

Določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* pri bolnikih s pravo policitemijo

Identification of *JAK2* exon 12 mutations in patients with polycythemia vera

Marija Jedrt Mandelc Mazaj, Sašenka Lozar, Peter Černelč, Tadej Pajič

Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

asist.dr. Tadej Pajič, spec. med. biokem, Specializirani hematološki laboratorij kliničnega oddelka za hematologijo, Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njegoševa 4, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; fax: +386 1 43 20 230, e-mail: tadej.pajic@kclj.si

Ključne besede:

prava policitemija, eritrocitoza, *JAK2* ekson 12, *JAK2* V617F

Key words:

polycythemia vera, erythrocytosis, *JAK2* exon 12, *JAK2* V617F

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-161-7

Prispelo: 10. apr. 2012,
Sprejeto: 17. maj 2012

Izvleček

Izhodišča: Diagnozo prava policitemija (PV) praviloma postavimo z ugotovitvijo eritrocitoze in mutacije v genu *JAK2*. Pri več kot 95 % bolnikov s PV ugotovimo somatsko mutacijo *JAK2* V617F. Pri bolnikih s PV in z negativnim izsledkom za mutacijo *JAK2* V617F so nedavno odkrili mutacije znotraj eksona 12 gena *JAK2*. Namen raziskave je vpeljava načinov za določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* pri skupini bolnikov s pravo policitemijo (PV) ali z nejasno eritrocitozo in negativnim izsledkom za mutacijo *JAK2* V617F.

Metode: V raziskavo smo vključili vzorce 6 bolnikov z znaki zvečane mase eritrocitov v krvni sliki in negativnim izsledkom za mutacijo *JAK2* V617F. Granulocite smo osamili s centrifugiranjem preko gostotnega gradienta fikola iz vzorcev venske krvi ali kostnega mozga ter z liziranjem eritrocitov. Iz celic smo osamili RNA in s postopkom obratnega prepisovanja z reverzno transkriptazo pridobili komplementarno DNA (cDNA). Prisotnost mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* smo ugotovili z načinom kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR) in analizo krivulje taljenja dveh specifičnih fluorescenčno označenih hibridizacijskih sond ter s klasičnim postopkom PCR in z analizo velikosti madežev pridelkov PCR na agaroznem gelu po elektroforezi. Vrsto mutacij smo določili s sekvenciranjem ciljnega odseka pridelka klasičnega PCR.

Rezultati: Pri dveh od šestih bolnikov smo ugotovili prisotnost mutacije v eksonu 12 gena *JAK2*. Pri enem bolniku smo ugotovili delecijo p.Asn542_Glu543del, pri drugem pa delecijo p.Glu543_Asp544del. Obe mutaciji sta že znani.

Zaključki: Pri dveh od šestih bolnikov s kliničnim sumom na PV smo ugotovili mutacijo v eksonu 12 gena *JAK2* in potrdili diagnozo PV. Sklepamo, da so metode primerne za redno delo v laboratoriju in pomembne za postavitev diagnoze

bolezni PV pri bolnikih s PV ali z eritrocitozo in negativnim izsledkom za mutacijo *JAK2* V617F.

Abstract

Background: Polycythemia vera (PV) is characterized by erythrocytosis and mutation in *JAK2* gene. More than 95 % of patients with PV have somatic mutation *JAK2* V617F. Recently, several novel *JAK2* exon 12 mutations in PV patients and unmutated *JAK2* V617F were found. The aim of the study was to introduce methods for the detection of *JAK2* exon 12 mutations in patients with PV or unclear erythrocytosis and with unmutated *JAK2* V617F.

Methods: Six patients with an increased red cell mass determined by Complete Blood Count (CBC) test and with unmutated *JAK2* V617F were included in the study. Granulocytes were isolated from peripheral blood or bone marrow aspirates by Ficoll density centrifugation followed by erythrocytes lysis. Total cellular RNA was isolated from cells and used to prepare complementary DNA (cDNA) by reverse transcription. Detection of *JAK2* exon 12 mutation was performed by quantitative real time PCR and by melting curve analyses using dual hybridization probes, by classical PCR and agarose gel electrophoresis. The type of mutation was determined by direct sequencing of the classical PCR products.

Results: We detected *JAK2* exon 12 mutation in two out of six patients. We determined the deletion p.Asn542_Glu543del in one patient and the deletion p.Glu543_Asp544del in another one. The mutations have been already described.

