

Виявлення мутації *V617F* гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні неоплазми

М. В. Дибков, І. Р. Гартовська¹, С. С. Малюта, Г. Д. Телегєєв

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

¹Київський обласний онкодиспансер МОЗ України
Вул. Багговутівська, 1а, Київ, Україна, 04107

m.v.dybkov@imbg.org.ua

Мета. Створити протокол, який дозволяє виявляти мутацію *V617F* гена *jak2* у зразках РНК хворих на хронічні мієлопроліферативні неоплазми, що неохідно для уніфікації процедур аналізу зразків крові згідно з чинними критеріями ВОЗ для даної групи захворювань. **Методи.** Мутацію визначали за допомогою зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції та прямого секвенування продуктів полімеразної ланцюгової реакції. **Результати.** Проаналізовано шість зразків крові хворих на справжню поліцитемію і у всіх випадках виявлено мутацію *V617F*. Дану мутацію не знайдено в жодному з контрольних зразків РНК здорових донорів. Описано випадок одночасного виявлення мутації *V617F* та злитого гена *bcr/abl* у хворій на хронічну мієлоїдну лейкемію. **Висновки.** Запропонований метод дозволяє визначати мутацію *V617F*, що дає змогу використовувати його для молекулярно-генетичної диференційної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Ключові слова: *jak2*, *V617 F*, мієлопроліферативні неоплазми.

Вступ. Згідно з ревізією 2008 року, у класифікації ВОЗ запропоновано замінити термін «хронічні мієлопроліферативні захворювання» на новий – «мієлопроліферативні неоплазми» (myeloproliferative neoplasms, MNP). Мієлопроліферативні неоплазми поділяють на дві групи – класичні (хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ, CML), справжня поліцитемія (СП, PV), есенціальна тромбоцитемія (ЕТ), ідіопатичний мієлофіброз (ІМФ, CIMF)) та некласичні (атипова ХМЛ, хронічна нейтрофільна лейкемія (ХНЛ), хронічна еозинофільна лейкемія/гіпероезिनотільний синдром, ХМН некласифікована) [1].

Окрім зміни назви даної групи патологій, важливішим є вдосконалення діагностичних критеріїв, насамперед більш широке використання молекулярно-генетичних маркерів.

Відомо, що серед мієлопроліферативних захворювань лише для ХМЛ описано чіткий цитогенетичний маркер – філадельфійську хромосому і на молекулярному рівні – ген *bcr/abl*. Однак у 2005 році кілька груп дослідників [2–6] описали точкову мутацію G T у 14-му екзоні гена *jak2*, що призводить до заміни валіну на фенілаланін у позиції 617 (*V617F*). Дана мутація виявляється у 90–95 % хворих на СП і приблизно у 50 % хворих на ЕТ та ІМФ. Вважають, що на функціональному рівні така заміна спричиняє втрату регуляції та конститутивної активації JAK2-тирозинкінази. Це, в свою чергу, викликає втрату регуляції JAK-STAT-сигнального шляху і відповідно посилення транскрипційної активності клітини і збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів і гранулоцитів.

Окрім мутації *V617F*, описано низку змін у 12-му екзоні гена *jak2* (K539L, H538QK539L,

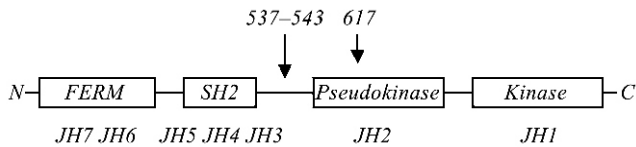


Рис. 1. Структура білка JAK2 та локалізація мутацій. Домени: JH6–JH7 – FERM гомологічний (F – з білком 4.1, E – езрином, R – радиксином, M – мезином); JH3–JH5 – SH2 (SRC2 гомологічний); JH2 – Pseudokinase (псевдокіназний); JH1 – Kinase (тирозинкіназний). Стрілками позначено локалізацію мутацій (номери амінокислотних залишків)

F537–K539delinsL тощо) [7] – переважно у хворих на СП (до 5 %). Структуру білка JAK2 та локалізацію мутацій наведено на рис. 1.

