

# PRISOTNOST DELEŽA MUTIRANEGA ALELA JAK2 V617F PRI KRONIČNIH MIELOPROLIFERATIVNIH BOLEZNIH

## JAK2 V617F ALLELE BURDEN IN CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

Matevž Škerget,<sup>1</sup> Tadej Pajič,<sup>1</sup> Eva Kralj,<sup>1</sup> Joško Vučkovič<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

<sup>2</sup> Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje

### Izvleček

**Izhodišča** Kronične mieloproliferativne bolezni (KMPB) so skupina kronično potekajočih krvnih bolezni, pri katerih je zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične celice. Prisotnost Ph-kromosoma loči kronično mieloično levkemijo (KML) od drugih KMPB. Mutacija JAK2 V617F je prisotna pri 76–97 % bolnikov s pravo policitemijo (PRV), 29–75 % bolnikov z esencialno trombocitemijo (ET) in 50 % bolnikov s kronično idiopatsko mielofibrozo (KIMF). Delež mutiranega alela verjetno sovпада s klinično sliko pri teh boleznih.

**Material in metode** V raziskavo smo vključili 110 bolnikov z diagnozo ET, PRV in KIMF, za katere smo imeli shranjene vzorce DNA granulocitov. Delež mutiranega alela v vzorcih DNA granulocitov smo pridobili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RQ-PCR).

**Rezultati** Povprečna vrednost odstotka mutiranega alela JAK2 V617F znaša 25 % za bolnike z ET, 47 % za bolnike s PRV in 85 % za bolnike s KIMF. Obstaja statistično pomembna korelacija med odstotkom mutiranega alela in številom levkocitov.

**Zaključki** Potrdili smo različen odstotek mutacije pri bolnikih z ET, PRV in KIMF. Možno je, da gre pri KMPB za enovito bolezen z različnimi fenotipi bolezni glede na odstotek mutiranega alela JAK2 V617F. Dokazali smo vpliv deleža mutiranega alela na krvno sliko.

**Ključne besede** delež mutiranega alela JAK2 V617F; esencialna trombocitoza; prava policitemija; kronična idiopatska mielofibroza

### Abstract

**Background** Chronic myeloproliferative disorders (CMPD) are a group of conditions affecting the stem cell causing over-production of one or more of the blood cells. The presence of Ph chromosome distinguishes chronic myeloid leukemia (CML) from other diseases of the group. JAK2 V617F mutation is present in 76–97 % of patients with polycythaemia vera (PRV), 29–75 % of patients with essential thrombocythaemia (ET) and 50 % of patients with chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). The JAK2 V617F allele burden correlates with the clinical picture of the diseases.

**Methods** We involved 110 patients with ET, PRV and CIMF in whom we already had extracted DNA samples from granulocytes. We established the JAK2 V617F allele burden in the DNA of granulocytes by using real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR).

**Results** The mean allele burden of JAK2 V617F is 25 % in patients with ET, 47 % in patients with PRV and 85 % in patients with CIMF. There is a statistically significant correlation between the allele burden and the number of leukocytes in peripheral blood.

### Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Matevž Škerget, dr. med., Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

**Conclusion** *The mean allele burden of JAK2 V617F is different in ET, PRV and CIMF. It is plausible that the three separate diseases are only different clinical pictures of the same CMPD depending on the allele burden. The allele burden strongly correlates with the peripheral blood count.*

**Key words** *JAK2 V617F allele burden; essential thrombocythaemia; polycythaemia vera; chronic idiopathic myelofibrosis*

## Uvod

Kronične mieloproliferativne bolezni (KMPB) so skupina kronično potekajočih krvnih bolezni, pri katerih je zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične celice. Mednje štejemo kronično mieloidno levkemijo (KML), pravo policitemijo (PRV), esencialno trombocitemijo (ET), kronično idiopatsko mielofibrozo (KIMF) in nekatere redkejšje bolezni. Gre za podobne si bolezni s prepletajočimi se kliničnimi slikami in laboratorijskimi odstopanji. Prisotnost Ph-kromosoma loči KML od drugih KMPB. Pri drugih KMPB iščemo zanesljive označevalce, ki bi omogočali razlikovanje med njimi in drugimi boleznimi.<sup>1,2</sup>