Conclusions: In two out of six patients we detected *JAK2* exon 12 mutation and confirmed the diagnosis of PV. We conclude that *JAK2* exon 12 mutation analysis by the methods used contributes to the diagnosis of PV or erythrocytosis in patients with unmutated *JAK2* V617F mutation.

Uvod

Mieloproliferativne novotvorbe (MPN) so klonske bolezni, ki izvirajo iz multipotentne matične celice, za katere je značilna čezmerna tvorba ene ali več celičnih vrst ob odsotnosti določenega znanega sprožilnega dejavnika. Prava policitemija (PV) je MPN, za katero je značilno predvsem povečano nastajanje celic rdeče vrste, manj pa celic granulocitne in megakariocitne vrste. Po razvrstitvi Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) so za pravo policitemijo značilna merila, kot so povečane vrednosti hematokrita (moški > 0,52, ženske > 0,48), povečana masa eritrocitov (ME > 25 %), prisotnost mutacije *JAK2* V617F in znižana koncentracija Epo (eritropoetin) v serumu.^{1,2} V patogenezi te bolezni igrajo pomembno vlogo mutacije v tirozin kinazi *JAK2* (Janus kinaza 2), ki je povezana tudi z aktiviranjem receptorja za Epo. Tirozin kinaza *JAK2* je vključena v signalne poti za proliferacijo hematopoetskih celic. Gen za *JAK2* se nahaja na kromosomu 9p24 in je sestavljen iz sedmih domen. Najpomembnejši domeni sta JH1 in JH2. Domena JH1 se nahaja blizu karboksilnega konca proteina in je aktivna kinazna domena s tirozinskimi ostanki, ki se v procesu aktiviranja gena *JAK2* fosforilirajo. Domena JH2 ali psevdokinazna domena je kinazi podobna domena, ki nima kinazne aktivnosti. Vse druge JH3-JH7 domene pa opredelimo kot *JAK2* podobne domene.³ Najpogostejša mutacija v genu *JAK2* je točkovna mutacija V617F, ki nastane v domeni JH2 psevdokinaze gena *JAK2*. Pri mutaciji se zamenja aminokislina valin (V) za fenilalanin (F) na mestu 617 aminokislinskega zaporedja. To vodi do stalnega aktivnega delovanja *JAK2* tirozinske kinaze. Celice z omenjeno mutacijo so zelo občutljive na citokine in se hitro delijo. Dve neodvisni raziskavi sta v letu 2005 dokazali, da je pri večini bolnikov s PV (> 95 %) in pri približno polovici (50–60 %) bolnikov z esencialno trombocitemijo in primarno mielofibrozo prisotna pridobljena somatska mutacija *JAK2* V617F.^{4,5} Mutacija je prisotna v 50 % tudi pri bolnikih z refraktarno anemijo s prstanastimi sideroplasti in trombocitozo, pri drugih

mieloproliferativnih in mielodisplastičnih boleznih pa jo le redko dokažemo.

Pri približno 5 % bolnikov s PV, kjer ni prisotna mutacija V617F, so prisotne tudi druge mutacije, ki pa se zgodijo znotraj eksona 12 gena *JAK2*.^{6–9} Mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* nastanejo znotraj področja gena *JAK2*, ki medsebojno povezuje dve domeni, domeno SH2 in psevdokinazno domeno JH2. Ekson 12 gena *JAK2* pokriva področja gena od kodona 506–547. Večina teh mutacij nastane znotraj področja eksona 12 gena *JAK2*, ki pokriva področje gena od kodona 537–543. Mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* so prisotne tudi pri bolnikih z idiopatsko eritrocitozo s povečanim številom eritrocitov, povečano vrednostjo hematokrita ter z znižano koncentracijo Epo v serumu brez kakršnih koli kliničnih znakov za PV ali prisotnih karakterističnih morfoloških sprememb megakariocitov v kostnem mozgu.¹⁰ Pri drugih MPN mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* niso ugotovili.

Namen raziskave je vpeljava metod za določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* in določitev vrste prisotne mutacije pri bolniku z *JAK2* V617F negativno PV z metodo sekvenciranja.

Metode

Bolniki

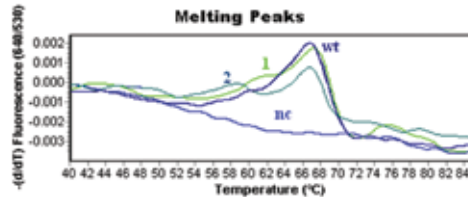
V preiskavo za določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* smo vključili 6 bolnikov z napotnima diagnozama PV ali nepojasnjena eritrocitoza. Vsi bolniki so se zdravili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (UKC Ljubljana).