Хоча, як випливає з вищезазначеного, мутація *V617F* не є специфічною для якогось одного захворювання, вона виконує роль важливого діагностичного критерію. Так, її наявність виключає вторинну поліцитемію (secondary polycythaemia), реактивний тромбоцитоз (reactive thrombocytosis) чи вторинний фіброз кісткового мозку (secondary bone marrow fibrosis). Відсутність мутації у хворих на поліцитемію вимагає пошуку іншої причини виникнення еритроцитозу.

У хворих на ЕТ та ІМФ, як зазначено вище, мутацію виявляють у 50 % випадків, що також є сильним діагностичним критерієм. Однак варто застерегти, що виявлення мутації – це важливий, але не самодостатній критерій у діагностиці мієлопроліферативних неоплазм. Тому лише в комплексі з клінічними та лабораторними методами (насамперед аналіз клітин кісткового мозку для виключення фіброзів, дисплазій, присутності бластних клітин і додаткових хромосомних аномалій) можлива діагностика кожного випадку. Пропозиції вдосконалення критеріїв для даної групи захворювань наведено у публікаціях [8–10].

Матеріали і методи. У роботі використано (за інформованої згоди) зразки крові хворих, що проходили лікування в гематологічних клініках Києва. РНК отримували за методом [11]. Реакційна суміш для синтезу кДНК містила 1–3 мкг РНК, 1 буфер для зворотної транскриптази, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer («Fermentas», Литва), 300 од. зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase («Fermentas»), 20 од. РНазину («Promega», США), 1 мМ dNTP. Реакцію проводи-

ли за температури 42 °С протягом 1 год і зупиняли прогріванням (70 °С, 10 хв), 2 мкл реакційної суміші використовували для ампліфікації. ПЛР проводили з використанням специфічних праймерів, які підбирали за допомогою програми Generun:

J1F – 5'-CACCAACATTACAGAGGCCTAC-3';

J1R – 5'-GCCAGGATCACTAAGTTTGATG-3' (довжина ампліфікату – 536 п. н.);

J2F – 5'-CGGTCAACTGCATGAAACAG-3',

J2R – 5'-TTGGCACATACATTTCCCATG-3' (довжина ампліфікату – 321 п. н.).

ПЛР здійснювали в об'ємі 30 мкл упродовж 30 циклів (94 °С – 35 с; 55 °С – 35 с; 72 °С – 45 с), використовуючи 10 пмоль праймерів J1F і J1R.

Для контролю синтезу кДНК застосовували праймери для виявлення β -актину (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3' і 5'-CAAACATGATCTGGTTCATCTTCTC-3') («Invitrogen», США) та/або 18S рРНК (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' і 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'). Продукти ампліфікації аналізували у 2 %-му агарозному гелі.

Щоб підтвердити специфічність та в разі недостатньої кількості ампліфікату для секвенування проводили другий етап ПЛР із використанням 0,5 мкл отриманого ампліфікату та 10 пмоль праймерів J2F і J2R.

Отримані продукти ПЛР очищували за допомогою QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», США) або екстракції хлороформом і пересадження етанолом та секвенували, використовуючи праймери J2F і J2R. Отримані послідовності аналізували із застосуванням програм BioEdit і BLAST.

