

*Agata Wieczorkiewicz-Kabut, Grzegorz Helbig, Krzysztof Woźniczka,
Małgorzata Sobczyk-Kruszelnicka, Sławomira Kyrzcz-Krzemień

Znaczenie kliniczne mutacji JAK2 V617F u pacjentów w fazie przewlekłej włóknienia szpiku

Clinical correlates of JAK2 V617F point mutation in patients with chronic phase of myelofibrosis

Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrzcz-Krzemień

Streszczenie

Wstęp. Mutacja punktowa JAK2V617F występuje u około 50-60% pacjentów z włóknieniem szpiku (MF). Znaczenie kliniczne JAK2V617F w MF nie jest do końca poznane i wymaga dalszych badań.

Materiał i metody. Badanie obecności mutacji JAK2 wykonano u 77 pacjentów, 41K/36M, w medianie wieku 61 lat (zakres 19-81). Analizie poddano 42 chorych z pierwotnym włóknieniem szpiku (PMF), 16 z włóknieniem poprzedzonym nadkrwistością prawdziwą (post-PV MF) i 19 z włóknieniem poprzedzonym nadpłytkowością samoistną (post-ET MF). Badanie mutacji JAK2 wykonano z DNA granulocytów krwi obwodowej z zastosowaniem dyskryminacji allelicznej polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) przy użyciu testu MutaScreen™.

Wyniki. Mutację JAK2 wykryto u 55% pacjentów, z tego w PMF/post-PV MF/post-ET MF odpowiednio u 50, 88 i 37% chorych. Homozygotyczność JAK2 wykazano u 24 (57%) pacjentów, a heterozygotyczność u 18 (43%). Mediana liczby zmutowanych alleli wynosiła 22 (zakres 2-96). Homozygotyczność JAK2 znamiennej częściej występowała u kobiet, charakteryzowała się wyższą liczbą leukocytów oraz tendencją do wyższego stężenia hemoglobiny. Nie wykazano różnic w całkowitym przeżyciu pomiędzy pacjentami JAK2(-) i JAK2(+) oraz pomiędzy hetero- i homozygotami JAK2.

Wnioski. Potwierdzono obecność mutacji JAK2 u 50-60% chorych z włóknieniem szpiku. Mutacja JAK2 częściej występowała u chorych z post-PV MF. Nie wykazano korelacji pomiędzy statusem mutacji JAK2 a całkowitym przeżyciem.

Słowa kluczowe: włóknienie szpiku, JAK2V617F, homozygota, heterozygota, przeżycie

Summary

Introduction. Point mutation JAK2V617F occurs in 50-60% of patients with myelofibrosis (MF). Its clinical role is unclear and requires further studies.

Material and methods. Seventy seven patients were included in the study, 41F/36M, at median age of 61 (range 19-81). Forty two patients were diagnosed with primary myelofibrosis (PMF), 16 with post-polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF) and 19 with post-essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF). The JAK2V617F mutation was detected using allelic discrimination semi-quantitative real time polymerase chain reaction (test MutaScreen™) from DNA of granulocytes from peripheral blood.

Results. A total of 55% studied patients were JAK2-positive. The mutation was present in 50.88 and 37% of patients with PMF, post-PV MF and post-ET MF, respectively. JAK2 homozygosity was found in 57% of patients and heterozygosity in 43%. The median allele burden was 22 (range 2-96). JAK2 homozygosity was found to be seen more frequently in females, with higher white blood cell count and with tendency for higher hemoglobin concentration. There was no difference in overall survival between JAK2-positive and JAK2-negative patients as well as between homozygotes and heterozygotes.

Conclusions. The presence of JAK2 mutation was demonstrated in 50-60% of patients with MF. It occurs more frequently in patients with post-PV MF. The correlation between JAK2 mutation status and overall survival was not found.

Key words: myelofibrosis, JAK2V617F, homozygous, heterozygous, survival

WSTĘP

Pierwotne włóknienie szpiku (PMF) jest rzadkim nowotworem mieloproliferacyjnym charakteryzującym się pancytopenią, leukoerytroblastozą w krwi obwodowej, włóknieniem szpiku oraz pozaszpikową hemato-

pozę, której wynikiem jest powiększenie śledziony i wątroby (1). Nowe spojrzenie na etiopatogenezę włóknienia szpiku (MF) związane jest z odkryciem w 2005 roku mutacji JAK2V617F, która odpowiedzialna jest za nadwrażliwość komórek na cytokiny, niepoHAMowane

pobudzenie drogi sygnałowej JAK2-STAT i występuje u około 65% pacjentów z PMF (2, 3). Dotychczas opublikowane wyniki analiz nie pozwalają na jednoznaczne określenie różnic w obrazie klinicznym pomiędzy chorymi MF JAK2(+) i JAK2(-).

