloproliferative disease*. Leukemia, 2007. **21**(8): p. 1839-41.
47. Golub, T.R., et al., *Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-16.
48. La Starza, R., et al., *A new NDE1/PDGFRB fusion transcript underlying chronic myelomonocytic leukaemia in Noonan Syndrome*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 830-3.
49. van der Velden, V.H., et al., *Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 604-11.
50. Score, J., et al., *Detection and molecular monitoring of FIP1L1-PDGFRalpha-positive disease by analysis of patient-specific genomic DNA fusion junctions*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 332-9.
51. Cools, J., et al., *The FIP1L1-PDGFRalpha kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(1): p. 51-7.
52. Score, J., et al., *Identification of a novel imatinib responsive KIF5B-PDGFRalpha fusion gene following screening for PDGFRalpha overexpression in patients with hypereosinophilia*. Leukemia, 2006. **20**(5): p. 827-32.
53. Erben, P., et al., *Screening for diverse PDGFRalpha or PDGFRB by fusion genes is facilitated by generic quantitative RT-PCR*. Haematologica, 2010: p. haematol.2009.016345.
54. Drexler, H., *Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines, 2nd Edition*. Braunschweig, 2010.
55. Rapanotti, M.C., et al., *Molecular characterization of paediatric idiopathic hypereosinophilia*. Br J Haematol, 2010. **151**(5): p. 440-6.
56. AppliedBiosystems, *Primer Express Software Version 3.0, Getting Started Guide*. 2005: Foster City, USA.
57. Beillard, E., et al., *Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program*. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2474-86.
58. Florian, S., et al., *Systemic mastocytosis (SM) associated with chronic eosinophilic leukemia (SM-CEL): detection of FIP1L1/PDGFRalpha, classification by WHO criteria, and response to therapy with imatinib*. Leuk Res, 2006. **30**(9): p. 1201-5.
59. Erquiaga, I., et al., *Quantification of PDGFRalpha alternative transcripts improves the screening for X-PDGFRalpha fusions by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Leuk Lymphoma, 2010. **51**(9): p. 1720-6.
60. Mosselman, S., et al., *Developmentally regulated expression of two novel platelet-derived growth factor alpha-receptor transcripts in human teratocarcinoma cells*. Cancer Res, 1994. **54**(1): p. 220-225.
61. Klion, A.D., et al., *Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4660-6.
62. Pardnani, A., et al., *FIP1L1-PDGFRalpha in eosinophilic disorders: prevalence in routine clinical practice, long-term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature*. Leuk Res, 2006. **30**(8): p. 965-70.
63. Karnak, D., et al., *Hypereosinophilic syndrome with pulmonary and cardiac involvement in a patient with asthma*. CMAJ, 2003. **168**(2): p. 172-5.

64. Jovanovic, J.V., et al., *Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic eosinophilic leukemia*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4635-40.
65. Muller, M.C., et al., *Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 96-102.
66. Hughes, T., et al., *Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results*. Blood, 2006. **108**(1): p. 28-37.
67. van der Velden, V.H., et al., *Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease--a study within the Europe Against Cancer Program*. Leukemia, 2004. **18**(4): p. 884-6.
68. Lionberger, J.M. and D.L. Stirewalt, *Gene expression changes in normal haematopoietic cells*. Best Pract Res Clin Haematol, 2009. **22**(2): p. 249-69.
69. Steer, E.J. and N.C. Cross, *Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta*. Acta Haematol, 2002. **107**(2): p. 113-22.
70. Cilloni, D., et al., *WT1 transcript amount discriminates secondary or reactive eosinophilia from idiopathic hypereosinophilic syndrome or chronic eosinophilic leukemia*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1442-50.
71. Theophilus, B.D.M. and R. Rapley, in *Methods in Molecular Biology Vol 187 PCR Mutation Detection Protocols*, Humana Press. p. 51-57
72. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
73. Kutuyavin, I.V., et al., *3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 655-61.
74. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
75. *Invitrogen life technologies, Instruction Manual, TOPO XL PCR Cloning Kit*. 2004.
76. La Starza, R., et al., *The hypereosinophilic syndrome: fluorescence in situ hybridization detects the del(4)(q12)-FIP1L1/PDGFR $\alpha$  but not genomic rearrangements of other tyrosine kinases*. Haematologica, 2005. **90**(5): p. 596-601.
77. Qiagen, *QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Purification Handbook*.

