

Naše skúsenosti s vyšetrovaním *JAK2* mutácií pacientov s myeloproliferatívnymi ochoreniami z trepanobiopického materiálu kostnej drene

Burjanivová T.^{1*}, Marcinek J.^{2,3*}, Minárik G.⁴, Lasabová Z.¹, Szépe P.^{2,3}, Balhárek T.^{2,3}, Vaňochová A.¹, Plank L.^{2,3*}

¹Ústav molekulej biológie JLF UK v Martine

²Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum biopickéj diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UNM v Martine

³Martinské biopické centrum, s.r.o. v Martine

⁴Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK v Bratislave

* T.B., J.M. a L.P. prispeli k tejto práci rovnako

SÚHRN

Polycythemia vera (PV), esenciálna trombocytóza (ET) a primárna myelofibróza (PMF) patria do skupiny Ph1 negatívnych myeloproliferatívnych neoplázií (MPN), pri ktorých sa často vyskytuje mutácia *JAK2V617F*. Táto mutácia sa vyskytuje u takmer všetkých pacientov s PV a u približne 60 % pacientov s ET a PMF. V diferenciálnej diagnostike MPN však význam tejto mutácie stále nie je dosť objasnený, preto tu má dôležitú úlohu aj biopické vyšetrenie kostnej drene. Na našom pracovisku sme sa rozhodli vyšetovať *JAK2V617F* mutáciu v DNA izolovanej z parafínových blokov od pacientov s PV, ET a PMF, keďže túto mutáciu nedávno SZO odporučila využívať ako jeden z markerov v diagnostike uvedených klinických jednotiek. Mutácie *V617F* sme detekovali pomocou alelovo-špecifickej hot start multiplex PCR. U *JAK2V617F* negatívnych pacientov s PV sme vyšetovali sekvenovaním prítomnosť mutácií v exóne 12 *JAK2* génu. Dosať sme na našom pracovisku vyšetřili približne 200 pacientov s klinicky verifikovanou diagnózou PV, ET a PMF. Naše výsledky sú u všetkých troch ochorení (ET, PV, PMF) zhodné s dosiaľ publikovanými prácami. Nami implementovaná metodika detekcie mutácie *JAK2* z parafínových blokov umožňuje analýzu veľkého množstva archívneho materiálu pre retrospektívne štúdie, a súčasne aj implementáciu analýzy statusu *JAK2* ako súčasť biopického vyšetřenia kostnej drene všetkých pacientov s podozrením na PV, ET alebo PMF.

Kľúčové slová: myeloproliferatívne neoplázie – *JAK2* mutácie – parafínové bloky

Our experience with detection of *JAK2* mutations in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative disorders

SUMMARY

Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) characterized by *JAK2* mutation. The exon 14 *V617F* mutation is present in almost all patients with PV and in approx. 60% of patients with ET and PMF. The importance of *JAK2V617F* in the differential diagnostic considerations is still unclear and here the BM morphology examination still represents an important diagnostic tool. In the WHO classification of Ph1-negative MPNs, the identification of *JAK2* mutations represents a major diagnostic criterion of these diseases. Therefore we decided to implement the examination of *JAK2V617F* mutation in formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens of patients with Ph1-negative MPN using allele-specific PCR. In addition, in all *JAK2 V617F* negative patients with PV we sequenced the whole *JAK2* exon 12. Until now we examined up to 200 patients with clinically confirmed MPN and our results in all three categories PV, ET and PMF are in agreement with earlier published data. Paraffin embedded tissues represent a valuable source of DNA which can be used in the diagnostics of both *JAK2* exon 12 and exon 14 mutations. It is of particular importance if the fresh material is not available and there is a clinical and/or research utility for the performance of PCR on archival bone marrow samples with PV, ET or PMF suspicion.

Keywords: myeloproliferative neoplasms – *JAK2* mutations – paraffin blocks

Cesk Patol 2011; 47(3): 115–117.

