

CALR, JAK2 and MPL Genes Mutations in Myeloproliferative Neoplasms, Single Center Experience

Myeloproliferatif Neoplazilerde CALR, JAK2 ve MPL Gen Mutasyonlarının Sıklığının ve Birlikteliğinin Değerlendirilmesi; Tek Merkez Deneyimi

Taha BAHSİ¹, Tuğçe Nur Yiğenoğlu²

¹Sbü Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik

²Sbü Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji

Dergiye Ulaşma Tarihi: 17/10/2019 Dergiye Kabul Tarihi: 23/10/2019 Doi: 10.5505/aot.2019.03521

ÖZET

GİRİŞ ve AMAÇ: Philedelphia negatif Ph(-) myeloproliferatif neoplazilerin (MPN) tanısında klinik ve laboratuvar bulgularının yanında genetik testler çok önemlidir. Bunlar arasında JAK2 genindeki V617F mutasyonu en sık görülen genomik varyasyondur. Bunlara ek olarak MPL geninde W515L/K mutasyonunun ve CALR genindeki mutasyonların araştırılması da önem taşımaktadır. Çalışmamızda, MPN tanısı almış olan hastalarda retrospektif olarak JAK2 V617F, MPL W515L/K ve CALR mutasyon dağılımı ve sıklığı araştırıldı.

YÖNTEM ve GEREÇLER: MPN grubu hastalık tanısı ile başvuran 41 hastanın JAK2 V617F mutasyonu, MPL W515L/K mutasyonu ve CALR gen mutasyonlarına yönelik test sonuçları retrospektif olarak incelendi. Genetik parametreler real-time PCR cihazı ile analiz edildi.

BULGULAR: Tüm hastalarda JAK2 V617F mutasyon sıklığı %36, CALR mutasyon sıklığı %17 olarak bulunurken, MPL W515L/K mutasyonu hiçbir hastada gözlenmedi. MPN'nin alt gruplarını oluşturan; polisitemi vera, esansiyel trombositoz ve primer myelofibrosis gruplarında JAK2 V617F mutasyon sıklığı sırasıyla %67, %33 ve %25 olarak bulunurken; CALR mutasyon sıklığı ise %8, %29 ve %8 olarak bulundu. MPL W515L/K ise hiçbir grupta gözlenmedi.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Daha önce yapılan çalışmalarda Ph(-) MPN grubu hastalıklarda JAK2 V617F, MPL W515L/K ve CALR mutasyon sıklığının çok geniş aralıklarda olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, mutasyonların dağılımında etnisite ve epigenetik faktörlerin yanı sıra sigara, rakım gibi çevresel faktörlerin de etkisinin olduğunu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Myeloproliferatif Neoplazi, JAK2, MPL, CALR

ABSTRACT

INTRODUCTION: Genetic tests are very important for the diagnosis of Philedelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN), in addition to clinical findings and laboratory results. JAK2 V617F mutation is the most common genomic variation among these group of diseases. Otherwise, analysis of W515L/K mutation in MPL gene and CALR gene mutations is crucial. In this study, prevalence of JAK2 V617F, MPL W515L/K mutations and, spectrum and prevalence of CALR gene mutations were investigated in MPN patients.

METHODS: Genetic test results of JAK2 V617F mutation, MPL W515L/K mutation and CALR gene mutations of 41 MPN patients were analysed, retrospectively. Genetic parameters were performed with real-time PCR.

RESULTS: While the frequency of JAK2 V617F mutation was 36% and CALR mutation was 17% in all patients, MPL W515L/K mutation was not detected in any patient. In terms of subgroups of MPN; in polycythemia vera, essential thrombocytosis and primary myelofibrosis groups, the incidence of JAK2 V617F mutation was 67%, 33% and 25%, respectively; and the incidence of CALR mutation was 8%, 29% and 8%, respectively. MPL W515L/K was absent in all groups.

DISCUSSION AND CONCLUSION: Previous studies have reported that the frequency of JAK2 V617F, MPL W515L/K and CALR mutations in Ph (-) MPN group diseases is very variable. As conclusion, it is thought that environmental factors such as smoking and altitude have an effect besides epigenetic factors such as ethnicity in distribution of mutations.