Pomemben napredek predstavlja odkritje točkovne mutacije na genu za tirozinsko kinazo JAK2.<sup>3,4</sup> Ta sodeluje pri prenosu signala iz receptorja na znotrajcelične signalne poti. Mutacija povzroči zamenjavo valina za fenilalanin na mestu 617 (V617F), kar privede do kontinuirane kinazne aktivnosti in spodbujanja signalne poti.<sup>3-5</sup> Mutacija JAK2 V617F je prisotna pri 76-97 % bolnikov s PRV, pri 29-75 % bolnikov z ET in pri 50 % bolnikov s KIMF.<sup>3,4,6</sup> Raziskava na slovenskih bolnikih je pokazala prisotnost mutacije pri 43 % bolnikov z ET, pri 100 % bolnikov s PRV in pri 33 % bolnikov s KIMF.<sup>7</sup> Mutacija je specifična za KMPB. Redko je prisotna pri drugih krvnih rakavih obolenjih. Raziskave so pokazale vpliv odstotka mutiranega alela JAK2 V617F na fenotip bolezni. Tako pri bolnikih z ET odstotek mutiranega alela sovpada z večjimi vrednostmi hemoglobina, hematokrita in z večjim številom levkocitov ter manjšim številom trombocitov.<sup>8,9</sup> Podoben vpliv odstotka mutiranega alela na fenotip bolezni je prisoten tudi pri bolnikih s PRV.<sup>10,11</sup> Delež mutiranega alela se razlikuje pri KMPB. Tako se delež mutiranega alela povečuje od ET preko PRV do KIMF.<sup>11</sup> Obstaja povezava med večjim deležem mutiranega alela in agresivnejšo obliko bolezni, večjim številom tromboz ter srčno-žilnimi zapleti pri bolnikih z ET.<sup>9</sup>

## Zasnova naloge in metode

### Bolniki

V raziskavo smo vključili 110 bolnikov z diagnozo ET, PRV ali KIMF po merilih SZO.<sup>12</sup> V Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo imeli za vse bolnike shranjene vzorce DNA granulocitov. Pri vseh bolnikih smo imeli na razpolago podatke o krvni sliki, kliničnem statusu in zdravljenju ob odvzemu krvi za preiskavo dokazovanja mutacije JAK2 V617F.

### Preiskava za dokazovanje odstotka mutiranega alela JAK2 V617F

Delež mutiranega alela v vzorcih DNA granulocitov (25 ng) smo pridobili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RQ-PCR) in reagenti kompleta JAK2 V617 MutaQuant kit (Ipsogen). S specifičnimi oligonukleotidi smo ločeno pomnožili odsek DNA z ali brez mutacije. Iz standardov z znanim deležem mutiranega alela JAK2 V617F smo z RQ-PCR pridobili umeritveni krivulji. Iz umeritvenih krivulj smo določili število kopij za mutirani in nemutirani alel JAK2 V617F. Po formuli  $JAK2V617F \% = (\text{št. kopij V617F} / (\text{št. kopij V617F} + \text{št. kopij divjega tipa})) \times 100$  smo določili delež JAK2 V617F mutacije.

### Statistična obdelava

Podatke smo obdelali s pomočjo programa SPSS (Statsoft Inc, ZDA). Razlike v prisotnosti mutacije na JAK2 pri različnih boleznih smo opredelili z enosmernim preizkusom ANOVA. S post hoc Tukeyevim preizkusom smo opredelili razlike med posameznimi boleznimi. Korelacijo med deležem prisotnega mutiranega alela in številom trombocitov, levkocitov in vrednostjo hemoglobina smo opredelili s Pearsonovim dvosmernim preizkusom.