## 9 Vedlegg 1

### 9.1 kontroller:

Navn	Diagnose	Molekylære genforandringer	Forhandler
697	null ALL (non-T non-B ALL)	t(1;19)(q23;p13) → <i>TCF3/E2A-PBX1</i> fusion, <i>P53</i> mutation	DSMZ, ACC 42
EOL-1 <sup>⊠</sup>	hypereosinophilic syndrome → eosinophilic leukemia	<i>FIP1L1-PDGFR</i> A fusion gene, <i>MLL</i> PTD	DSMZ, ACC 386
HSB-2	T-ALL	t(1;7)(p34;q35) → <i>LCK-TCRB</i>	DSMZ, ACC 435
K-562	CML	Ph+ t(9;22)(q34;q11) → <i>BCR-ABL1</i> b3-a2 fusion gene, <i>ABL</i> amplification, <i>P15INK4B</i> deletion, <i>P16INK4A</i> deletion, <i>P53</i> mutation	DSMZ, ACC 10
KARPAS-299	histiocytic high-grade lymphoma	t(2;5)(p23;q35) → <i>NPM1-ALK</i> fusion gene, <i>P53</i> mutation	DSMZ, ACC 32
KASUMI-1 <sup>⊠</sup>	AML M2	t(8;21)(q22;q22) → <i>RUNX1/AML1-RUNX1T1/ETO</i> fusion gene	DSMZ, ACC 220
KASUMI-3 <sup>⊠</sup>	AML M0	t(3;7)(q27;q35) → <i>EVI1-TRB</i> genes altered (→ <i>EVI1</i> overexpression), <i>PDGFRA</i> internal tandem duplication	ATCC-CRL-2725
KG-1a <sup>*</sup>	erythroleukemia → AML	<i>NRAS</i> mutation, <i>P15INK4B</i> methylation, <i>P16INK4A</i> methylation, <i>P53</i> mutation, <i>RB1</i> rearrangement	DSMZ, ACC 421
ME-1	AML M4eo	inv(16)(p13q22) → <i>CBFB-MYH11</i> fusion gene	DSMZ, ACC 537
MONO MAC 6	myeloid metaplasia → AML M5	t(9;11)(p22;q23) → <i>MLL-AF9</i> fusion gene	DSMZ, ACC 124
NB-4	AML M3	t(15;17)(q22;q11) → <i>PML-RARA</i> fusion gene ( <i>bcr1-2</i> ), <i>P15INK4B</i> deletion, <i>P16INK4A</i> deletion	DSMZ, ACC 207
REH	ALL	t(12;21)(p13;q22) → <i>ETV6/TEL-RUNX1/AML1</i> fusion	DSMZ, ACC 22
THP-1	AML M5	t(9;11)(p21;q23) → <i>MLL-AF9</i> fusion gene, <i>NRAS</i> mutation, <i>P15INK4B</i> deletion, <i>P16INK4A</i> deletion, <i>P53</i> mutation, <i>RB1</i> rearrangement	DSMZ, ACC 16
TOM-1	ALL	Ph+ t(9;22)(q34;q11) → <i>BCR-ABL1</i> e1-a2 fusion	DSMZ, ACC 578

Tabell over cellelinjene benyttet i forsøkene. Informasjonen er hentet fra [54]. \* Ikke benyttet til 3'PDGFRA-analysering. ⊠ Ikke benyttet til 3'PDGFRB-analysering.

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Braunschweig, Tyskland, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA.