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Analizie prospektywno-retrospektywnej poddano 77 pacjentów z rozpoznaniem włóknienia szpiku pierwotnym (PMF) oraz poprzedzonym nadkrwistością prawdziwą (post-PV MF) lub nadpłytkowością samoistną (post-ET MF), leczonych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w latach 2006-2010. Do badania włączono pacjentów z PMF zgodnie z kryteriami diagnostycznymi WHO z 2008 roku oraz z post-PV/ET MF zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Grupy Roboczej do Badania i Leczenia Włóknienia Szpiku (IWG-MRT) (4, 5). Aktualną analizą objęto 41 kobiet i 36 mężczyzn w medianie wieku 61 lat (zakres 19-81 lat). Szczegółową charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów włączonych do badania.

Parametr	Liczba chorych (n = 77)
Wiek (lata) mediana/zakres	61 (19-81)
Płeć (K/M) n (%)	41 (53%)/36 (47%)
Rozpoznanie (PMF/MF post-PV lub ET) n (%)	42 (55%)/35 (45%)
Stężenie hemoglobiny (g/dl) mediana/zakres	10,2 (5,8-20,0)
Retikulocytoza (%) mediana/zakres	2,5 (1,1-5,8)
Hematokryt (%) mediana/zakres	31 (18-60)
Liczba krwinek czerwonych ($\times 10^9/\mu\text{l}$) mediana/zakres	3,56 (1,69-7,3)
Liczba płytek krwi ($\times 10^9/\text{l}$) mediana/zakres	256 (18-1413)
PLT ≥ 400 n (%)	22 (28%)
Liczba krwinek białych ($\times 10^9/\text{l}$) mediana/zakres	8,1 (0,7-69,5)
WBC ≥ 10 n (%)	31 (40)
Mieloblasty we krwi obwodowej ($\times 10^9/\text{l}$) mediana/zakres	1 (0-16)
Mieloblasty w szpiku (%) mediana/zakres	2 (1-15)
Erytoblasty we krwi obwodowej (%) mediana/zakres	2 (0-20)
Monocytoza we krwi obwodowej ($\times 10^9/\text{l}$) mediana/zakres	0,4 (0,0-7,8)
Aktywność LDH (IU)/ $> N$ (%) mediana/zakres	466 (126-2632)/88%
Stężenie B2M ($\mu\text{g/ml}$)/ $> N$ (%) mediana/zakres	3250 (1028-16065)/64%
Stężenie żelaza ($\mu\text{mol/l}$)/ $< N$ (%) mediana/zakres	12,4 (2,1-44,9)/2%

Skróty: PLT – liczba płytek krwi, WBC – liczba krwinek białych, LDH – dehydrogenaza kwasu mlekowego, B2M-beta2 mikroglobulin.

Badania diagnostyczne

Oznaczenie mutacji JAK2V617F wykonano z DNA wyizolowanego z granulocytów krwi obwodowej przy zastosowaniu DNA Isolation Kit (High Pure PCR, Roche, Niemcy) z wykorzystaniem półilościowej, polimerazowej reakcji łańcuchowej (RQ-PCR), opartej na dyskryminacji allelicznej. Wykazanie $> 2\%$ ilości zmutowanych alleli uznawano za wynik pozytywny. Homozygotyczność ustalono przy obecności zmutowanych alleli powyżej 50%. Badanie wykonano przy użyciu zestawu MutaScreen™ firmy Ipsogen (Marsylia, Francja).

Metody analizy statystycznej

Ponieważ rozkład większości zmiennych różnił się istotnie od rozkładu normalnego (test Kołmogorowa-Smirnowa, $p < 0,05$), do ich opisu stosowano medianę (zakres), a do weryfikacji hipotez – testy nieparametryczne. W przypadku zmiennych numerycznych, różnice pomiędzy podgrupami analizowano z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya. Prawdopodobieństwo przeżycia szacowano metodą Kaplana-Meiera (Kaplan-Meier Stat Med). Zależności pomiędzy dwiema zmiennymi numerycznymi badano z użyciem testu korelacji rang Spearmana. Różnice i zależności, dla których wartość p wyniosła $< 0,05$ uznawano za statystycznie istotne (6, 7).