✉ Adresa pro korespondenci:

Prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM

Kollárova 2, 036 01 Martin, Slovenská republika

tel.: (+421)-434133002

fax: (+421)- 43 420 33 70

e-mail: plank@jfmmed.uniba.sk

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN), predtým nazývané aj chronické myeloproliferatívne ochorenia predstavujú skupinu nádorových ochorení, ktoré vznikajú klonálnou proliferáciou kmeňových hemopoetických buniek v kostnej drene. Rozdeľujú sa na chronickú myelocytovú leukémiu (s pozitívitou Philadelphia 1 chromozómu /Ph¹/, resp. bcr/abl génu) a na ochorenia bez pozitivity tohto chromozómu, tzv. Ph¹-MPN. Medzi ne patria tri najčastejšie ochorenia: pravá polycytémia (PV), esenciálna trombocytémia (ET)

a primárna myelofibróza (PMF). Dnes, po viac ako 5 rokov od objavu novej bodovej mutácie Janusovej tyrozínovej kinázy 2 typu V617F (ďalej len JAK2 mutácia) v skupine Ph¹⁻ myeloproliferatívnych neoplázií (MPN) je už zrejmy význam tohoto objavu pre diagnostiku, poznanie biológie a klinického priebehu a liečbu Ph¹⁻ MPN. JAK2 mutácia sa vyskytuje u 95 % pacientov s PV a približne 60 % pacientov s ET a PMF (1–4). Mutácia spôsobuje na ligande nezávislú fosforyláciu JAK2 kinázy s následnou aktiváciou STAT3 signálnej dráhy a transkripčných faktorov a prispieva tak k nekontrolovanej klonovej proliferácii kmeňových buniek krvotvorby (5). Ako súčasť tzv. veľkých a malých kritérií všetkých Ph¹⁻ MPN sa jej identifikácia stala spolu s črtami morfológie kostnej drene a ďalšími parametrami súčasťou diagnostických algoritmov podľa klasifikácie SZO (6). Vzhľadom ku koncentrácii biopsií kostnej drene pacientov s Ph¹⁻ MPN v našom pracovisku v pozícii Konzultačného centra biopтической diagnostiky ochorení krvotvorby v SR sme preto mali ambíciu zaviesť **novú metódu detekcie JAKV617F a komplementárnu detekciu mutácie v exóne 12 JAK2 génu, a to z DNA izolovanej z (trepano-)biopických vzoriek KD.**

MATERIÁL A METODIKA

Materiálom pre vyšetovanie uvedených mutácií boli trepanobiopické vzorky KD, fixované pomocou štandardnej formolovej fixácie. Tieto boli vyšetované v rámci retrospektívnej, ako aj prospektívnej časti analýzy prípadov z registrov oboch zainteresovaných patologických pracovísk. Podrobnejšie údaje pre výber materiálu uvádzame v časti výsledky.

Nami používaný postup možno stručne charakterizovať nasledovne:

- izolácia DNA:** Biopické vzorky fixované vo formole sú dekalifikované v EDTA, odvodnené v alkoholovo-xylénovej rade a zalievané do parafínových blokov. Parafínové rezy sa deparafinizujú v xyléne a alkoholovej rade. DNA zo získaných buniek je izolovaná pomocou kitu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen Inc., USA).
- detekcia V617F mutácie:** Mutáciu detekujeme pomocou alelošpecifickej hot start multiplex PCR s použitím primerov forward kontrola (5'-ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG-3'), forward V617F (5'-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3') a reverse (5'-CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA-3') (7). PCR produkty sú separované v 3% agarózovom géli. V prítomnosti V617F mutácie vzniknú dva PCR fragmenty, pri jej chýbaní sa amplifikuje len jeden fragment (obr. 1). Na rozlíšenie heterozygotnej a homozygotnej formy JAK2V617F mutácie u pacientov s PV bola použitá restričná analýza pomocou enzýmu Bsa XI (7). Špecifickosť zavádzanej metódy bola u časti pacientov potvrdená sekvenáciou.
- detekcia mutácie v exóne 12 JAK2 pri PV:** DNA pacientov s PV a bez JAK2V617F mutácie vyšetrujeme ďalej na prítomnosť mutácií v exóne 12 JAK2 génu. Pre amplifikáciu exónu 12 JAK2 génu sme použili JAK2 ex12 F primer (5'-CTC CTC TTT GGA GCA ATT CA-3') a JAK2 ex12 R primer (5'-CCA ATG TCA CAT GAA TGT AAA TCA A-3'). 25 ml reakčná zmes pozostávala z 1,5 mmol/L MgCl₂, 10 pmol/L z každého forward a reverse primeru, 2 mmol/L dNTPs, 2,5 mmol/L 10xPCR pu-

fru (ABgene®, United Kingdom). PCR reakcia prebiehala podľa teplotného programu uvedeného v tabuľke 1.