Normalblod, Blodbanken, Ullevål Sykehus, Oslo Universitetssykehus HF

## 9.2 Utstyr:

2720 Thermal Cycler, AppliedBiosystems, Foster City, USA

7900HT Real Time System, AppliedBiosystems, Foster City, USA

Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Biorobot EZ1, Qiagen, Hilden, Tyskland

NanoDrop-spektrofotometer, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA

Visi-Blue Transilluminators, UVP, Upland, USA

## 9.3 Reagens:

10xBlueJuice Gel Loading Buffer, Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, 10816015

10X Buffer/EDTA (Running Buffer, 10x), AppliedBiosystems, Foster City, USA, 402824

10XTBE-buffer, BioRad Laboratories, Hercules, USA, 161-0733

BsiWI, New England Biolabs, Ipswich, England, R0553S

Agilent DNA 1000 KIT, Agilent Technologies, Santa Clara, USA, 5067-1504

Agilent DNA 12000 Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA, 5067-1508

Amplitaq Gold PCR Master Mix (250 U, 5 ml), AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4316753

BamHI, Fementas, St. Leon-Rot, Tyskland, ER0051

Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4337450

BigDye Xterminator Purification Kit, AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4376486

Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg, PAA LABORATORIES GMBH, Pasching, Østerrike. Forhandler: Fisher Scientific, H15-002

ExoSap-IT, GE Healthcare LifeScience, Uppasala, Sverige, US78202

Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostic, Basel, Sveits, 11681834001

EZ-1 DNA Blod 350ul kit(48), EZ-1 DNA Tissue kit(48), Qiagen, Hilden, Tyskland 951054

EZ-1 DNA Tissue kit(48), EZ-1 DNA Tissue kit(48), Qiagen, Hilden, Tyskland 953034

HindIII, New England Biolabs, Ipswich, England, R0104L

10x Neb2-buffer, New England Biolabs, Ipswich, England

Kanamycin Sulphate (100X), liquid, 100 ml (50 µg/ml), Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, 15160-047

LB-medium, Mikrobiologisk Institutt, Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus HF

LB-plater tilsatt 50 µg/ml kanamycin, Mikrobiologisk Institutt, Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus HF

Nuclease-free Water, Qiagen, Hilden, Tyskland, 129117

NuSieve 3-1 Agarose, Lonza, Basel, Sveits, Medprobe, 50094

PCR Nucleotide Mix, Roche Diagnostic, Basel, Sveits, 11814362001

POP-7 Polymer for 3730/3730XL DNA analysers, 1x28ml, AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4363929

Primere: TIB-MOLBIOL, Berlin, Tyskland

QIAGEN Plasmid Mini Kit (25), , Qiagen, Hilden, Tyskland, 12123

QIAquick Gel Extraction Kit (50), Qiagen, Hilden, Tyskland, 28704

QIAquick PCR Purification Kit (50), Qiagen, Hilden, Tyskland, 28104

RBC Lysis Solution, Qiagen, Hilden, Tyskland, 158904

RNeasy Mini Kit (250), Qiagen, Hilden, Tyskland, 74106

SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit, Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, 11754-250

SYBR® Safe DNA gel stain , Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, S33102

T4 DNA ligase, 400,000 cohesive end units/ml, New England Biolabs, Ipswich, England, M0202S

TaqMan MGB Probe: AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4316034

TaqMan Universal PCR Master Mix, AppliedBiosystems, Foster City, USA, 4305719

TE-buffer, Millipore, Billerica, USA, 20-157

TOPO® XL PCR Cloning Kit *with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*, Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, K4750-10

6 x TOPO Cloning STOP Solution

F-M13 and R-M13 primers

One Shot TOP10 E.coli chemically competent cells

pCR-XL-TOPO vektor

S.O.C-medium

Xho I m. buffer H, Invitrogen LTd, Paisley, Storbritannia, 15231-012

## 10 Vedlegg 2

### 10.1 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

PCR er teknikk som benyttes til å lage mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens. To eller flere (multipleks) korte syntetiske DNA-strenger (primere) som er komplementære til hver sin ende av det området som skal amplifiseres bindes til DNAet. En termostabil DNA-polymerase (Taq-polymerase) vil kopiere opp området mellom de to primerne ved at det dannes fosfodiesterbinding mellom fri 3' hydroxylgruppe fra primer eller voksende kjede og 5' fosfatgruppe til innkomne deoksynukleotider (dNTP) komplementære til templatet. Reaksjonen skjer ved ulike temperaturer som gjentas i flere sykluser. Reaksjonen starter med et denatureringstrinn ved høy temperatur som bryter bindingene som holder dobbeltrådig DNA sammen. Deretter senkes temperaturen slik at primerne kan hybridiseres. Temperaturen økes til omkring 70 grader og polymerasen syntetiserer en ny tråd fra primernes 3'-ende.