Prisotnost mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* smo določili s tremi različnimi molekularno-diagnostičnimi načini: z analizo krivulje taljenja, s kvalitativno verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in s sekvenciranjem.

Osamitev RNA in reverzna transkripcija

Za potrebo določanja mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* smo bolnikom odvzeli 2 ml kostnega mozga ali 10 ml venske krvi, ki smo ju shranili odvzete v epruveto z anti-koagulantom EDTA. Iz granulocitov, ki smo

Slika 1: Določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* z načinom krivulje taljenja na napravi LightCycler 2.0.



jih pridobili z gradientnim centrifugiranjem preko fikola, smo z reagenčnim kompletom High Pure RNA Isolation Kit (ROCHE) iz njih osamili RNA. Po navodilih reagenčnega kompleta SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) smo s postopkom obratnega prepisovanja in z encimom reverzna transkriptaza SuperScript III pretvorili ~1 mg RNA v komplementarno DNA (cDNA).

Analiza krivulje taljenja

Kot presejalno metodo za določitev prisotnosti genskih sprememb v eksonu 12 gena *JAK2* smo uporabili metodo analize krivulje taljenja hibridizacijskih sond po verižni reakciji s polimerazo v realnem času (RQ-PCR), ki jo izvajamo z napravo LightCycler® 2.0 (Roche). Podatke smo analizirali z računalniškim programom LightCycler Software 4.1, ki dobljene vrednosti grafično prikaže v obliki krivulj. Z napravo zaznamo padec fluorescence pri dveh različnih temperaturah, ko se DNA razcepi v predelu mutacije, in pri temperaturi, ko se DNA razcepi v predelu nemutiranega gena. Računalniški program pretvori vrednosti fluorescence, odvisne od temperature, v negativni prvi odvod ($-dF/dT$).

Za reakcijo PCR pri presejalni metodi smo v 20 μ L-reakciji uporabili smerni začetni oligonukleotid JAK2-F (Applied Biosystems) z nukleotidnim zaporedjem TGT ACC AAC CTC ACC AAC AT in protismerni začetni oligonukleotid JAK2-R (Applied Biosystems) z nukleotidnim zaporedjem CAG TTG ACC GTA GTC TCC T. Koncentracija obeh začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici je bila 0,5 mM. Smerni oligonukleotid se prilega področju kodonov 520–525, medtem ko se protismerni prilega na področje kodonov 568–573. V reakciji PCR smo uporabili tudi sonde Hyb-Probe JAK2-FL (Roche Diagnostics) z nukleo-

tidnim zaporedjem ATG GTG TTT CAC AAA ATC AGA AAT GAA GAT TTG AT-Fluorescin ter sondo JAK2-PH (Roche Diagnostics) z nukleotidnim zaporedjem TTA ATG AAA GCC TTG GCC AAG GCA CT-Phosphate. Koncentracija sond v reakcijski mešanici je bila 0,75 mM. Nadaljnji postopek reakcije PCR smo povzeli po predhodno objavljeni literaturi.⁸ Najpogostejše mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* so v področju kodonov 535–555, ki jih prepoznamo z metodo analize krivulje taljenja.