## Rezultati

### Značilnosti bolnikov

V raziskavo smo vključili 110 bolnikov, od tega 43 (39 %) moških in 67 (61 %) žensk. Mediana starosti je znašala 59 let (razpon 20-89 let). 87 bolnikov je imelo ET, 18 bolnikov PRV in 5 bolnikov KIMF. Mutacija na JAK2, ugotovljena s kvantitativno metodo, je prisotna pri 53 (61 %) bolnikih z ET, 17 (94 %) bolnikih s PRV in 5 (100 %) bolnikih s KIMF. Zdravljenje prejema 22 bolnikov z ET, 12 bolnikov s PRV in 2 bolnika s KIMF. Za nadaljnjo obdelavo smo poiskali bolnike s prisotno mutacijo JAK2 V617F, ki ne prejemajo zdravljenja in pri katerih zaradi policitemije ne opravljamo venepunkcij. Takšnih bolnikov je bilo 34 z ET, 5 bolnikov s PRV in 3 bolniki s KIMF. Razpredelnica 1 prikazuje značilnosti bolnikov.

### Delež mutiranega alela JAK2 V617F pri bolnikih s KMPB

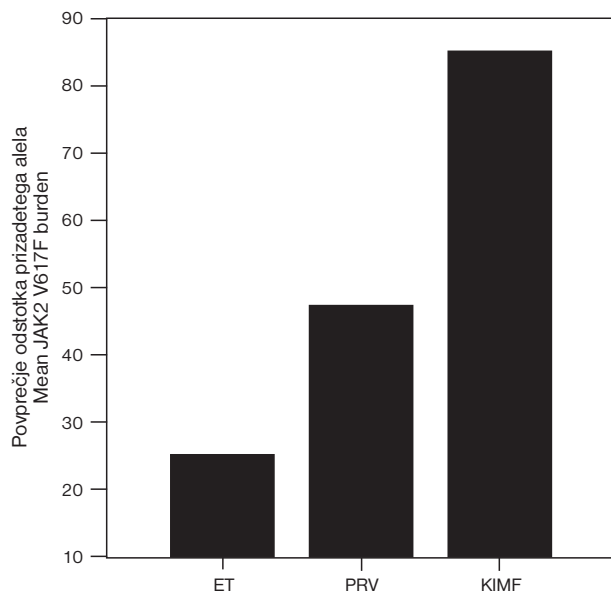
Pregledali smo bolnike s prisotno mutacijo na JAK2 V617F, ki ne prejemajo zdravljenja. Povprečna vrednost odstotka mutiranega alela JAK2 V617F znaša 25 % za bolnike z ET, 47 % za bolnike s PRV in 85 % za bolnike s KIMF. Razpredelnica 1 prikazuje delež mu-

Razpr. 1. Značilnosti bolnikov.  
Table 1. Characteristics of patients.

Značilnost	Število bolnikov ali mediana vrednost (razpon)
Characteristic	Number of patients or median number (range)
Starost - leta / Age - years	59 (20-89)
Spol / Gender	
Moški / Male	43
Ženski / Female	67
Bolnikov z ET / ET patients	87
Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) / Number of patients with <i>JAK2</i> V617F (%)	53 (61 %)
Število zdravljenih (%) / Number of patients treated (%)	22 (25 %)
Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) / Number of patients treated with <i>JAK2</i> V617F mutation (%)	34 (39 %)
Hemoglobin, g/L / Hemoglobin, g/L	139 (103-173)
Število trombocitov, $\times 10^9/L$ / Platelet count, $\times 10^9/L$	660 (354-2155)
Število levkocitov, $\times 10^9/L$ / Leukocyte count, $\times 10^9/L$	8,3 (4,6-22,7)
Povprečje odstotka mutiranega <i>JAK2</i> / Mean <i>JAK2</i> V617F burden	25 %
Bolnikov s PRV / PRV patients	18
Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) / Number of patients with <i>JAK2</i> V617F (%)	17 (94 %)
Število zdravljenih (%) / Number of patients treated (%)	12 (67 %)
Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) / Number of untreated patients with <i>JAK2</i> V617F mutation (%)	5 (28 %)
Hemoglobin, g/L / Hemoglobin, g/L	166 (128-195)
Število trombocitov, $\times 10^9/L$ / Platelet count, $\times 10^9/L$	475 (411-610)
Število levkocitov, $\times 10^9/L$ / Leukocyte count, $\times 10^9/L$	12,2 (4,2-25,8)
Povprečje odstotka mutiranega <i>JAK2</i> / Mean <i>JAK2</i> V617F burden	47 %
Bolnikov s KIMF / CIMF patients	5
Število bolnikov s prisotno mutacijo (%) / Number of patients with <i>JAK2</i> V617F (%)	5 (100 %)
Število zdravljenih (%) / Number of patients treated (%)	2 (40 %)
Število nezdravljenih s prisotno mutacijo (%) / Number of untreated patients with <i>JAK2</i> V617F mutation (%)	3 (60 %)
Hemoglobin, g/L / Hemoglobin, g/L	133 (128-138)
Število trombocitov, $\times 10^9/L$ / Platelet count, $\times 10^9/L$	364 (111-679)
Število levkocitov, $\times 10^9/L$ / Leukocyte count, $\times 10^9/L$	13,3 (12,4-25,3)
Povprečje odstotka mutiranega <i>JAK2</i> / Mean <i>JAK2</i> V617F burden	85 %