Ved amplifisering av lange fragment (L-PCR) som er mer enn 1000 baser, må det benyttes litt andre betingelser og enzymlblandinger enn ved tradisjonell PCR. Taq-polymerase mangler 3-5 eksonukleaseaktivitet og har dermed ingen mulighet til å rette opp missinkorporerte baser. Det vil gjennomsnittlig inkorporeres en feil for hver  $2 \times 10^4$  til  $2 \times 10^5$  nukleotid per syklus [71]. Dersom det inkorporeres feil base vil elongeringen stoppe opp og polymerasen falle. Ved amplifisering av lange fragment er en derfor avhengig av å bruke en blanding av vanlig Taq-polymerase som er effektiv og en polymerase som kan korrekturlese (proofreadingenzym) slik at missinkorporerte baser kan byttes ut [71].

### 10.2 Kvantitativ real-time PCR

Ved real-time PCR (qPCR) måles en endring i fluorescens som er proporsjonal med dannelse av produkt. Metoden kan utføres kvantitativt ved at prøver sammenlignes med hverandre og mot en referanseprøve (relativ kvantitering) eller med standarder (absolutt kvantitering).

Real-time PCR kan utføres ved bruk av en hydrolyseprobe. Denne er merket i 5'-enden med et reportertermolekyl som eksiteres av høyenergi lys og i 3'-enden med et molekyl som har noe lavere eksitasjonsspektra (quencher). Når proben er intakt vil det meste av emitert lys fra reporteren absorberes av quencheren siden avstanden



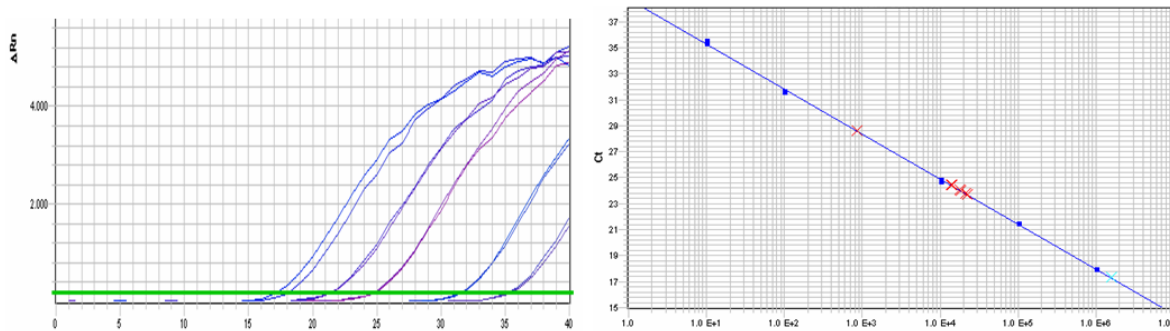
mellom dem er svært kort. Under elongeringstrinnet vil Taq-polymerases 5'-nukleaseaktivitet degraderer proben slik at emitert lys fra reporteren ikke lenger absorberes av quenceren og dette gir en økning i fluorescens som er direkte proporsjonal med dannelsen av produkt [72]. En MGB-probe er en modifisert hydrolyseprobe. Denne har konjungert en minor-groove binding(MGB) molekyl som danner en svært stabil binding til komplementært DNA. MGB bidrar til å øke spesifisiteten og smeltetemperaturen til proben slik at denne kan lages kortere enn den ellers måtte være [73].

En PCR reaksjon kan deles inn i tre faser, den eksponensielle, den linjære og platåfasen (**se figur under**). Det er i den eksponentielle fasen hvor dannelsen av produkt er mest effektiv. Når målt fluorescens i en reaksjon er detekterbart over et definert bakgrunnsnivå, vil prøven få en kvantifiseringssyklusverdi (Cq) som er omvendt proporsjonal med konsentrasjonen [74].