Результати і обговорення. Мутацію *V617F* гена *jak2* виявляли за допомогою зворотно-транскриптазної (ЗТ) ПЛР і прямим секвенуванням продуктів ПЛР у хворих на мієлопроліферативні неоплазми. Хоча виявлення мутації можливе і без зворотної транскрипції, однак, згідно з діагностичними критеріями ВОЗ, у таких хворих необхідно визначити ще й злитий ген *bcr/abl*. Внаслідок особливостей будови зазначеного гена для цього потрібна ЗТ-ПЛР, тому ми вважаємо за доцільне не виділяти окремо РНК і ДНК, а об'єднати процедури виділення РНК і отримання кДНК для виявлення як мутації гена *jak2*, так і злитого гена *bcr/abl*. Окрім того, для мажорної мутації *V617F* описано цілу низку мута-

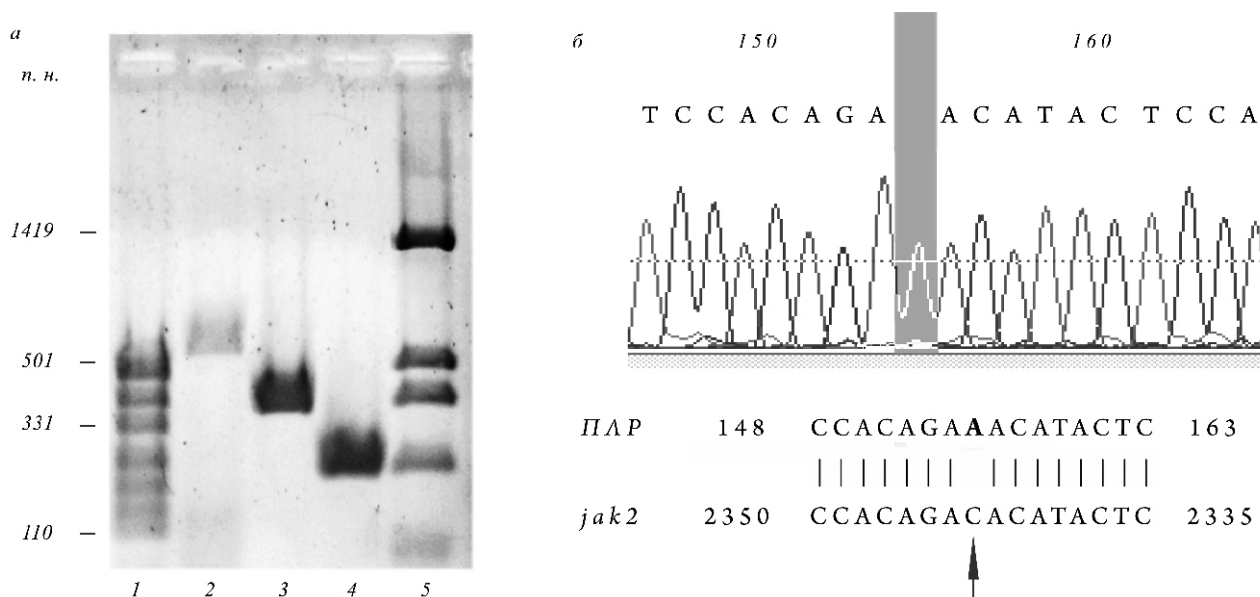


Рис. 2. Електрофореграма (а) та фрагмент послідовності (б) продукту ПЛР, отриманого при дослідженні крові хворого Б. (а: 1 – маркер молекулярних мас *pUC19/MspI*; 2 – продукт ПЛР крові хворого Б.; 3, 4 – позитивний контроль ЗТ-ПЛР (відповідно -актин та 18S rRNA); 5 – маркер молекулярних мас *pUC19/HinfI*; б: інверсією виділено заміну, що відповідає мутації *V617F*. Нумерація нуклеотидів гена *jak2* згідно з послідовністю NM_004972.2 (*Homo sapiens* Janus kinase 2))

цій у позиціях 607, 611, 616, 619 білка JAK2, які також порушують функціонування гена *jak2*, а секвенування дозволяє виявляти і такі варіанти.

Хворий Б., 1950 року народження, страждає на справжню поліцитемію з 1998 р. На рис. 2 представлено електрофореграму та фрагмент послідовності продукту ПЛР, отриманого при дослідженні його крові. Як видно з цього рисунку, при проведенні пошуку гомології послідовності продукту ПЛР з мРНК *jak2* (NM_004972.2 *Homo sapiens* Janus kinase 2) за допомогою програми BLAST виявлено заміну С А в позиції 2343. Така заміна на рівні білка спричиняє заміну валіну в позиції 617 на фенілаланін, тобто має місце мутація *V617F*.

