



[haematologica reports]
2006;2(6):11-17

FRANCESCO PASSAMONTI
ELISA RUMI
CHIARA ELENA
MARIO LAZZARINO
MARIO CAZZOLA

Clinica Ematologia, IRCCS
Policlinico San Matteo, Università
di Pavia, Pavia, Italia

Valore clinico dei nuovi dati biologici

La diagnosi di malattia mieloproliferativa cronica (MMPC) Philadelphia-negativa si basa sui criteri stabiliti dalla classificazione WHO.¹ Tale classificazione ha introdotto l'impiego della biopsia osteomidollare come procedura principale per la diagnosi di trombocitemia essenziale (TE) e mielofibrosi idiopatica (CIMF) e come procedura secondaria per la diagnosi di policitemia vera (PV).

Negli ultimi anni sono stati individuati alcuni potenziali marcatori di MMPC. Si tratta di nuovi marcatori biologici e molecolari: a) espressione aumentata di *BCL-X* da parte dei precursori eritroidi di pazienti affetti da policitemia vera;² b) espressione ridotta di *C-MPL* da parte delle piastrine in pazienti con policitemia vera;³ c) aumento del numero di progenitori emopoietici CD34-positivi circolanti nella mielofibrosi;^{4,5} d) studi di clonalità dell'emopoiesi nella trombocitemia essenziale;^{6,7} e) espressione aumentata di *PRV-1* mRNA nei granulociti di pazienti con policitemia vera;⁸ f) mutazione V617F del gene *JAK2*.⁹

L'analisi dell'espressione di *BCL-X* nelle colonie eritroidi di pazienti con policitemia vera ha dimostrato che le colonie eritroidi esprimono elevati livelli di *BCL-X* in assenza di eritropoietina.² Ne deriva che la policitemia vera dipende da un accumulo di cellule eritroidi non più sensibili all'apoptosi indotta dalla carenza di eritropoietina. L'espressione ridotta di *C-MPL* è stata descritta inizialmente in alcuni pazienti con trombocitemia essenziale¹⁰ e, in seguito, è stata riscontrata in tutti i pazienti con policitemia vera e in 13 su 14 pazienti con mielofibrosi.¹¹ Inoltre *c-MPL* può essere ridotto anche nelle piastrinose reattive.⁶ Nessuno studio clinico ha però dimostrato l'utilità di *BCL-X* e *c-MPL* nella gestione clinica dei pazienti con MMPC. Diversamente, alcuni studi hanno valutato il ruolo clinico dei progenitori emopoietici CD34-positivi circolanti, dello stato di clonalità dell'emopoiesi, dell'espressione di *PRV-1* e della mutazione *JAK2* (V617F) nel *work-up* iniziale e nel follow-up dei pazienti con MMPC.

Progenitori emopoietici circolanti CD34-positivi

Il CD34 è un piccolo peptide espresso sulla membrana cellulare delle cellule emopoietiche a cui è ancorato tramite una molecola di glicosilfosfatidilinositolo. È un marcatore di immaturità dei progenitori emopoietici mieloidi. In condizioni normali le cellule CD34-positive sono circa l'1% delle cellule midollari e meno dello 0.1% delle cellule nucleate circolanti.¹²

I progenitori emopoietici circolanti CD34-positivi possono essere studiati in citofluorimetria.

Il campione di sangue, raccolto in EDTA, viene processato in citometria a flusso. L'analisi viene condotta in singola piattaforma, in accordo con le linee-guida dell'*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE).¹³

Il numero di cellule emopoietiche CD34-positive circolanti è un marcatore diagnostico utile nelle MMPC. Andreasson e coll. hanno dimostrato che in pazienti affetti da PV o da TE il numero di progenitori emopoietici circolanti è maggiore rispetto ai controlli sani,^{14,15} ma inferiore rispetto ai pazienti affetti da CIMF.¹⁵ Un nostro studio su 248 pazienti con malattie mieloproliferative croniche ha documentato che un numero di cellule CD34-positive circolanti superiore a $15 \times 10^6/L$ consente di differenziare la mielofibrosi dalle altre MMPC (Figura 1).⁵ Nell'ambito delle mielofibrosi un numero di cellule CD34-positive circolanti superiore a $300 \times 10^6/L$ ha implicazione prognostica sfavorevole ed è predittivo di evoluzione leucemica.⁴ Nella nostra esperienza il riscontro di un valore di cellule CD34-positive superiore a $15 \times 10^6/L$ nella valutazione sequenziale di pazienti affetti da PV o TE consente di riconoscere precocemente l'evoluzione della malattia in mielofibrosi.⁵