WYNIKI

Spośród 77 pacjentów poddanych analizie, u 42 (54%) rozpoznano samoistne włóknienie szpiku, u 16 (46%) włóknienie poprzedzone nadkrwistością prawdziwą i u 19 (54%) włóknienie poprzedzone nadpłytkowością samoistną. Mutacja punktowa JAK2V617F była obecna u 42 pacjentów (55%), z tego u chorych z PMF ($n = 42$) występowała w 50% przypadków ($n = 21$), u chorych z post-PV MF ($n = 16$) w 88% ($n = 14$), podczas gdy w grupie post-ET ($n = 19$) tylko u 37% chorych ($n = 7$). U 18 chorych (43%) liczba zmutowanych alleli wynosiła $< 50\%$, natomiast u pozostałych 24 (57%) $\geq 50\%$. Mediana liczby zmutowanych alleli wynosiła 22 (2-96).

Porównanie pacjentów z MF JAK2(+) z chorymi z MF JAK2(-)

Nie wykazano znamienych różnic badanych parametrów pomiędzy pacjentami z mutacją JAK2 i bez tej mutacji, z wyjątkiem wyższej komórkowości szpiku w pierwszej grupie chorych: mediana 80% (zakres 20-100) versus 70% (zakres 20-100); $p = 0,03$. Mutacja JAK2 występowała z taką samą częstością u chorych z PMF ($n = 21$) i post-PV/ET MF ($n = 21$). Nie wykazano korelacji pomiędzy obecnością mutacji JAK2 a płcią, wiekiem, wielkością wątroby, śledziony, stężeniem hemoglobiny, liczbą leukocytów, krwinek czerwonych i płytek krwi, liczbą mieloblastów we krwi obwodowej i odsetkiem blastów w szpiku, aktywnością LDH, stopniem i fazą włóknienia szpiku oraz zakrzepicą. Mediana czasu obserwacji dla chorych bez mutacji JAK2 wynosiła 36,4 miesiąca

(zakres 2,5-142,1), dla heterozygot – 17,3 miesiąca (zakres 3,6-206,4), a dla homozygot – 16,4 miesiąca (zakres 4,1-47,9).

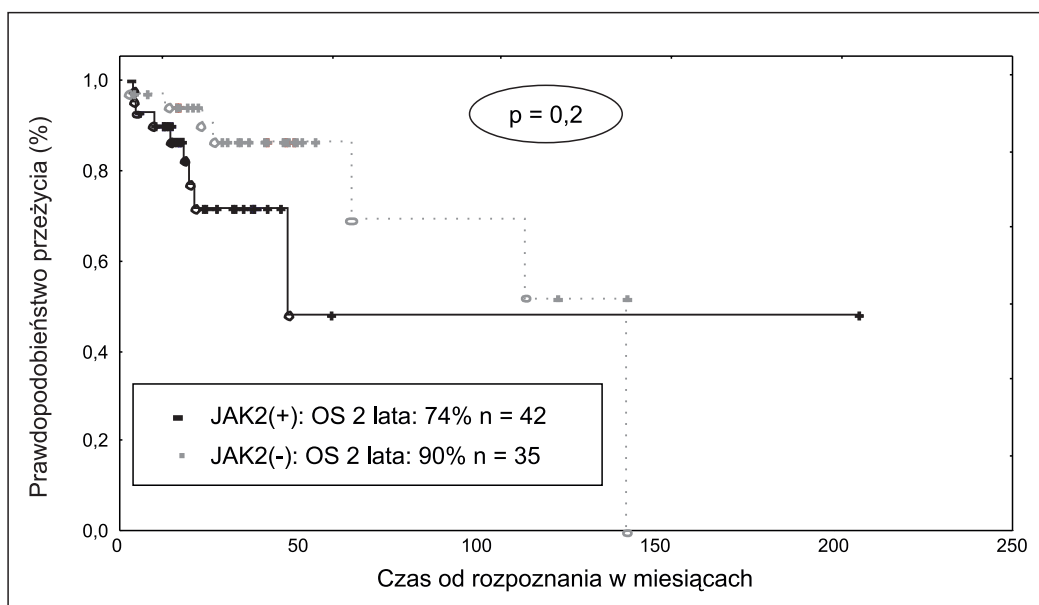
Analiza pacjentów z MF i liczbą zmutowanych alleli JAK2 \geq i $<$ 50%