Загалом проаналізовано шість зразків крові хворих на СП і в усіх випадках виявлено мутацію *V617F* (у трьох з них мутація була гетерозиготною). Дану мутацію не знайдено в жодному з п'яти контрольних зразків РНК здорових донорів.

На сьогодні описано лише кілька випадків мутації *V617F* у хворих на ХМЛ. Однак при аналізі крові хворої Г., 1938 року народження, у якої наявність філадельфійської хромосоми підтверджено виявленням злитого гена *bcr/abl* за допомогою ЗТ-ПЛР, згідно з методичними рекомендаціями [12], знайдено і мутацію *V617F*.

Як зазначено вище, відомо лише про одиничні випадки мутації в гені *jak2*, через це природа такого явища лишається нез'ясованою. Розглядають два основних варіанти: мутації одночасно виявляються внаслідок присутності двох різних клонів, кожен з яких несе одну мутацію [13, 14], або ж обидві мутації локалізовані в одному клоні, причому мутація в гені *jak2* передують утворенню химерного гена *bcr/abl* [15, 16]. Однак обидва припущення вимагають подальших досліджень.

Наведені дані свідчать про ефективність запропонованого протоколу для виявлення мутації *V617F* за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого секвенування, що дає змогу використовувати його для молекулярно-генетичної диференційної діагностики мієлопроліферативних неоплазм.

Роботу частково підтримано завдяки науковому проекту НАН України № 5/2007 «Вивчення молекулярно-генетичних порушень при неоплазіях крові та розробка підходів для їх діагностики і застосування у клінічній практиці» і науково-технічному (інноваційному) проекту НАН України № 15/2008 «Створення і впровадження у медичну практику тест-систем для диференційної діагностики і моніторингу мієлопроліферативних захворювань з мутацією *Jak2V617F* і *bcr/abl*-перебудовою».

M. V. Dybkov, I. R. Gartovska, S. S. Maliuta, G. D. Telegeev

Detection of V617F mutation of gene jak2 at patients with chronic myeloproliferative neoplasms

Summary

The aim of the work was to create a protocol for detecting the V617F mutation of the gene jak2 in samples of patients with chronic myeloproliferative neoplasm which is necessary to unify the procedures of the analysis of blood samples according to WHO criteria for this group of diseases. **Methods.** Mutation was revealed using reverse transcriptase PCR and direct sequencing of PCR products. **Results.** Six samples of blood of patients with polycythemia vera were analyzed and the mutation V617F was detected in all six cases. This mutation was not detected in any of RNA samples of healthy donors. A case of simultaneous detection of mutations V617F and fused bcr/abl gene in CML patient was described. **Conclusions.** The proposed method for detecting the V617F mutation allows molecular genetic differential diagnosis of myeloproliferative neoplasm as well.

Keywords: Jak2, V617 F, myeloproliferative neoplasms.

M. B. Дыбков, И. Р. Гартовская, С. С. Малиута, Г. Д. Телегеев

Выявление мутации V617F гена jak2 у больных с хроническими миелолипролиферативными неоплазмами

Резюме

Цель. Создание протокола для выявления мутации V617F гена jak2 в образцах РНК больных с хроническими миелолипролиферативными неоплазмами, что необходимо для унификации процедур анализа образцов крови согласно настоящим критериям ВОЗ для данной группы заболеваний. **Методы.** Мутацию определяли с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции и прямого секвенирования продуктов ПЦР. **Результаты.** Проанализированы шесть образцов крови больных истинной полицитемией и во всех случаях обнаружена мутация V617F. Эта мутация не найдена ни в одном из контрольных образцов РНК здоровых доноров. Описан случай одновременного выявления мутации V617F и слитого гена bcr/abl у больной с хронической миелоидной лейкоемией. **Выводы.** Предложенный метод позволяет определять мутацию V617F, его также можно использовать для молекулярно-генетической дифференциальной диагностики миелолипролиферативных неоплазм.