Hemoglobin, število trombocitov, levkocitov in odstotek mutiranega alela *JAK2* se nanašajo na bolnike s prisotno mutacijo *JAK2* brez zdravljenja. Hemoglobin, leukocyte count, platelet count and *JAK2* V617F allele burden relates to patients with *JAK2* V617F mutation without treatment.

tiranega alela pri ET, PRV in KIMF. Slika 1 prika-zuje povprečno vrednost odstotka mutiranega alela *JAK2* V617F pri ET, PRV in KIMF. Z enosmernim preizkusom ANOVA in post hoc Tukeyevim preizkusom smo ugotovili, da obstaja statistično pomembna ( $p < 0,001$ ) razlika za odstotek mutiranega alela med



Sl. 1. Povprečni odstotek mutiranega alela *JAK2* V617F pri bolnikih z ET, s PRV in KIMF brez zdravljenja.

Figure 1. Mean *JAK2* V617F allele burden in patients with ET, PRV and CIMF without treatment.

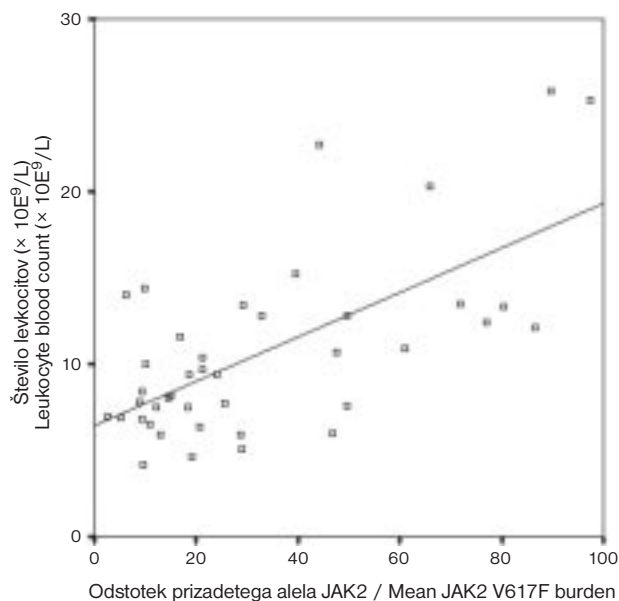
bolniki z ET in s KIMF. Statistično pomembne razlike med ostalimi kombinacijami nismo dokazali.

### Korelacija med odstotkom mutiranega alela *JAK2* V617F in krvno sliko

Preizkušali smo domnevo, da odstotek mutiranega alela *JAK2* V617F vpliva na fenotip bolezni. Napravili smo Pearsonov dvosmerni preizkus korelacije. Dokazali smo statistično pomembno korelacijo med odstotkom mutiranega alela in številom levkocitov (Pearson-ov koeficient korelacije  $r = 0,657$ ,  $p < 0,001$ ). Slika 2 prikazuje porazdelitev števila levkocitov pri različnih odstotkih mutiranega alela *JAK2* V617F. Pri dobljenih rezultatih sicer opazamo manjše število trombocitov in večjo vrednost hemoglobina z večanjem odstotka mutiranega alela *JAK2* V617F, vendar za to korelacijo nismo ugotovili statistične značilnosti.