U 24 chorych wykazano liczbę zmutowanych alleli JAK2 \geq 50%, podczas gdy u 18 pacjentów $<$ 50%. U chorych z PMF znamiennie częściej występowała heterozygotyczność (13 vs 8 chorych), podczas gdy homozygoty częściej wykrywano u pacjentów z post-PV/ET MF (16 vs 5 pacjentów); $p = 0,01$. Wykazano także, że heterozygotyczność JAK2 znamiennie częściej występowała u kobiet, charakteryzowała się wyższą liczbą leukocytów w momencie diagnozy oraz tendencją do wyższego stężenia hemoglobiny.

DYSKUSJA

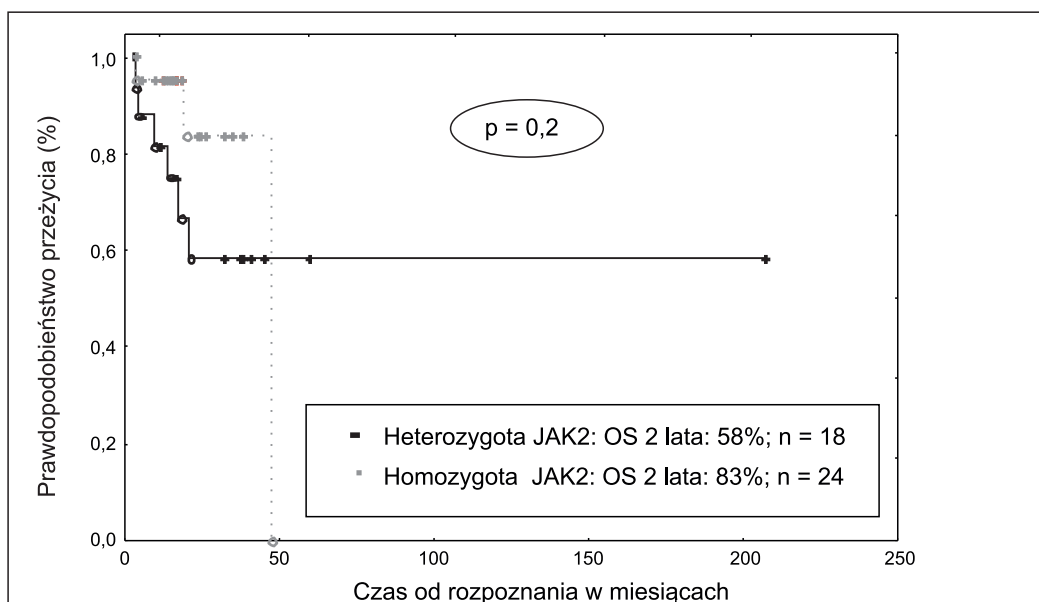
W przedstawionej pracy dokonano analizy dużej grupy chorych z włóknieniem szpiku, biorąc pod uwagę rzadkie występowanie tej jednostki chorobowej. Wykorzystując metody biologii molekularnej oszacowano częstość występowania mutacji JAK2V617F w badanej grupie, jak również dokonano analiz porównawczych populacji z i bez obecności mutacji JAK2. Analizie poddano grupę 77 chorych (41 kobiet i 36 mężczyzn, w medianie wieku 61 lat) z pierwotnym włóknieniem szpiku ($n = 42$) i włóknieniem poprzedzonym czerwieńcą prawdziwą ($n = 16$) lub nadpłytkowością samoistną ($n = 19$). Mediana czasu obserwacji od momentu rozpoznania wynosiła 22,3 miesiąca (zakres 2,5-206 miesięcy). Szesnastu chorych (21%) zmarło w trakcie obserwacji. Najczęstszą przyczyną śmierci były

Ryc. 1. Prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów JAK2(+) vs JAK2(-).



Skróty: OS – całkowite przeżycie.

Ryc. 2. Prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów z włóknieniem szpiku i liczbą zmutowanych alleli JAK2 \geq i $<$ 50%.



powikłania wynikające z postępu choroby prowadzące do niewydolności szpiku, powikłania infekcyjne czy też progresja do ostrej białaczki szpikowej.