Ключевые слова: jak2, V617 F, миелолипролиферативные неоплазмы.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tefferi A., Vardiman J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms // *Leukemia*.—2008.—**22**, N 1.—P. 14–22.
2. Baxter E. J., Scott L. M., Campbell P. J., East C., Fourouclas N., Swanton S., Vassiliou G. S., Bench A. J., Boyd E. M., Curtin N., Scott M. A., Erber W. N., Green A. R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // *Lancet*.—2005.—**365**, N 9464.—P. 1054–1061.
3. Kralovics R., Passamonti F., Buser A. S., Teo S. S., Tiedt R., Passweg J. R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R. C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // *N. Engl. J. Med.*—2005.—**352**, N17.—P. 1779–1790.
4. Levine R. L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B. L., Wernig G., Huntly B. J., Boggon T. J., Wlodarska I., Clark J. J., Moore

S., Adelsperger J., Koo S., Lee J. C., Gabriel S., Mercher T., D'Andrea A., Frohling S., Dohner K., Marynen P., Vandenberghe P., Mesa R. A., Tefferi A., Griffin J. D., Eck M. J., Sellers W. R., Meyerson M., Golub T. R., Lee S. J., Gilliland D. G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell*.—2005.—**7**, N 4.—P. 387–397.

5. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S. B., Zhao Z. J. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J. Biol. Chem.*—2005.—**280**, N 24.—P. 22788–22792.
6. James C., Ugo V., Le Couedic J. P., Delhommeau F., Lacout C., Garcon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J. L., Constantinescu S. N., Casadevall N., Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // *Nature*.—2005.—**434**.—P. 1144–1148.
7. Scott L. M., Tong W., Levine R. L. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis // *N. Engl. J. Med.*—2007.—**356**, N 5.—P. 459–468.
8. Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka H. M., Barbui T., Hanson C. A., Barosi G., Verstovsek S., Birgegard G., Mesa R., Reilly J. T., Gisslinger H., Vannucchi A. M., Cervantes F., Finazzi G., Hoffman R., Gilliland D. G., Bloomfield C. D., Vardiman J. W. 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**, N 4.—P. 1092–1097.
9. Spivak J. L., Silver R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: an alternative proposal // *Blood*.—2008.—**112**, N 2.—P. 231–239.
10. Lisenko D. A. Modern classifications of myeloproliferative disorders: standards and improvement tendencies // *Oncology (ukr)*.—2008.—**10**, N 2.—P. 213–216.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*—1987.—**162**, N 1.—P. 156–159.
12. Telegeev G. D., Dybkov M. V., Bozhko M. V., Demydenko D. V., Maliuta S. S., Tretiak N. M., Bondar M. V. Monitoring of chronic myelogenous by molecular-biology methods (practical recommendation) // *Resp. Centre of Sci. Med. Inform.*—Kyiv, 1997.—16 p.
13. Hussein K., Bock O., Seegers A., Flasshove M., Henneke F., Buesche G., Kreipe H. H. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation // *Blood*.—2007.—**109**, N 9.—P. 4106–4107.
14. Busche G., Hussein K., Bock O., Kreipe H. Insights into JAK2-V617F mutation in CML // *Lancet Oncol.*—2007.—**8**, N 10.—P. 863–864.
15. Kramer A., Reiter A., Kruth J., Erben P., Hochhaus A., Muller M., Cross N. C., Jones A. V., Ho A. D., Hensel M. JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia // *Lancet Oncol.*—2007.—**8**, N 7.—P. 658–660.
16. Bocchia M., Vannucchi A. M., Gozzetti A., Guglielmelli P., Poli G., Crupi R., Defina M., Bosi A., Francesco L. Insights into JAK2-V617F mutation in CML // *Lancet Oncol.*—2007.—**8**, N 10.—P. 864–866.

УДК 577.2 : 616–006
Надійшла до редакції 30.10.09