La più recente classificazione WHO riconosce l'esistenza di uno stadio prefibrotico della mielofibrosi, caratterizzato da aumentata cellularità midollare in assenza di fibrosi (forma di transizione tra trombociti-

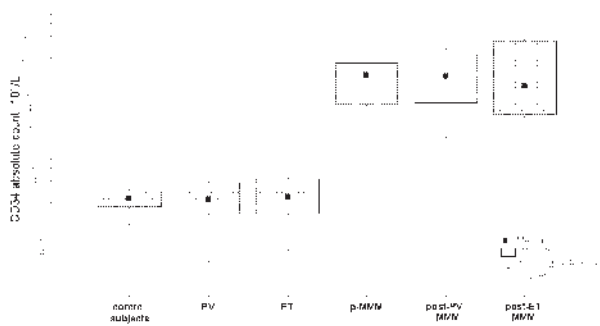


Figura 1. Numero di cellule CD34-positivo circolanti in pazienti affetti da malattie mieloproliferative croniche ed in soggetti sani. Un numero di cellule CD34⁺ < 15×10⁶/L consente di discriminare con buona affidabilità i pazienti affetti da policitemia vera (PV) e da trombocitemia essenziale (ET) rispetto ai pazienti con mielofibrosi con metaplasia mieloide (MMM). Non vi è differenza statisticamente significativa tra controlli, PV, ed ET.

temia e mielofibrosi).¹ In questo particolare tipo di mielofibrosi, clinicamente indistinguibile dalla TE, il numero di cellule CD34-positivo circolanti può essere normale.^{16,17}

Il riscontro di un più alto numero di cellule CD34-positivo circolanti in pazienti con CIMF rispetto a pazienti con fibrosi midollare secondaria a metastasi dimostra che il sovvertimento architetturale indotto dalla fibrosi non è sufficiente a spiegare il fenomeno della mobilizzazione¹⁸ e fa ipotizzare che vi sia un difetto intrinseco del progenitore emopoietico neoplastico. Recentemente, è stato infatti dimostrato che nella mielofibrosi si verifica costitutivamente un passaggio in circolo di progenitori emopoietici CD34-positivi con un programma di differenziazione cellulare patologico e che tale mobilizzazione è legata ad un'aumentata attività proteolitica nel microambiente midollare.^{17,19,20} Un nostro studio ha documentato una correlazione tra la mobilizzazione dei progenitori circolanti CD34-positivi e la percentuale di alleli *JAK2* (V617F). I pazienti con mielofibrosi post policitemia vera esprimono infatti un numero elevato di cellule CD34-positivo ed un'alta percentuale di *JAK2* (V617F).

Il processo di mobilizzazione sembra essere in parte causato dall'attivazione dei neutrofili indotta dalla mutazione *JAK2* (V617F).¹⁷

Nella pratica clinica, la valutazione dei progenitori CD34-positivi circolanti nei pazienti con MMPC è un utile parametro per la diagnosi iniziale, per il monitoraggio, e per la diagnosi precoce di evoluzione mielofibrotica.

Clonalità dell'emopoiesi

Nelle malattie mieloproliferative croniche non è stata documentata alcuna anomalia cromosomica tipica che possa definire direttamente lo stato di clonalità. Solo il 10-15% dei pazienti con PV^{21,22} e il 35% dei pazienti con CIMF²³ presentano un'anomalia del cariotipo alla diagnosi. Anomalie citogenetiche sono estremamente rare nella TE.²⁴