Częstość występowania mutacji JAK2V617F w populacji chorych z włóknieniem szpiku szacuje się na 50-60% (3), a jej znaczenie kliniczne w tej grupie pacjentów jest przedmiotem wielu aktualnie prowadzonych analiz. W prezentowanym badaniu mutacja JAK2V617F została wykryta u 42 (55%) spośród 77 zbadanych chorych z włóknieniem szpiku (heterozygotyczność występowała u 43%, a homozygotyczność u 57% pacjentów). U 16 chorych z post-PV MF (46%) mutacja JAK2 występowała w 88% przypadków ($n = 14$), podczas gdy wśród 19 (54%) chorych z post-ET MF tylko u 37% ($n = 7$). Nie wykazano różnicy w częstości występowania mutacji JAK2 pomiędzy populacją chorych z PMF, a post-PV/ET MF. Homozygotyczność wykrywano znacząco częściej u pacjentów z post-PV/ET MF, podczas gdy heterozygotyczność w grupie PMF. W dużej analizie obejmującej 157 chorych z włóknieniem szpiku, częstość mutacji JAK2 wynosiła 51%, a homozygotyczność częściej wykrywano u chorych z post-PV MF (66%). Poddając analizie tylko chorych z post-PV MF, częstość mutacji JAK2 może sięgać 90% i jest porównywalna z wynikami uzyskanymi dla chorych z PV (2, 8). Podobny odsetek ilości zmutowanych alleli JAK2 wynoszący 88% u chorych z post-PV MF, z czego 86% przypadków to homozygoty, uzyskano także w grupie pacjentów analizowanych w niniejszej pracy. U pacjentów z post-ET MF częstość wykrywania mutacji JAK2 również jest porównywalna do chorych z ET (2, 9). Dane dotyczące korelacji pomiędzy obecnością mutacji JAK2, a obrazem klinicznym są często sprzeczne, co może wynikać z niewielkiej populacji badanych chorych. Szczegółowa analiza chorych z PMF przeprowadzona przez Tefferi i wsp. (8) ($n = 117$) wykazała istotnie statystyczną zależność pomiędzy obecnością JAK2V617F, a starszym wiekiem w momencie rozpoznania, wywiadem zakrzepowym i świądem. W badaniu Campbell i wsp. (10) stwierdzono natomiast, że pacjenci JAK2(+) mieli wyższą liczbę krwinek białych i granulocytów oraz mniejsze zapotrzebowanie na preparaty krwiotopoczne w porównaniu z chorymi JAK2(-). Do innych wniosków doszła grupa badaczy z Mayo Clinic w Rochester, która po zbadaniu 199 chorych z PMF wykazała, że obecność mutacji JAK2 wiązała się ze starszym wiekiem w momencie rozpoznania choroby, wyższym odsetkiem chorych z liczbą płytek $> 100 \times 10^9/L$ i niższym odsetkiem blastów $> 3\%$ we krwi obwodowej (11). W obecnym opracowaniu wykazano różnicę w wyższej komórkowości szpiku u chorych JAK2(+) w stosunku do JAK2(-) oraz stwierdzono, że homozygotyczność JAK2 częściej jest obserwowana u kobiet, z wyższą liczbą białych krwinek w momencie rozpoznania i wyższym stężeniem hemoglobiny. Związek mutacji JAK2 z płcią żeńską został wykazany wcześniej przez Levine i wsp. (9) u chorych z PV, natomiast nie potwierdzono tego spostrzeżenia u pacjentów z PMF i post-PV MF (8). W niniejszej pracy wykazano związek pomiędzy

homozygotycznością JAK2, a płcią żeńską ($p = 0,05$). W innej analizie, która objęła 174 chorych z PMF ustalono, że chorzy z obecną mutacją V617F w porównaniu do pacjentów bez tej nieprawidłowości wykazywali wyższe stężenie hemoglobiny i częstsze występowanie świądu. Dodatkowo homozygotyczność JAK2 w porównaniu do heterozygotyczności wiązała się z niższą liczbą płytek krwi, wyższą liczbą leukocytów, znaczną wielkością śledziony i częstszą koniecznością zastosowania leczenia cytotoredukcyjnego (12). Podobne tendencje obserwowano w aktualnej pracy w odniesieniu do liczby leukocytów i stężenia hemoglobiny.