Po PCR amplifikácii a purifikácii sme produkt sekvenovali pomocou kapilárnej elektroforézy ABI PRISM Genetic Analyser a BigDye[™] Primer v3.0 Sequencing Kit (Applied Biosystem, USA). Získané sekvenencie sa analyzujú s použitím softwaru Chromas 1.5 (TechneLysium, Austrália). Identifikácia mutácií bola prevedená pomocou softwaru BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (8).

VÝSLEDKY

V úvodnej fáze implementácie metódy sme vyšetovali mutáciu JAK2V617F retrospektívne v archívnom materiáli približne 200 pacientov s klinickou dg. PV, ET a PMF, u ktorých bol konkrétny typ Ph¹⁻ MPN verifikovaný aj biopické. Mutáciu JAKV617F sme potvrdili v 90 % prípadoch PV, 64 % pacientov s ET a 60 % pacientov s PMF, čo sú hodnoty porovnateľné s výstupmi iných (1–4,9). Potom sme metodiku implementovali prospektívne do rutínnej diagnostickej praxe, pričom do momentu spracovania predloženého prehľadu sme vyšetřili vzorky ďalších 50 pacientov.

Mutáciu v exóne 12 sme doteraz potvrdili u troch pacientov s PV bez JAK2V617F mutácie, pričom u jedného z nich sme zachytili nový, doteraz neznámy typ bodovej mutácie (8).

DISKUSIA

Dnes metodiku analýzy mutácie JAKV617F používame ako súčasť biopického vyšetrenia kostnej drene najmä:

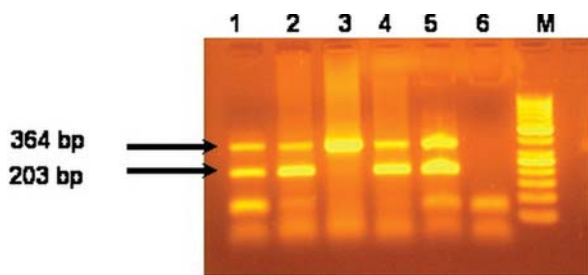
- ak morfológický obraz vyžaduje diferenciálnu diagnostiku reaktívnej myeloproliferácie versus MPN, resp. ak je klinicky susponovaná Ph¹⁻ MPN, ale morfológický obraz drene nie je celkom charakteristický,
- v prípadoch málo objemnej hranične reprezentatívnej, alebo kvalitatívne arteficiálne (obvyčajne odberom) poškodenej biopické vzorky kostnej drene,
- pri rebiopsiách, ak je žiadúce vyšetřiť mutáciu v predošlom archívnom materiáli,
- na žiadosť hematológov najmä z ambulantných pracovísk, ktoré majú obmedzenú možnosť molekulovo-genetických analýz a pod.

Vo všeobecnosti význam detekcie JAK2V617F mutácie, resp. exónu 12 možno zhrnúť nasledovne:

- je *diagnostický* - potvrdenie klonality ochorenia podporuje diagnózu Ph¹⁻ MPN tak pri neistote morfológického obrazu, ako aj pri kvantitatívnych a kvalitatívnych limitoch biopsie.
- umožní *pochopiť manifestáciu MPN* – napr. mutácia JAKV617F ovplyvňuje klinickú a laboratórnu manifestáciu MPN (častejšie trombotické komplikácie, zvýšené hodnoty erytrocytov a pod. (10–12), alebo dreň pacientov s PV bez mutácie JAKV617F a s mutáciou v exóne 12 vykazuje častejšie izolované zmeny erytropoézy bez výraznejšej aktivácie ostatných dvoch radov a preto jej morfológia môže byť iná než „klasická“,
- je čiastočne aj *prognostický* – najmä u pacientov s PMF, najmä v zmysle tendencie k progresu fibrózy a lepších výsledkov po transplantácii kostnej drene (13).

Tabuľka 1. Teplotný program PCR reakcie.

Úvodná denaturácia	Počet cyklov 40 denaturácia	anelácia	polymerizácia	Záverečná polymerizácia
95°C	95°C	62°C	72°C	72°C
3 min	1 min	1 min	1 min	10 min



Obr. č. 1 Výsledky alelovo-špecifickej hot start multiplex PCR na detekciu JAK2 V617F mutácie. Dráhy 1, 2, 4 a 5 predstavujú pacientov s JAK2V617F mutáciou. Dráha 3 je pacient bez JAK2V617F mutácie. Dráha 6 je negatívna kontrola a dráha M je 50 bp ladder.