Esistono studi che analizzano indirettamente la clonalità tramite la valutazione del pattern di inattivazione del cromosoma X (X-CIP). Il metodo si basa sul riconoscimento del cromosoma X attivo ed inattivo, mediante la diversa espressione di metilazione del DNA, per i polimorfismi genici di HUMARA (recettore degli androgeni umani), PGK (fosfoglicerato-chinasi) e IDS (iduronate-2-sulphatase). Con questa metodica circa la metà delle pazienti con TE presenta un'emopoiesi clonale come illustrato nella Tabella 1.^{6,7,25,26} I pazienti con TE clonale sembrano avere un aumentato rischio di sviluppare problemi vascolari di tipo trombotico, come suggerito da alcuni studi.^{6,25,26} Nello studio di Shih e coll.,²⁶ l'analisi multivariata comprendente anche parametri di rischio vascolare clinici, ha identificato solo l'età come fattore predittivo di trombosi nelle TE. L'associazione tra clonalità ed eventi vascolari non si può quindi considerare conclusiva. Sebbene siano stati descritti casi di TE in cui la clonalità è limitata alle sole piastrine,⁷ la clonalità dell'emopoiesi non è di solito ristretta alla sola linea megacariocitaria.^{6,25,26}

Nella pratica clinica, lo studio della clonalità, seppur ristretto alla sola popolazione femminile di età giovanile, è un parametro importante per distinguere le MMPC dalle forme secondarie, tipicamente policlonali.

Tabella 1. Clonalità dell'emopoiesi: studi clinici nella trombocitemia essenziale.^{6,7,25,26}

Studio clinico	Monoclonale No (%)	Policlonale No (%)	Non valutabile No (%)	Correlazioni cliniche
El-kassar et al., 1997	31/48 (65)	11/48 (23)	6/48 (12)	PLT, Età
Harrison et al., 1999	10/46 (22)	12/46 (28)	23/46 (50)	Trombosi
Chiusolo et al., 2001	17/40 (42,5)	15/40 (37,5)	8/40 (20)	Trombosi
Shih et al., 2002	54/89 (61)	15/89 (17)	20/89 (22)	Età, trombosi

Non valutabile: pazienti omozigoti per i polimorfismi indagati o con sbilanciamento costitutivo dell'emopoiesi; PLT: piastrine.

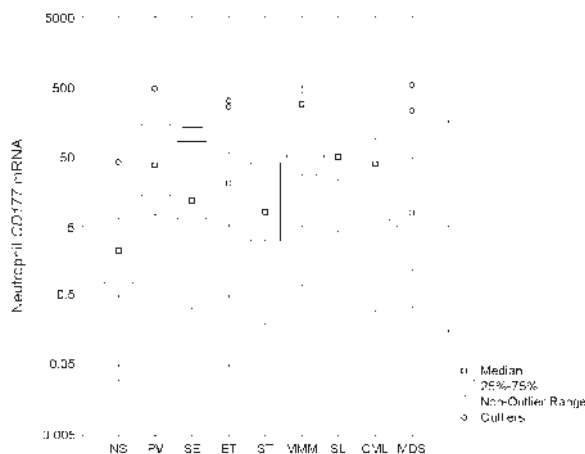


Figura 2. Espressione di PRV-1 mRNA in soggetti sani (NS) e nelle diverse condizioni cliniche (policitemia vera PV; trombocitemia essenziale ET; mielofibrosi con metaplasia mieloide MMM; eritrocitosi secondaria SE; piastrinosi secondaria ST; leucocitosi secondaria SL; leucemia mieloide cronica CML; mielodisplasia MDS). Non vi sono differenze statisticamente significative dell'espressione di PRV-1 tra i diversi sottogruppi.³⁵

PRV-1 (Polycythemia Rubra Vera-1)

PRV-1 appartiene alla famiglia dei recettori di superficie UPAR/CD59/ly6, legati alla membrana cellulare tramite una molecola di glicosil fosfatidil-inositolo (GPI-anchor).⁸ PRV-1 e NB1 rappresentano le due varianti alleliche del gene CD177,²⁷ la cui funzione biologica non è ancora stata chiarita.²⁸ Il gene PRV-1 è stato identificato confrontando il DNA complementare di pazienti affetti da PV con quello di individui sani tramite una tecnica di ibridazione sottrattiva.⁸