### Razpravljanje

V vzorcu 110 bolnikov smo našli prisotnost mutacije *JAK2* V617F pri 53 (61 %) bolnikih z ET, 17 (94 %) bolnikih s PRV in 5 (100 %) bolnikih s KIMF. Vrednosti se ujemajo z objavljenimi podatki iz literature.<sup>3,4,6,7</sup> Odstopanje je prisotno le pri bolnikih s KIMF, pri katerih smo našli mutacijo pri vseh bolnikih, medtem ko je v literaturi opisana pri približno 50 % bolnikov. Dobljeno vrednost zaradi zelo majhnega vzorca bolnikov (5 bolnikov) težko razložimo. Prisotnost mutacije pri KIMF je povezana z večjimi vrednostmi hemoglobina in nižjimi vrednostmi trombocitov.<sup>10</sup> Možno je, da se zdravnik odloča za določanje mutacije pri



Sl. 2. Korelacija med odstotkom mutiranega alela *JAK2* V617F in številom levkocitov v krvi ( $r = 0,657$ ,  $p < 0,001$ ).

Figure 2. Leukocyte blood count in correspondence with the *JAK2* V617F allele burden ( $r = 0.657$ ,  $p < 0.001$ ).

tistih bolnikih s KIMF, ki imajo večje vrednosti hemoglobina in ne povsem jasno diagnozo. Izbor takih bolnikov bi imel za posledico večji odstotek mutacije *JAK2* V617F pri pregledanem vzorcu bolnikov.

Preverili smo, ali obstaja med bolniki s KMPB razlika za odstotek mutiranega alela. Povprečni odstotek mutiranega alela znaša 25 % za bolnike z ET, 47 % za bolnike s PRV in 85 % za bolnike s KIMF. Le razlika med ET in KIMF je statistično značilna ( $p < 0,001$ ). Statistične značilnosti med drugimi skupinami najverjetneje nismo dosegli zaradi majhnega števila bolnikov. Slika 1 prikazuje povprečje odstotkov mutiranega alela *JAK2* V617F. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da delež mutiranega alela najverjetneje vpliva na fenotip bolezni. Prav tako smo ugotovili statistično značilno ( $p < 0,001$ ) korelacijo med odstotkom mutiranega alela in številom trombocitov. Slika 2 prikazuje korelacijo med odstotkom mutiranega alela in številom levkocitov. Podobna korelacija se sicer nakazuje tudi za število trombocitov in vrednost hemoglobina, vendar ni statistično značilna. Pri obdelavi podatkov smo obravnavali samo tiste bolnike s prisotno mutacijo, ki se ne zdravijo. Bolnike z večjim številom trombocitov in večjimi vrednostmi hemoglobina običajno zdravimo. Tako ima 67 % bolnikov s PRV v našem vzorcu normalno vrednost hemoglobina, ker se zdravijo. S tem izgubimo večino bolnikov s huje potekajočo boleznijo in z večjimi vrednostmi hemoglobina. Podobno se zdravi tudi 25 % bolnikov z ET, in sicer bolniki z največjimi vrednostmi števila trombocitov. To je verjetno razlog, zakaj nismo dosegli statistične značilnosti za korelacijo med odstotkom mutiranega alela z večjo vrednostjo hemoglobina in manjšim številom trom-