4. v rámci indikovania postupne prichádzajúcej cieľenej liečby Ph¹⁺ MPN môže byť aj *prediktívny*.

Záverom je vhodné dodať dve poznámky:

- a) Napriek značnej degradácii DNA izolovanej z parafrínových bi-optických blokov je technicky možné z nej vyšetriť JAK2 mutáciu (najmä v uvedených prípadoch). Napriek tomu prednosť má mať vždy, keď je to možné, test prítomnosti mutácie z „čerstvých“ buniek periférnej krvi alebo kostnej drene, a to podľa možnosti metódou RT-PCR (real-time PCR) - jednak pre vyššiu senzitivitu, ako aj pre možnosť kvantifikácie tejto mutácie. To umožňuje (analogicky k vyšetrovaniu bcr/abl génu pri CML) sledovať vývoj ochorenia a kontrolovať úspešnosť cieľenej biologickej liečby (10). Tento fakt predstavuje istú výzvu aj pre našu prácu. Mutácie exónu 12 z DNA izolovanej z parafrínového materiálu sú limitované jeho kvalitou (citlivosť sekvenačnej analýzy je nižšia

než PCR) a tým, že pri veľkom množstve bodových mutácií (14) je jej uplatnenie v dennej praxi problematické. Vylúčením JAKV617F mutácie u pacientov s biopticky verifikovanou PV však možno selektovať prípady s potenciálnymi mutáciami v exóne 12 a v spolupráci s klinickou praxou prispieť k dokončeniu analýz vo vhodnejšom nefixovanom materiáli.

- b) Okrem relatívne častej JAK2 mutácie sa pri Ph¹⁺ MPN stretávajú aj s inými zriedkavejšími typmi mutácií. Tu okrem už uvedeného (mutácie v exóne 12 JAK2 v prípadoch JAK2V617F negatívnej PV) možno uviesť napr. mutácie trombopoetínového receptora (MPL) postihujúce cca 10 % pacientov s PMF a cca 3 % prípadov ET (15), ako aj pestrú skupinu ďalších, relatívne vzácnych mutácií vyskytujúcich sa najmä pri blastickej transformácii Ph¹⁺ MPN. Nedávno bola identifikovaná aj mutácia TET2, ktorá sa okrem prípadov MPN (cca 20 %), vyskytuje aj pri iných myeloidných nádoroch (16). Možno teda zhrnúť, že aj keď objav JAK2 mutácií zlepšil porozumenie patogenézy Ph¹⁺ MPN, tak kauzálne genetické mutácie zodpovedné za vznik týchto ochorení sú stále neznáme a existencia „jednoduchej“ kauzálnej mutácie, ako je tomu pri CML je nepravdepodobná. Nielen preto sa napriek pokroku genetických analýz význam kvalitnej histomorfologickej analýzy bioptickej vzorky pacientov s Ph¹⁺ MPN nijako nezmenil.

POĎAKOVANIE

Podporené projektom OPVaV-2008/2.1/01-SORO – Centrum excelentnosti CEPV I. (IMTS kód 26220120016) a CEPV II. (IMTS kód 26220120036) na Jesseniovej lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Martine, ktorý je spolufinancovaný z prostriedkov EÚ

LITERATURA

- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–1790.
- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G >T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3370–3373.
- Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005; 280: 22788–22792.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 2005; 434(7037): 1144–1148.
- Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007; 110: 1092–1097.
- Horn T, Kremer M, Dechow T, et al. Detection of the activating JAK2 V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases. *J Mol Diagn* 2006; 8: 299–304.
- Burjanivova T, Marcinek J, Lasabova Z, et al. A novel JAK2 exon 12 mutation identified in the retrospective analysis of paraffin-embedded tissues of polycythemia vera patients. *Diagn Mol Pathol* 2009; 18(2): 108–111.
- Murugesan G, Aboudola S, Szpurka H, et al. Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 625–633.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008; 22: 1299–1307.
- Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica* 2008; 93: 1412–1414.
- Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, et al. Is JAK2 V617F mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res* 2008; 33: 67–73.
- Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2010; 116(18): 3572–3581.
- Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92: 1585–1589.
- Glembotsky AC, Korin L, Lev PR et al. Screening for MPL mutations in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: normal Mpl expression and absence of constitutive STAT3 and STAT5 activation in MPLW515L-positive platelets. *Eur J Haematol* 2010; 84(5): 398–405.
- Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010; 24, 1128–1138.