Keywords: Myeloproliferative Neoplasm, JAK2, MPL, CALR

GİRİŞ

Myeloproliferatifneoplazmlar (MNP); myeloid serinin bir ya da birden fazla hücre tipinin kontrolsüz çoğalımı ile karakterize olanklonalhematopoeitik kök hücre hastalığıdır. MNP grubu hastalıklar; kronik myelositer lösemi (KML), polisitemivera (PV), esansiyeltrombositopeni (ES) ve primermyelofibrozisdir (PMF) (1). KML'de "Philedelphia Kromozomu" adı verilen 9. ve 22. Kromozomlar arasında kitranslokasyon sonucu oluşan bir füzyon geni mevcuttur ve bu hastalık için sitogenetik bir belirteçtir (2). Bundan dolayı KML'yephiledelphia pozitif MPN'de denilmektedir. Philedelphia negatif-Ph(-) veya diğer adıyla *BCR-ABL* negatifMPN'ler ise;polisitemivera (PV), esansiyeltrombositopeni (ES) ve primermyelofibrozisdir (PMF) (1,3).Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında myeloproliferatifneoplazilerin tanı ve tedavi kılavuzunu yeniden düzenlemiştir ve günümüzde de halen bu kılavuz kullanılmaktadır (4,5). Bu kılavuza göre klinik ve rutin laboratuvar bulguları ile myeloproliferatifneoplazi düşünülen bir hastada tanıyı desteklemek için bazı moleküler testlerin yapılması gerekmektedir (4,5). İlk olarak *JAK2* V617F mutasyon araştırılması yapılması önemlidir (4,5). *JAK2* V617F mutasyonu pozitifse PV, ET veya PMF tanısı yüksek olasılıklıdır ve DSÖ kriterlerine göre MPN alt tipi belirlenir (4,5). *JAK2* V617F mutasyonu negatif çıkması ve klinik bulguların MPN'yi işaret etmesi durumunda ise *CALR*, *MPL* ve *JAK2* ekzon 12 mutasyon araştırılması önerilmektedir (4,5).

JAK2 V617F mutasyonu PV'li hastaların yaklaşık %95'inde, ET veya PMF'li hastaların %50-60'ında pozitifdir (6). *JAK2* ekzon12 mutasyonu PV'li hastaların az bir kısmında saptanmakla birlikte *JAK2* mutasyonu saptanmayan ET veya PMF'li hastaların yaklaşık %5-10'unda *MPL* gen mutasyonu saptanmaktadır (6).Böylece hemen

hemen tüm PV'li hastalarda *JAK2* mutasyonu bulunurken, ET ve PMF'li hastaların yaklaşık üçte birinde *JAK2* veya *MPL* genlerinde herhangi bir mutasyon bulunmamaktadır. İşte *JAK2* ve *MPL* genlerinde mutasyon bulunmayan Ph (-) MPN hastalarına *CALR* mutasyon araştırılması önerilmektedir (7,8).

CALR geni 19p13.2 de lokalize 9 ekzondan oluşan bir gendir (9). *CALR* proteinin en önemli fonksiyonu endoplazmikretikulumdaCa⁺⁺ bağlayıcı bir şaperon görevi yapmasıdır (10).*CALR* geninde meydana gelen mutasyonlar birçok hücrel fonksiyonun kaybına neden olmaktadır; bunların en önemlilerinden olanı daapoptotik hücrelerin ve kanser hücrelerinin fagositozunun azalmasıdır (11).

CALR mutasyonlarının hemen hemen tamamı 9. ekzondadır (12) . En sık görülen mutasyonlar ise; c.1092_1143del52 ve c.1154_1155insTTGCT'dir. *CALR* c.1092_1143del52 mutasyonuna Tip1, *CALR*c.1154_1155insTTGCT mutasyonuna ise Tip2 adı verilmektedir. Tip1'de 52 bazlık (52 bç) bir delesyon tip2'de ise 5 bazlık (5 bç) insersiyon mevcuttur (12).Bu çalışmada; Türk toplumunda PV, ET ve PMF tanılı hastalarda*JAK2* V617F, *MPL* W515L/K ve*CALR* mutasyon dağılımını araştırdık.*JAK2* V617F ve *MPL*W515L/K genleri ile ilgili çalışma sayısı*CALR* mutasyon sıklığı ile ilgili çalışmalara göre daha fazladır. Yaptığımız çalışma ile hastanemize başvuran Türk popülasyonuna ait hastalarda ki *CALR* mutasyon sıklığını ve *CALR* mutasyonu ile *JAK2* V617F ve *MPL* W515L/K mutasyon sıklığını ve birlikteliğini göstermeyi hedefledik.