L'iperespressione di PRV-1 mRNA nei granulociti di pazienti affetti da PV rispetto ai controlli sani ha portato inizialmente ad identificare PRV-1 come marcatore diagnostico di policitemia vera.^{29,30} Studi successivi hanno dimostrato che PRV-1 è iperespresso non solo nella PV ma anche nella TE e nella CIMF.³¹⁻³⁴ Nel nostro studio su 235 pazienti con MMPC,³⁵ la valutazione di PRV-1 mRNA ha dimostrato una bassa sensibilità e specificità del test nel discriminare le diverse MMPC (Figura 2). Inoltre, il test è risultato positivo anche nelle condizioni reattive. L'espressione di PRV1 mRNA nei neutrofili non risulta utile neppure nel monitoraggio della risposta al trattamento in pazienti con policitemia vera o trombocitemia essenziale.³⁶ È riportato che i pazienti affetti da TE che esprimono PRV-1 mostrano un maggior rischio di complicanze trombotiche³⁷⁻³⁹ e di evoluzione in policitemia³⁷ rispetto ai pazienti con bassa espressione.

Nella pratica clinica, la valutazione di PRV-1 non migliora la definizione diagnostica della classificazione WHO.

Mutazione V617F del gene JAK2

Nell'arco di sole sei settimane (19 Marzo 2005-28 Aprile 2005), quattro gruppi di ricercatori hanno identificato contemporaneamente in pazienti affetti da PV, TE e CIMF la mutazione somatica V617F del gene Janus Kinase 2 (JAK2), con conseguente aumentata attività della proteina tirosin-chinasica JAK2.^{9,40-42}

Identificazione e studio della mutazione JAK2 (V617F)

La mutazione del gene JAK2 è stata inizialmente identificata tramite tre differenti approcci metodologici. James e coll.⁴⁰ hanno identificato JAK2 come possibile gene della PV dimostrando che inibitori della chinasi JAK2 e short interfering RNA bloccano la formazione di colonie eritroidi spontanee in pazienti con PV. Altri due gruppi di ricercatori, sequenziando in modo sistematico in soggetti con MMPC i geni codificanti per protein-chinasi, hanno osservato un'elevata frequenza della mutazione G→T nell'esone 12 di JAK2.^{41,42} Infine, il nostro gruppo in collaborazione con i colleghi dell'Ematologia dell'Università di Basilea ha identificato la mutazione di JAK2 mappando un'anomalia cromosomica ricorrente del cromosoma 9: la perdita di eterozigosi per le braccia corte del cromosoma 9 (loss of heterozygosity, LOH).⁹

Il metodo di identificazione della mutazione JAK2 (V617F) attualmente in uso presso la nostra Clinica è la PCR allele specifica.¹⁷ L'analisi iniziale viene eseguita partendo da DNA estratto dai granulociti di sangue periferico, amplificando mediante PCR allele specifica la regione di DNA in cui si trova la mutazione. La sequenza mutata viene amplificata utilizzando un primer specifico per la mutazione. Le due sequenze (normale e mutata) vengono quindi amplificate separatamente e quantificate mediante real-time PCR. Questo metodo da un lato consente di individuare la mutazione anche quando è presente in una piccola percentuale di cellule (dell'ordine dell'1%), dall'altro consente di quantificare la percentuale di cellule e di copie del gene portatrici della mutazione.

Studi clinici

La mutazione JAK2 (V617F) è stata riscontrata con elevata frequenza in pazienti affetti da policitemia vera (65-97%), da trombocitemia essenziale (23-57%) e da mielofibrosi (35-95%), come illustrato nella Tabella 2.^{9,40-49} L'ampia variabilità riportata dipende dalla sensibilità della metodica impiegata. Il sequenziamento identifica la mutazione solo se presente in almeno il 25% delle cellule, mentre la PCR allele specifica è in grado di identificare l'1-2% di cellule mutate.⁵⁰

Meno frequentemente JAK2 (V617F) è stata riscontrata in altre patologie come la leucemia mielomonocitica.

Tabella 2. Studi clinici di JAK2 (V617F) nelle malattie mieloproliferative croniche.