Jak dotąd jedynym badaniem, które potwierdziło związek pomiędzy obecnością mutacji JAK2, a krótszym przeżyciem chorych z PMF są wyniki przedstawione przez Campbell i wsp. (10) w oparciu o 152 chorych. Autorzy wykazali, że pacjenci JAK2(+) mieli ponad 3-krotnie większe ryzyko zgonu w porównaniu z grupą JAK2(-). W kolejnych badaniach wykazano znaczące statystycznie krótsze całkowite przeżycie i przeżycie bez transformacji do białaczki tylko w populacji heterozygot JAK2, podczas gdy przebieg choroby był podobny w populacjach homozygotycznej i przy braku mutacji (11, 12). Wyniki te pozostają jednak w sprzeczności z danymi grupy włoskiej GIMEMA, gdzie liczba zmutowanych alleli nie miała wpływu na przeżycie chorych, a jedynie homozygotyczność JAK2 wiązała się z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym i wyższym ryzykiem wystąpienia kryzy. Przyczyna tych rozbieżności jest trudna do wyjaśnienia i może być związana z heterogennością chorych włączonych do analizy (73). W aktualnym opracowaniu mediana czasu obserwacji dla chorych bez mutacji JAK2 wynosiła 36,4 miesiąca (zakres 2,5-142,1), dla heterozygot – 17,3 miesiąca (zakres 3,6-206,4), a dla homozygot – 16,4 miesiąca (zakres 4,1-47,9).

Oddzielnego omówienia wymaga populacja chorych z włóknieniem szpiku poprzedzonym nadkrwistością prawdziwą lub nadpłytkowością samoistną. Przedstawione dotychczas wyniki badań nie wykazały wpływu zarówno braku lub obecności mutacji JAK2, jak i liczby zmutowanych alleli na obraz kliniczny oraz rokowanie (14, 15). Spostrzeżenia autorów dotyczące roli mutacji JAK2 w rozwoju MF potwierdzono w ostatnio opublikowanej prospektywnej analizie obejmującej 338 pacjentów. Wykazano, że homozygotyczność JAK2V617F jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju włóknienia szpiku u chorych z PV (16). W aktualnej pracy analizowano łącznie 35 chorych zarówno z PV i ET. Nie wykazano różnicy w prawdopodobieństwie wystąpienia włóknienia szpiku pomiędzy chorymi JAK2+ i JAK2- (23 vs 14% po 15 latach).

WNIOSKI

W przedstawionej pracy potwierdzono obecność mutacji JAK2V617F u 50-60% chorych z włóknieniem szpiku. Mutacja ta częściej występowała u chorych z włóknieniem szpiku poprzedzonym nadkrwistością prawdziwą. Nie wykazano korelacji pomiędzy statusem mutacji JAK2 a całkowitym przeżyciem.

PIŚMIENNICTWO

1. Barosi G: Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2954-2970.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al.: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
3. 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.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
5. Barosi G, Mesa RA, Thiele J et al.: Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008; 22 (2): 437-438.
6. Giebel S, Lech-Marańda E, Czerw T et al.: Statistical analysis in haematopoietic stem cell transplantation. Recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. Part 1. Descriptive statistics. Kaplan-Meier survival analysis and related end-points. *Acta Haematol Pol* 2005; 36: 409-413.
7. Cox DR: Regression models and life tables. *J Royal Soc B* 1972; 34: 187-220.
8. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM et al.: The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 2005; 131: 320-8.
9. Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
10. Campbell PJ, Griesshammer M et al.: V617F mutation JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006; 107: 2098-2100.
11. Tefferi A, Lasho TL, Huang J et al.: Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, predicts inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008; 22: 756-761.
12. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009; 114: 1477-1483.
13. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M et al.: JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007; 110: 4030-6.
14. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L et al.: JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica* 2009; 94 (1).
15. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L et al.: Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol* 2009; 146 (5): 504-9.
16. Passamonti F, Rumi E, Pietra D et al.: A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 2010; 24 (9): 1574-9.

otrzymano/received: 04.05.2011
zaakceptowano/accepted: 09.06.2011

Adres/address:
*Agata Wieczorkiewicz-Kabut
Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dąbrowskiego 25; 40-032 Katowice
tel.: (32) 259-12-81, fax: (32) 255-49-85
e-mail: klinhem@sum.edu.pl