MATERYAL METOD

Kliniğimize ET, PV ve PMF ön tanısı ile konsülte edilen 41erişkin hastaya *JAK2* V617F, *MPL* W515L/K, *CALR* geni Tip1 ve Tip2 mutasyon araştırılması yapıldı. Hastaların 17 tanesi ET, 12 tanesi PMF ve 12

tanesi de PV klinik tanısı ile başvurmuştu. Hastalardan ilk olarak periferik kandan DNA eldesi yapıldı. Daha sonra *JAK2* V617F mutasyon analizi yapıldı. Bunun için Qiagenreal time PCR kiti kullanıldı. *JAK2* V617F negatif çıkan hasta grubuna ise ipsogen *MPL* W515L/K ve *CALR* Tip1 ve Tip2 real time PCR kitleri kullanıldı. Her üç kit kullanılarak yapılan çalışmalar Qiagene Rotor-Gene Real Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Rotor-Gene Assay Manager v2.1 Gama Plug-in analiz programı ile analiz edildi.

BULGULAR

Yapılan analizler sonrasında; toplamda ki 41 hastanın 15'inde (%36) *JAK2* V617F, 7'sinde (%17) *CALR* mutasyonu tespit edildi. Hastaların hiçbirisinde *MPL* W515L/K mutasyonu tespit edilmedi. *JAK2* V617F mutasyonu tespit edilen hastaların 8 tanesi PV, 3 tanesi PMF, 4 tanesi ise ET klinik tanısına sahipti. *CALR* mutasyonu tespit edilen hastaların 5 tanesi ET, 1 tanesi PV ve 1 tanesi de PMF tanısına sahipti. Bir hasta da Tip2 mutasyon tespit edildi ve bu hasta ET tanısına sahipti. Diğer 6 hastada ise Tip1 mutasyon belirlendi (Tablo 1). *JAK2* V617F mutasyonu PV'li hastaların %67'sinde, ET'li hastaların %33'ünde ve PMF'li hastaların %25'inde görüldü. *CALR* mutasyonu ise ET'li hastaların %29'unda, PMF'li ve PV'li hastaların ise %8'inde görüldü (Tablo 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Myeloproliferatif neoplaziler hematopoeitik sistemin önemli bir hastalık grubudur. Kronik myelositer lösemi philedelphia pozitif MPN olarak adlandırılırken *BCR-ABL* translokasyonu görülmeyen polisitemi vera, esansiyel trombositemi ve primer myelofibrozis ise philedelphia negatif MPN olarak adlandırılmaktadır (1,3). Bu hastalıklarda tanı için ilk basamak genetik test *JAK2* V617F mutasyon analizidir (13).

Tablo 1. Genel hasta grubunda mutasyonların dağılımı

Hasta	Tanısı	<i>JAK2</i> V617F	<i>CALR</i>
Hasta 1	ET	Mutasyon yok	Tip2 pozitif
Hasta 2	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 3	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 4	PRV	%73 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 5	PRV	%91 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 6	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 7	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 8	PRV	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 9	MF	%89 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 10	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 11	MF	%71 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 12	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 13	PRV	%11 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 14	ET	%94 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 15	ET	Mutasyon yok	Tip1 pozitif
Hasta 16	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 17	PRV	%23 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 18	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 19	PRV	Mutasyon yok	Tip1 pozitif
Hasta 20	ET	%22 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 21	PRV	%94 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 22	ET	Mutasyon yok	Tip1 pozitif
Hasta 23	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 24	PRV	%83 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 25	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 26	ET	%86 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 27	MF	%28 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 28	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 29	ET	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 30	PRV	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 31	ET	%9 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 32	ET	Mutasyon yok	Tip1 pozitif
Hasta 33	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 34	PRV	%32 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 35	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 36	PRV	%23 pozitif	Mutasyon yok
Hasta 37	PRV	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 38	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 39	MF	Mutasyon yok	Mutasyon yok
Hasta 40	ET	Mutasyon yok	Tip1 pozitif
Hasta 41	MF	Mutasyon yok	Tip1 pozitif