Autori, 2005	N. pazienti	Policitemia vera	Trombocitemia essenziale	Mielofibrosi idiopatica
Baxter*	140	71/73 (97%)	29/51 (57%)	8/16 (50%)
Kralovics	244	83/128 (65%)	21/93 (23%)	13/23 (57%)
James	45	40/45 (88%)	n.d.	n.d.
Levine	345	121/164 (74%)	37/115 (32%)	16/46 (35%)
Zhao	24	20/24 (83%)	n.d.	n.d.
Jones	166	58/81 (81%)	24/59 (41%)	15/35 (43%)
Jelinek	58	25/29 (86%)	3/10 (30%)	18/19 (95%)
Tefferi*	70	36/38 (95%)	12/22 (55%)	3/10 (30%)
Tefferi*	157	n.d.	n.d.	80/157 (51%)
Antonoli*	130	n.d.	74/130 (57%)	n.d.
Wolanskyj*	150	n.d.	73/150 (49%)	n.d.
Passamonti*	90	23/25 (92%)	10/19 (53%)	17/30 (57%)
				16/16 (100%) post PV

* Valutazione in PCR.

Tabella 3. Studi clinici di JAK2 (V617F) in altre condizioni cliniche.

Autori 2005	Sani	ES	MMPC atipica	LMMC	LMC	LNC	SI	SMD	LA	MS
Jones	0/160	0/4	17/99		0/18	2/6	2/134		0/17	0/28
Steensma	0/50			3/119		1/6	0/11	5/101		2/8
James	0/15	0/35								
Levine	0/270									
Jelinek			3/16	7/52	0/99			1/68	0/48	
Tefferi	0/11	0/19								
Sulong									0/128	
Johan	0/25			1/47						
Baxter	0/90									
Zhao	0/12									
Lee									2/113	
Totale	0/531	0/58	20/115	11/218	0/117	3/12	2/145	6/169	2/306	2/36

ES: eritrocitosi secondaria; LMMC: leucemia mielomonocitica cronica; LMC: leucemia mieloidica cronica; LNC: leucemia neutrofilica cronica; SI: sindrome ipereosinofila; SMD: sindrome mielodisplastica; LA: leucemia acuta; MS: mastocitosi sistemica.

citica cronica, le sindromi mielodisplastiche (MDS), la mastocitosi sistemica, la leucemia neutrofilica cronica, la sindrome ipereosinofila e le malattie mieloproliferative croniche atipiche (Tabella 3).^{43,45,51}

JAK2 (V617F) nella policitemia vera

La mutazione è presente nel 65-97% dei pazienti con policitemia vera: più del 20% dei pazienti con PV sono omozigoti per la mutazione di JAK2.^{9,40-42} Nel nostro studio,¹⁷ la mutazione è presente nel 92% dei pazienti con PV all'esordio e assente in tutti i pazienti sani o con eritrocitosi secondaria. I pazienti con PV hanno una percentuale di alleli mutati superiore ai pazienti affetti da trombocitemia. Con l'incrementare della proporzione di alleli mutati si ha una progressiva mobilitazione di cellule CD34-positive e una trasformazione in mielofibrosi secondaria. Questi pazienti hanno la più elevata espressione di alleli mutati.

Alcuni autori hanno correlato la presenza della mutazione JAK2 (V617F) nella PV con il sesso femmi-

nile,⁴¹ con una maggior durata di malattia^{9,41} e con una maggior incidenza di complicanze trombotiche ed emorragiche.⁹ Rispetto ai pazienti JAK2 (V617F) eterozigoti, i pazienti omozigoti presentano più alti livelli di emoglobina alla diagnosi, maggior incidenza di prurito, maggior tasso di evoluzione in mielofibrosi e un'iperespressione di PRV-1 mRNA nei granulociti neutrofili.⁵² I pazienti con PV JAK2 wild-type sono clinicamente indistinguibili dai pazienti con PV JAK2 (V617F).^{42,52}

Alcuni autori propongono l'impiego della mutazione come primo esame di inquadramento di un paziente con eritrocitosi.^{53,54} L'assenza della mutazione e la presenza di livelli normali o elevati di eritropoietina sierica rendono poco probabile una diagnosi di PV.⁵⁴

JAK2 (V617F) nella trombocitemia essenziale

La mutazione JAK2 (V617F) è descritta nel 23-57% dei pazienti con TE,^{9,41-43,45} ed è in genere presente in forma eterozigote.

Nello studio di Wolanski e coll.,⁴⁸ i pazienti che esprimono la mutazione (48,7%) hanno un'età più avanzata, un valore più elevato di emoglobina e di leucociti alla diagnosi ed un maggior rischio di evoluzione in policitemia rispetto ai pazienti non mutati.