For å kunne kvantifisere ukjente prøver må minimum 3 standarder med helst et spenn på 3 log inngå i hvert oppsett. Det vil være en lineær sammenheng mellom konsentrasjonene og Cq-verdiene. Når  $\log_{10}$  til konsentrasjonene plottes på x-aksen og Cq-verdiene på y-aksen kan regresjonslinjen beregnes (figur nedenfor) og ukjente prøver kunne kvantifiseres. Dersom prøvene ikke inneholder PCR-inhibitorer vil det være tilnærmet lik effektivitet på reaksjonen som hos standardene. Standardkurvens helning (slope) benyttes til å beregne effektiviteten til reaksjonen med formelen:

$$\text{Effektivitet} = [10^{(-1/\text{slope})}] \quad [74]$$

En slope mellom -3,2 og -3,6 indikerer en optimal PCR og dette tilsvarer en effektivitet mellom 1,9-2,1 der 2 (slope -3,33) tilsvarer en fordobling av produkt i hver syklus. Korrelasjonskoeffisienten ( $r^2$ ) beregnes også og denne bør være >0,98 for å ha en reproducerbar qPCR.



**Figur. Til venstre:** Dannelse av PCR produkt, y-aksen viser normalisert fluorescens ( $\Delta R_n$ ), x-aksen antall sykler. I begynnelsen av en PCR vil reaksjonen gå optimalt og ingen reagenser er begrensende og veksten er eksponentiell. Deretter går reaksjonen inn i en lineær fase hvor reaksjonen ikke er like effektiv og tilslutt ender opp i platå-fasen hvor all nysyntetisering har stoppet opp. Fluorescensen i hvert rør normaliseres ved hjelp av en referansefluorefor (ROX) som er tilsatt reaksjonsmiksen og med bakgrunnsfluorescens målt i de 3-15 første syklusene. En terskel (horisontal grønn strek) settes slik at den krysser alle kurvene i eksponentiell fase og i et område der parallelle reaksjoner gir sammenfallende kurver og er over bakgrunnsstøyen. Automatisk settes terskelen 10 sd over bakgrunnsfluorescens, men kan justeres ved behov. Prøvens  $C_q$  er syklusen der amplifiseringskurven krysser terskelen. **Til høyre:** Standardkurve, alle standarder er merket med blått og ukjente med rødt.  $\log_{10}$ -konsentrasjoner av standarder på x-aksen plottes med  $C_q$ -verdi på Y-aksen. Ved minste kvadraters metode kan en rettlinjete strek tegnes mellom punktene. Prøver som faller utenfor øvre og nedre standard (lyseblått-kryss) kan ikke kvantifiseres.

### 10.3 Sekvensering

Dideoxysekvensering med ble gjort med BigDye-kjemi fra AppliedBiosystems og er en modifisering av Sangermetoden. Metoden benytter DNA-polymerasens evne til også å inkorporere 2', 3'-dideoksynukleoside trifosfat (ddNTP) i tillegg til dNTP. 3'enden av hver ddNTP er merket med et fluorescerende fargemolekyl, en farge for hver av de 4 basene. Reaksjonen starter fra en primer og DNA-tråden elongerer helt til en ddNTP inkorporeres. Resultatet er en blanding av produkter som har stoppet opp i 3'enden i varierende lengde fra primeren. Produktene analyseres med kapillærelektroforese på 7900HT Real Time System.

### 10.4 Kloning

Taq DNA polymerase har terminal transferaseaktivitet og tilfører fortrinnsvis en deoxyadenosin(A) i 3' enden av produktet, dette overhengen benyttes ved TA-kloning. Vektoren som benyttes har komplementær 3' deoxytymidin (T) overheng. pCR-XL-TOPO vektor (Invitrogen) er linearisert og med har T-overheng, i tillegg har

vektoren Topoisomerase I bundet til 3'-ende av hver tråd. Topoisomerase I binder og kutter fosfodiesterbindinge etter 5'ccctt sekvens. Energien som frigjøres konserveres ved at det dannes et kovalent bånd mellom Y-274 på Topoisomerase I og 3' forfatgruppe til kuttet vektor. Bindingen brytes ved at 5' hydroxylgruppe til PCR-produktet kobles til fosfatgruppen dermed frigjøres enzymet og reaksjonen reverseres. Ligering foregår derfor uten bruk av ligase. pCR-XL-TOPO vektor inneholder blant annet åpen leseramme (ORF) for ccdB-døds-gen. Dersom denne uttrykkes vil DNA-gyrase inhibiteres og dette enzymet er nødvendig for replikasjon av Escherichia coli (E.coli). Leserammen til ccdB brytes ved ligering av lange produkt. Plasmidet transfekteres til kompetente E.coli ved hjelp av varmesjokk. Vektoren inneholder også ORF for kanamycinresistens og derfor vil kun bakterier transfektert med plasmid overleve i et dyrkningsmedium tilsatt kanamycin [75-76], [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