Tablo 2. Mutasyonların hastalıklara göre görülme yüzdesi

Hastalık	<i>JAK2</i> V617F görülme yüzdesi	<i>CALR</i> görülme yüzdesi
PV	%67	%8
ET	%33	%29
PMF	%25	%8

PV'li hastaların %95'inde *JAK2* V617F mutasyonu pozitif beklenmektedir (6). Bizim çalışmamızda PV'li hastaların %67'sinde *JAK2* V617F mutasyonu pozitif saptanmıştır. Bu durumun hemogloblin düzeyini yükseltensekonder sebeplere bağlı

olabileceğini düşünmekteyiz. Bunların başında da; ülkemizde sigara içme oranının oldukça fazla olması ve ülkemizin ortalama rakım seviyesinin dünya ortalamasına göre yüksek olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca 2016 yılına kadar DSÖ tanı kriterlerinde PV tanısı için hemoglobin düzeyi erkeklerde 18.5 g/dl kadınlarda ise 16.5 g/dl üzerinde olması şeklindeydi (14). 2016 yılında yayımlanan kılavuza göre ise bu değerler erkeklerde 16.5 g/dl kadınlarda ise 16 g/dl olarak uygulanmaya başlandı (4,5). Dolayısıyla sigara içme oranının ve ortalama rakım değerinin dünya ortalamalarına göre oldukça fazla olduğu ülkemizde rölatif hemoglobinin yüksekliğine bağlı klinik ön tanı nedeniyle *JAK2 V617F* mutasyon oranının literatürün altında olduğunu düşünüyoruz. ET'li hasta grubunda ise *JAK2 V617F* mutasyon oranı %33 olarak saptandı. Genel olarak ET'li hastalarda *JAK2 V617F* mutasyon oranı %50-60 arasında beklenirken literatürde ki bazı çalışmalarda çok geniş bir aralıkta mutasyon görülme oranı bildirilmiştir (15). Carobbio ve ark. yaptıkları çalışmada ET tanısı almış olan hastaları çeşitli gruplara ayırdıklarında *JAK2 V617F* mutasyon görülme oranının %27-77 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (16). Bu çalışmada ki sonuçlar bizim çalışmamızda görülen %33'lük *JAK2 V617F* pozitiflik oranını desteklemektedir. PMF'li hasta grubunda *JAK2* mutasyon oranı %25 olarak saptandı. PMF'li hastalarda genel olarak *JAK2* mutasyon oranı %50 civarında beklenmekle birlikte yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır (15). Ebid ve ark. yaptıkları çalışmada myelofibrozisli hastalarda *JAK2* mutasyon oranını %12.5 olarak bildirmişlerdir (17). Yine Jaradat ve ark. ise yaptıkları çalışmada PMF'li hastalarda *JAK2 V617F* mutasyon oranını %45 olarak bildirmişlerdir (18). Bütün bu literatür verilerinin dışında Ochoa ve ark. yaptıkları meta-analiz çalışmasında *JAK2 V617F* mutasyon oranını PV'li grupta %46.7-100 aralığında, ET'li hasta grubunda %31.3-72.1 aralığında ve PMF'li hasta grubunda ise %25-85.7 aralığında

olduğunu bildirmişlerdir (15). Bu meta-analiz çalışmasında da görüldüğü üzere *JAK2V617F* mutasyon oranı Ph(-) MPN grubunda büyük değişkenlikler göstermektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda diğer literatür verileriyle uyumludur.