Secondo uno studio inglese⁵⁵ i pazienti non mutati tendono ad avere una piastrinosi isolata, pur mantenendo alcune caratteristiche tipiche delle MMPC, come le anomalie citogenetiche, le atipie megacariocitarie, la presenza di colonie eritroidi spontanee e la possibile evoluzione in leucemia acuta o mielofibrosi. I pazienti mutati hanno invece valori di emoglobina, leucociti e granulociti neutrofili più elevati, una maggior cellularità midollare con iperplasia eritroide e granulopietica, una maggior tendenza a sviluppare trombosi venose e ad evolvere in policitemia vera. Il riscontro di anomalie citogenetiche in circa il 7% dei pazienti affetti da TE senza la mutazione *JAK2* (V617F) suffraga l'ipotesi dell'esistenza di altre mutazioni responsabili dell'insorgenza della malattia.⁵⁶

In conclusione, la trombocitemia *JAK2* (V617F)-positiva potrebbe essere un'entità distinta dalla trombocitemia *JAK2* (V617F)-negativa ed avere maggior tendenza all'evoluzione in policitemia e maggior rischio trombotico,⁵⁷ imputabile all'attivazione di piastrine e leucociti.⁵⁸

JAK2 (V617F) nella mielofibrosi

La mutazione *JAK2* (V617F) è stata riscontrata nel 35-95% dei pazienti con mielofibrosi.^{9,41-43,45} È stato dimostrato che i pazienti con mielofibrosi idiopatica che presentano la mutazione differiscono dai pazienti senza la mutazione per un maggior numero di leucociti e granulociti neutrofili, per una minor richiesta trasfusionale, per una prognosi peggiore,⁵⁹ per un'età più avanzata alla diagnosi, per la presenza di prurito e di trombosi pregresse.⁴⁷

Il più alto valore di leucociti e granulociti neutrofili suggerisce un'associazione tra la mutazione e l'espansione della linea mieloide.⁵⁹ Il minor fabbisogno trasfusionale potrebbe essere associato all'effetto stimolante della mutazione *JAK2* (V617F) sulla linea eritroide.⁵⁹ La maggior frequenza di prurito e di trombosi pregresse nei pazienti *JAK2* (V617F) positivi suggerisce un'associazione tra la mutazione e un'impronta policitemica della malattia.⁴⁷ Nella nostra casistica i pazienti con mielofibrosi secondaria a PV sono tutti mutati per *JAK2* (V617F) con la più alta percentuale di alleli mutati (valore mediano 94,6%).¹⁷

JAK2 (V617F) nelle mielodisplasie

La mutazione *JAK2* (V617F) è stata recentemente riscontrata nell'1-5% delle mielodisplasie.^{43,60,61} Meno del 10% delle mielodisplasie può evolvere in mielofibrosi e la maggior parte di esse ha prognosi sfavore-

vole.⁶² In seguito alla identificazione della mutazione *JAK2* (V617F) in un terzo dei casi di MDS evoluti in mielofibrosi, sono state formulate due ipotesi: l'insorgenza della mutazione nel corso della malattia potrebbe favorire l'evoluzione in mielofibrosi, oppure la mutazione potrebbe essere presente fin dall'inizio ed improntare la malattia in senso mieloproliferativo.⁶³

JAK2 (V617F) nelle leucemie acute mieloidi (LAM) e linfoidi (LAL)

Negli studi di Jones (17 pazienti) e Jelinek (28 pazienti: 20 con LAM M0-M5, 8 con LAM M6) nessuno dei pazienti affetti da leucemia acuta mieloide de novo è risultato portatore della mutazione *JAK2* (V617F).^{43,45} La mutazione è invece stata riscontrata in circa la metà delle leucemie acute mieloidi secondarie a MMPC (55%). La mutazione *JAK2* (V617F) non rappresenta comunque un evento critico per l'evoluzione in leucemia acuta delle MMPC.⁴³ Contrariamente, Lee e coll. hanno identificato una mutazione di *JAK2* in 3 su 113 pazienti con LAM senza precedente storia di malattia ematologica. In 1 dei 3 casi è stata evidenziata una nuova mutazione (K607N) a carico del dominio pseudochinasi di *JAK2*.⁶⁴ Nessuno dei pazienti affetti da leucemia acuta linfoblastica finora studiati ha mostrato mutazioni a carico del gene *JAK2*.^{43,61,64,65}