bocitov. Dobljeni rezultati potrjujejo podatke iz literature.<sup>8-11</sup>

Dobljeni rezultati in podatki iz literature dopuščajo nadaljnjo razpravo. Tako je možno, da KMPB predstavlja enovito bolezen z različnim kliničnim fenotipom. Odstotek mutiranega alela *JAK2* V617F pa sovpada z večjimi vrednostmi levkocitov (naši rezultati), manjšim številom trombocitov in večjimi vrednostmi hemoglobina (podatki iz literature). Ob nizkem odstotku mutiranega alela se bolezen izrazi kot ET, medtem ko se pri večjem deležu mutiranega alela izrazi kot PRV ali KIMF (Sl. 1). Prav tako moramo omeniti bolnike, pri katerih ne najdemo mutacije v genu *JAK2*. Naši podatki<sup>7</sup> kažejo na pomembno razliko med bolniki z ET s prisotno in odsotno mutacijo v genu *JAK2*. Bolniki s prisotno mutacijo imajo večje vrednosti hemoglobina in manjše število trombocitov.<sup>7</sup> Pri bolnikih z odsotno mutacijo *JAK2* V617F je verjetno prisotna druga mutacija, ki povzroči klonsko rast celic. V naravnem poteku KMPB verjetno obstaja nepoznana mutacija, ki povzroči nenadzorovano rast celic. Ob pojavu novih mutacij, vključno s poznano mutacijo *JAK2* V617F, pa pride do značilnega fenotipa bolezni. Opisan stopenjski razvoj KMPB sovpada z uveljavljeno tezo o nastanku rakavih bolezni.

Obstajajo podatki o pomenu mutacije *JAK2* V617F za napoved bolezni. Zaradi značaja naše raziskave, ki je bila presečna raziskava in ne prospektivna, na ta problem ne moremo odgovoriti. Prav tako je število zapletov pri KMPB relativno majhno, tako da bi za doseglo statističnega pomena potrebovali bistveno večje skupino opazovanih bolnikov. Potencialno je kvantitativna določitev mutacije *JAK2* V617F pomembna za sledenje bolezni in učinka zdravljenja. Tako med zdravljenjem pri bolnikih s PRV pride do manjšanja odstotka mutiranega alela.<sup>13,14</sup> Pri majhnem številu bolnikov so ugotovili tudi popolno molekularno remisijo bolezni z odsotnostjo mutiranega alela celo po prekinitvi zdravljenja (osebna komunikacija Hans Carl Hasselbalch).<sup>14</sup>

## Zaključki

Z raziskavo smo v Specializirani hematološki laboratorij Kliničnega oddelka za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana uvedli kvantitativno določevanje mutacije *JAK2* V617F. Potrdili smo različen odstotek mutacije pri bolnikih z ET, s PRV in KIMF ter pomen mutacije za krvno sliko. Možno je, da gre pri KMPB za enovito bolezen z različnimi fenotipi bolezni glede na odstotek mutiranega alela *JAK2* V617F. Metoda zaradi nezadostnih podatkov o kliničnem pomenu sledenja bolezni zaenkrat še ni uporabna za vsakdanje klinično vodenje bolnikov s KMPB. Potrebne bodo dodatne prospektivne raziskave, ki bodo pokazale pomen sledenja bolnikov s to metodo.

## Literatura

1. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006; 355: 2452-66.

2. Bennett M, Stroncek DF. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Translat Med* 2006; 4: 41.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054–61.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain of function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779–90.
5. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 533–7.
6. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The *JAK2*-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 1865–7.
7. Vuckovic J, Pajič T, Kušec R, Grat M, Lorbek M, Rogulj D, et al. Klinični pomen mutacije V617F *JAK2* gena pri kroničnih mieloproliferativnih boleznih – prve izkušnje. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 629–34.
8. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of *JAK2* V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008; 93: 41–8.
9. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P. Clinical profile of homozygous *JAK2* V617F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007; 110: 840–6.
10. Rudzki Z, Sacha T, Stój A, Czekalska S, Wójcik M, Skotnicki AB, et al. The gain-of-function *JAK2* V617F mutation shifts the phenotype of essential thrombocythemia and chronic idiopathic myelofibrosis to more »erythremic« and less »thrombocytotoxic«: a molecular, histologic, and clinical study. *Int J Hematol* 2007; 86:130–6.
11. Larsen TS, Pallisgaard N, Müller MB, Hasselbalch HC. The *JAK2* V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis – impact on disease phenotype. *Eur J Haematol* 2007; 79: 508–15.
12. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292–302.
13. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 104: 2037–40.
14. Larsen TS, Bjerrum OW, Pallisgaard N, Andersen MT, Møller MB, Hasselbach HC. Sustained major molecular response in polycythemia vera treated with interferon alpha-2b. (v tisku)

---

Prispelo 2008-02-26, sprejeto 2008-03-04