Çalışmamızda hiçbir hasta grubunda *MPL W515L/K* mutasyonu saptamadık. Yine Ochoa ve ark. yaptıkları meta-analiz çalışmasında belirtildiği üzere 14 farklı çalışmada *MPL W515L/K* mutasyon görülme sıklığı; PV'da %0, ET'de %0.9-12.5 ve PMF'de ise %0-17.1 olarak belirtilmiştir (15). Bizim çalışmamızın da bu literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda *CALR* mutasyon oranları incelendiğinde PV'live PMF'li hasta grubunda *CALR* mutasyon oranı %8 olarak görüldü. ET'li hasta grubunda ise *CALR* mutasyon oranını %29 olarak saptadık. Ochoa ve ark. yaptıkları meta-analiz çalışmasında benzer sonuçlar ortaya koyulmuştur (15). Dolayısıyla çalışmamızda ki *CALR* mutasyon oranları da literatür verileri ile benzerdir.

Ph(-) neoplazilerin tanısı halen klinik bulgular, biyokimyasal ve hematolojik laboratuvar bulguları ve genetik testler ile konulmaktadır. Elbette hepsinin ayrı bir önemi olmakla birlikte özellikle genotipik değişikliklerden *JAK2 V617F* değişimi en sık gözlenmektedir. Dolayısıyla *JAK2 V617F* mutasyon araştırılması genetik testler içinden birinci basamak olarak değerlendirilmektedir. *MPL W515L/K* ve *CALR* mutasyon sıklığının daha az oranda görülmesi ise tanıdan çok belki prognoz değerlendirmede önemli olacaktır.

Ayrıca her üç hastalık grubu için bu üç farklı genotipik değişim sıklığının oldukça farklı oran aralıklarında görülmesinin sebebi olarak; farklı etnisite faktörleri ve özellikle PV için sigara, rakım gibi çevresel faktörlere bağlı rölatif Hb düzeyi yüksekliğinin rol oynadığını düşünmekteyiz. Bu çevresel faktörlerin dışında henüz bilinmeyen modifiyeci genler ve

epigenetik faktörlerde bu farklılıklara sebep olabilir.

Çıkar Çatışması: Yok

REFERANSLAR

1. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129:680-691
2. Press RD, Love Z, Tronnes AA et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006;107:4250-4256
3. Van Etten RA, Koschmieder S, Delhommeau F et al. The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica*. 2011;96:590-601
4. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in depth discussion. *Blood Cancer Journal*. 2018;8:1-11
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-2405
6. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative Neoplasms: Molecular Pathophysiology, Essential Clinical Understanding, and Treatment Strategies. *J Clin Oncol*. 2011;29:573-582
7. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Eng J Med*. 2013;369:2379-2390
8. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Eng J Med*. 2013;369:2391-2405
9. Stein H, Bob R, Erck C et al. A new monoclonal antibody (CAL2) detects Calreticulin mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded bone marrow biopsies. *Leukemia*. 2016;30:131-135
10. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannuchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: Hidden behind the reticuum. *AJH*. 2014;89:453-456
11. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*. 2007;13:54-61
12. Giannopoulos A, Roukala N, Loupis T et al. Detection of CALR Mutations Using High Resolution Melting Curve Analysis (HRMA); Application on a Large Cohort of Greek ET and MF Patients. 2019;11:1-7
13. Tefferi A, Noel P, Hanson CA. Uses and Abuses of JAK2 and MPL Mutation Tests
In Myeloproliferative Neoplasms. 2011;13:461-466
14. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. Uses and Abuses of JAK2 and MPL Mutation Tests
In Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer*. 2009;115:3842-3847
15. Ochoa MM, Toro PAA, Arias JAC. Systematization of analytical studies of polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, and a meta-analysis of the frequency of JAK2, CALR and MPL mutations: 2000–2018. *BMC Cancer*. 2019;590:1-15
16. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E et al. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2018;112:3135-3137
17. Ebid GT, Ghareeb M, Salaheldin O, Kamel MM. Prevalence of the frequency of JAK2 (V617F) mutation in different myeloproliferative disorders in Egyptian patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(9):11555-11559
18. Jaradat SA, Khasawneh R, Kamal N et al. Analysis of JAK2V617F mutation in Jordanian patients with myeloproliferative neoplasms. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015;8(4):160-166