Raccomandazioni per l'impiego dei nuovi dati biologici nella pratica clinica

La diagnosi di malattia mieloproliferativa cronica (MMPC) si basa ancora sui criteri stabiliti dalla classificazione WHO. Un importante dato biologico aggiuntivo è attualmente lo studio della mutazione *JAK2* (V617F). Tale studio dovrebbe essere effettuato in tutti i pazienti utilizzando possibilmente un metodo quantitativo. Tra gli altri test, da eseguire all'esordio nei pazienti con diagnosi di MMPC, uno dei più importanti è la conta delle cellule CD34-positivo circolanti. Tale parametro dovrebbe essere poi monitorato sequenzialmente nella PV e nella TE. Per valori di cellule CD34-positivo superiori a $15 \times 10^9/L$ è indicata una rivalutazione dell'istologia midollare, nel sospetto di una evoluzione mielofibrotica.

Bibliografia

1. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302
2. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:564-571
3. Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood*. 1999;94:2555-2561
4. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frasson F. Diagnostic and clinical relevance of the number of cir-

- culating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001;98:3249-3255
5. Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2003;88:1123-1129
 6. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood*. 1999;93:417-424
 7. el-Kassar N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood*. 1997;89:128-134
 8. Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Roder S, Lubbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood*. 2000;95:2569-2576
 9. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790
 10. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tado-koro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood*. 1997;90:4031-4038
 11. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:572-580
 12. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87:1-13
 13. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry*. 1998;34:61-70
 14. Andreasson B, Swolin B, Kutti J. Hydroxyurea treatment reduces haematopoietic progenitor growth and CD34 positive cells in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Eur J Haematol*. 2000;64:188-193
 15. Andreasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Eur J Haematol*. 2002;68:189-193
 16. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol*. 2005;128:42-48
 17. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M, Cazzola M. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34-positive cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005
 18. Wang JC, Cheung CP, Ahmed F, Steier W, Tobin MS. Circulating granulocyte and macrophage progenitor cells in primary and secondary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1983;54:301-307
 19. Xu M, Bruno E, Chao J, Huang S, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Prchal JT, Barosi G, Hoffman R. Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood*. 2005;105:4508-4515
 20. Xu M, Bruno E, Chao J, Ni H, Lindgren V, Nunez R, Mahmud N, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Liu E, Prchal JT, Rondelli D, Barosi G, Hoffman R. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2005;105:1699-1705
 21. Rege-Cambrin G, Mecucci C, Tricot G, Michaux JL, Louwagie A, Van Hove W, Francart H, Van den Berghe H. A chromosomal profile of polycythemia vera. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;25:233-245
 22. Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F. Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. *Leukemia*. 1991;5:214-220
 23. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol*. 1997;98:96-102
 24. Swolin B, Safai-Kutti S, Anghem E, Kutti J. No increased frequency of trisomies 8 and 9 by fluorescence in situ hybridization in untreated patients with essential thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;126:56-59
 25. Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sora F, Giordano G, Urbano R, Mazzucconi MG, De Stefano V, Leone G, Sica S. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol*. 2001;29:670-676
 26. Shih LY, Lin TL, Lai CL, Dunn P, Wu JH, Wang PN, Kuo MC, Lee LC. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinico-hematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood*. 2002;100:1596-1601
 27. Bettinotti MP, Olsen A, Stroncek D. The use of bioinformatics to identify the genomic structure of the gene that encodes neutrophil antigen NB1, CD177. *Clin Immunol*. 2002;102:138-144
 28. Bock O, Serinsoz E, Neusch M, Schlue J, Kreipe H. The polycythemia rubra vera-1 gene is constitutively expressed by bone marrow cells and does not discriminate polycythemia vera from reactive and other chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2003;123:472-474
 29. Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, Leichte R, Green AR, Griesshammer M, Heimpel H, Pahl HL. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood*. 2003;102:3569-3574
 30. Cilloni D, Carturan S, Gottardi E, Messa F, Fava M, Defilippi I, Arruga F, Saglio G. Usefulness of the quantitative assessment of PRV-1 gene expression for the diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2004;103:2428; author reply 2429
 31. Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca LM. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2002;20:4249-4254
 32. Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2003;102:1869-1871
 33. Tefferi A, Lasho TL, Wolanskyj AP, Mesa RA. Neutrophil PRV-1 expression across the chronic myeloproliferative disorders and in secondary or spurious polycythemia. *Blood*. 2004;103:3547-3548
 34. Florensa L, Besses C, Zamora L, Bellosillo B, Espinet B, Serrano S, Woessner S, Sole F. Endogenous erythroid and megakaryocytic circulating progenitors, HUMARA clonality assay, and PRV-1 expression are useful tools for diagnosis of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*. 2004;103:2427-2428
 35. Passamonti F, Pietra D, Malabarba L, Rumi E, Della Porta MG, Malcovati L, Bonfichi M, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical significance of neutrophil CD177 mRNA expression in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2004;126:650-656
 36. Passamonti F, Pietra D, Rumi E, Arcaini L, Della Porta MG, Malcovati L, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. PRV-1 and its correlation with treatments and disease status in 210 patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005;19:888-889
 37. Griesshammer M, Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Mohr U, Heimpel H, Pahl HL. PRV-1 mRNA expression discriminates two types of essential thrombocythemia. *Ann Hematol*. 2004;83:364-370
 38. Johansson P, Ricksten A, Wennstrom L, Palmqvist L, Kutti J, Andreasson B. Increased risk for vascular complications in PRV-1 positive patients with essential thrombocythemia. *Br J Haematol*. 2003;123:513-516
 39. Goerttler PL, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Kutti J, Moliterno AR, Marchioli R, Spivak JL, Pahl HL. Thrombotic and bleeding complications in four subpopulations of patients with essential thrombocythemia defined by c-Mpl protein expression and PRV-1 mRNA levels. *Haematologica*. 2005;90:851-853
 40. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148
 41. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggan TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelo-

- fibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397
42. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061
 43. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP. JAK2 mutation 1849G >T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia-chromosome negative CML and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005
 44. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem*. 2005;280:22788-22792
 45. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005
 46. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, Wolanskyj AP, Steensma DP, Mesa R, Gilliland DG. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythemia. *Br J Haematol*. 2005;131:166-171
 47. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gary Gilliland D. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*. 2005;131:320-328
 48. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. JAK2 mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol*. 2005;131:208-213
 49. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005;19:1847-1849
 50. Cazzola M, Skoda R. Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2005;90:871-874
 51. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106:1207-1209
 52. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2(V617F) in polycythemia vera. *Cancer*. 2005
 53. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia*. 2005
 54. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2(V617F): When to order the test and how to interpret the results. *Leuk Res*. 2006
 55. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-1953
 56. Vizmanos JL, Ormazabal C, Larrayoz MJ, Cross NC, Calasanz MJ. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. *Leukemia*. 2006;20:534-535
 57. Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadegarfar G, Harrison C. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia. *Br J Haematol*. 2006;132:244-245
 58. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*. 2006;91:169-175
 59. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Haselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdiles MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjan JJ, Viallard JF, Briere J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT. The V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2005
 60. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005
 61. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, Berger R, Clark JJ, Willis SG, Nguyen KT, Flores NJ, Estey E, Gattermann N, Armstrong S, Look AT, Griffin JD, Bernard OA, Heinrich MC, Gilliland DG, Druker B, Deininger MW. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3377-3379
 62. Ohyashiki K, Sasao I, Ohyashiki JH, Murakami T, Iwabuchi A, Tsuchi T, Saito M, Nakazawa S, Serizawa H, Ebihara Y, et al. Clinical and cytogenetic characteristics of myelodysplastic syndromes developing myelofibrosis. *Cancer*. 1991;68:178-183
 63. Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D, Gotoh A, Miyazawa K, Kimura Y, Ohyashiki JH. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia*. 2005;19:2359-2360
 64. Lee JW, Kim YG, Soung YH, Han KJ, Kim SY, Rhim HS, Min WS, Nam SW, Park WS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene*. 2005
 65. Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2005;130:964-965.