### **10.5 Rensing av plasmid**

Rensing av plasmid ble gjort med QIAGEN Plasmid Mini Kit . Bakterieløsningen sentrifugeres og supernatanten pipetteres av. Bakteriepelleten resuspenderes i P1-buffer tilsatt RNase A som degraderer RNA. Deretter blandes forsiktig inn P2 som er en alkalisk buffer med SDS, denne løser opp bakteriecellemembranen og denaturerer DNA. Deretter tilsettes det en nøytraliseringsbuffer. Denne inneholder høy saltkonsentrasjon og vil bidra til at detergent sammen med proteiner, celledebrier og kromosomalt DNA presipiterer. Sirkulært plasmid DNA vil derimot renautrere å forbli i løsningen. Blandingen sentrifugeres og supernatanten appliseres på kolonner som er ekvillibrert med QBT-buffer. Løsningene passerer QIAGEN kolonnen ved hjelp av gravitasjon.

Kolonnen består av en anion-bytte resin der det er små silikatkuler som er dekket med positiv ladete DEAE-grupper (diethylaminoetanol), disse binder de negativt ladete fosfatgruppene til DNAet i riktig miljø (lav saltkonsentrasjon). Urenheter vaskes vekk med QC som er en medium-salt buffer. Tilslutt elueres plasmid-DNA ved tilsetning av QF-buffer som har høy saltkonsentrasjon. DNA presipiteres ved å tilsette isopropanol og sentrifugeres. Isopropanol pipetteres forsiktig av og pelleten vaskes i 1 ml 70 etanol. Pelleten tørkes i romtemperatur og resuspenderes i 1XTE-buffer [77].

## 11 Vedlegg 3

Innskutt sekvens:

PDGFRA-GUS-ABL-PDGFRB 3652 baser

CACTCAGACAGAAGAGAATGAGCTTGAAGGCAGGCACATTTACATCTATGTGCCAGACCCAGATGTAGCCTT  
TGTACCTCTAGGAATGACGGATTATTTAGTCATCGTGAGGATGATGATTCTGCCATTATACCTTGTGCACA  
ACTGATCCCGAGACTCCTGTAACCTTACACAACAGTGAGGGGGTGGTACCTGCCTCCTACGACAGCAGACA  
GGGCTTTAATGGGACCTTCACTGTAGGGCCCTATATCTGTGAGGCCACCGTCAAAGGAAAGAAGTTCCAGAC  
CATCCCATTTAATGTTTATGCTTTAAAAGCAACATCAGAGCTGGATCTAGAAATGGAAGCTCTTAAAACCGTGT  
ATAAGTCAGGGGAAACGATTGTGGTCACCTGTGCTGTTTTTAAACAATGAGGTGGTTGACCTTCAATGGACTTA  
CCCTGGAGAAGTGAAGGCAAAGGCATCACAATGCTGGAAGAAATCAAAGTCCCATCCATCAAATTTGGTGT  
CACTTTGACGGTCCCGGAGGCCACGGTGAAGACAGTGGAGATTACGAATGTGCTGCCCGCCAGGCTACCA  
GGGAGGTCAAAGAAATGAAGAAAAGTCACTATTTCTGTCCATGAGAAAAGTTTCATTGAAATCAAACCCACCTT  
CAGCCAGTTGGAAGCTGTCAACCTGCATGAAGTCAAACATTTTGTGTTAGAGGTGCGGGCCCTACCCACCTCC  
CAGGATATCCTGGCTGAAAAACAATCTGACTCTGATTGAAAATCTCACTGAGATCACCCTGATGTGAAAAAG  
ATTCAGGAAATAAGGTATCGAAGCAAATTAAGCTGATCCGTGCTAAGGAAGAAGACAGTGGCCATTATACTA  
TTGTAGCTCAAAATGAAGATGCTGTGAAGAGCTATACTTTGAACTGTTAACTCAAGTTCCTTCATCCATTCTG  
GACTTGGTCGATGATCACCATGGCTCAACTGGGGACAGACGGTGAAGTGCACAGCTGAAGGCACGCGCCG  
TTCTGATATTGAGTGGATGATATGCAAAGATATTAAGAATGTAATAATGAAACTTCTGGACTATTTTGGCC  
AACAATGTCTCAAAACATCATCACGGAGATCCACTCCCAGACAGGAGTACCGTGGAGGGCCGTGTGACTTTC  
GCCAAAGTGGAGGAGACCATCGCCGTGCGATGCCTGGCTAAGAATCTCCTTGGAGCTGAGAACCAGAGAGCT  
GAAGCTGGTGGCTCCACCCTGCGTTCTGAACTCACGGTGGCTGCTGCAGTCTGGTGTGTTGGTGATTG  
TGATCATCTCACTTATTGTCCTGGTTGTCATTTGAAAACAGAAACCGAGGTATGAAATTCGCTGGAGGGTCA  
TGAATCAATCAGCCCAGATGGACATGAATATATTTATGTGGACCCGATGCAGCTGCCTTATGACTCAAGATGG  
GAGTTTCCAAGAGATGGACTAGTGTCTGGTGGTCTGGGGTCTGGAGCGTTTGGGAAGGTGGTTGAAGG  
AACAGCCTATGGATTAAGCCGGTCCCAACCTGTCATGAAAGTTGCAGTGAAGATGCTAAAACCCACGCGCCAG  
ATCCgcatcCACCTCTGATGTTCACTGAAGAGTACCAGAAAAGTCTGCTAGAGCAGTACCATCTGGGTCTGGAT  
CAAAAACGCAGAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCAATTTGGAATTTGCCGATTTTCACTGACTGAACAGTCACCGA  
CGAGAGTGTGGGAATAAAAAGGGGATCTTCACTCGGCAGAGACAACCAAAAAGTGCAGCGTTCTTTTTC  
GAGAGAGcgtagcTGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCAC  
AATGGGGAAATGGTGTGAAGCCCAAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGGTCCCAAGCAACTACATCaagctGGCT  
CTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCTCCCTAATGATGCCGAGGAATTCATCTTTCTCAGG  
GAAATAACTGAGATCACCATCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAA  
GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTCTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTAT  
ATCTGCAAAACCACCATTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCA  
TCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATT  
GTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCGCAAAGAAAAGTGGCGGGCTGGTGGAGC  
CGGTGACTGACTTCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAG  
AAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAAC  
ATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCA  
TCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTCGAGGCCATCCACCGCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACC  
GCACCTGGGGCAGCTCCAGCGCTGGCGAAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGGAGACCCGGTATGT  
GTCAGAGCTGACACTGGTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGCGGGCCTTCCATGAG  
GATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGTGGAGCTAAGTGAGAGC  
CACCTGACAGTGGGGAACAGACAGTCCGCTGTGCTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGT  
CTGCCTGCAGAGACCTCAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGAG  
GAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGGGTGGTGGAGCAGACTGC  
GTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTGCGTGCCTGCAGCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCA  
GGAGGTCACTGTGGTGGCACACTCCTTGCCTTTAAGGTGGTGGTGTCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGG  
TGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTACGAGATCCGATGGAA  
GGTGATTGAGTCTGTGAGCTCTGACGGCCATGAGTACATCTACGTGGACCCCATGCAGCTGCCCTATGACTC  
CACGTGGGAGCTGCCGCGGGACCAGCTTGTGCTGGGACGCACCCTCGGCTCTGGGGCCTTTGGGCAGGTG  
GTGGAGGCCACGGCTCATGGCCTGAGCCATTCTCAGGCCACGATGAAAGTGGCCGTCAAGATGCTTAAATC  
CACAGCCCAGCAGTGAAGCAAGCCCTTATGTGCGAGCTGAAGATCATGAGTCACTTGGGCCCCACC  
TGAACGTGGTCAACCTGTTGGGGCCTGCACCAAGGAGGACCCATCTATATCATCACT