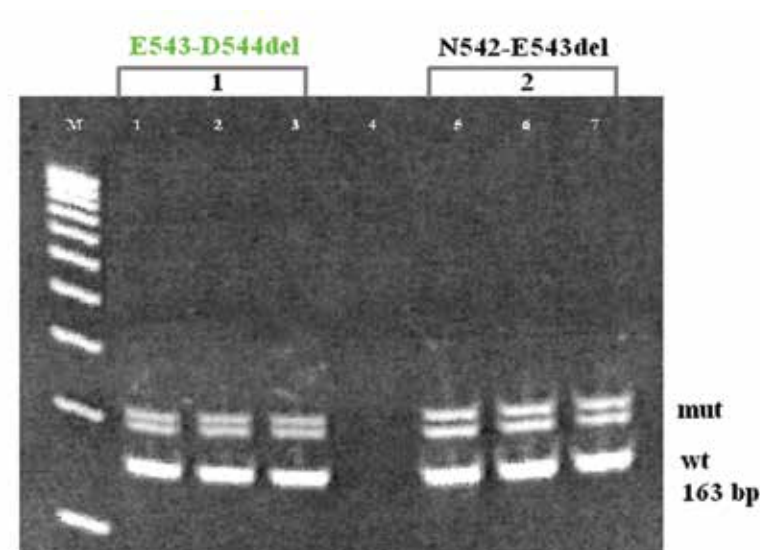
Kvalitativna reakcija PCR

Pri kvalitativni reakciji PCR smo v 50 mL reakcijski mešanici uporabili smerni in protismerni začetni oligonukleotid (JAK2-F in JAK2-R), katerih koncentracija v reakcijski mešanici je bila 0,4 mM. Koncentracija dNTP v reakcijski mešanici je bila 0,200 mM, medtem ko je bila koncentracija $MgCl_2$ 2,5 mM (Applied Biosystems). V reakciji PCR smo uporabili encim AmpiTaq GOLD Polymerase (Applied Biosystems). V reakciji pomnoževanja s 35 cikli je bila temperatura prileganja 60 °C. Reakcijo PCR smo izvedli z napravama Veriti® Thermal Cycler in GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Po končani reakciji PCR smo produkte PCR s postopkom gelske elektroforeze ločili na 4-odstotnim agaroznem gelu (E-Gel® EX Gels, 4 %, Invitrogen). Fragmente produktov reakcije PCR smo po končani elektroforezi izrezali iz gela. V primeru prisotnosti enega fragmenta smo prečistili produkt reakcije PCR na E-Gel® SizeSelect™ agaroznem gelu. Ob prisotnosti večjega števila fragmentov smo po končani elektroforezi fragmente produktov reakcije PCR izrezali iz gela. Izrezane fragmente smo prečistili z reagentnim kompletom PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

Sekvenciranje

Postopek sekvenciranja, s katerim določimo nukleotidno zaporedje, smo izvedli na genetskem analizatorju ABI 310 (Applied Biosystems) ob uporabi predhodno omenjenega smernega (JAK2-F) in protismernega začetnega oligonukleotida (JAK2-R) ter s



Slika 2: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo (PCR) na agaroznem gelu.

pomočjo reagentnega kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

Rezultati

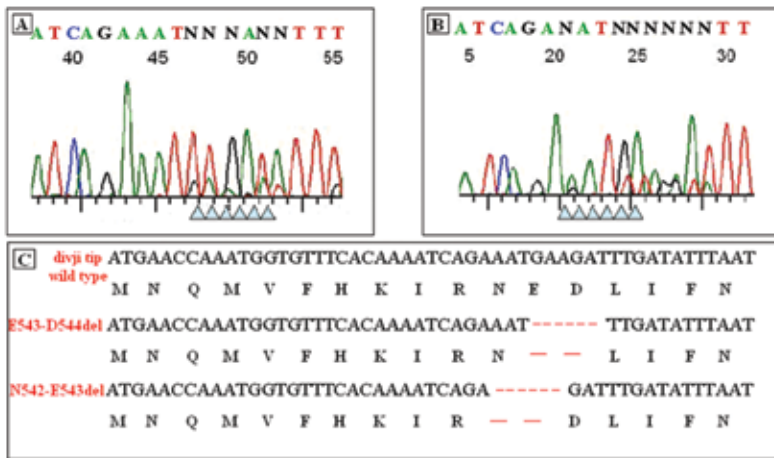
Podatki laboratorijskih preiskav

V sklopu diagnosticiranja smo bolnikom naredili določene laboratorijske preiskave. Vsem bolnikom smo s preiskavo alelna verižna reakcija s polimerazo (alelni PCR) prej izključili prisotnost mutacije V617F v genu *JAK2* (Tabela 1).

Tabela 1: Podatki o bolnikih in laboratorijskih preiskavah.

Podatki o bolniku in laboratorijskih preiskavah	Bolnik 1	Bolnik 2	Bolnik 3	Bolnik 4	Bolnik 5	Bolnik 6
starost (leto)	56	55	44	52	24	50
spol	Ž	Ž	M	Ž	M	M
diagnoza	PV	PV	PV	Eritrocitoza	PV	Eritrocitoza
izvor vzorca	KM	PK	PK	PK	PK	PK
hemoglobin g/L Ref. v. [118–148] x g/L Ž Ref. v. [133–167] x g/L M	191	184	175	166	180	175
hematokrit Ref. v. [0,36–0,44] x g/L Ž Ref. v. [0,39–0,50] x g/L M	0,580	0,542	0,507	0,478	0,515	0,502
erici x 10 ¹² /L/ Ref. v. [3,88–4,99] x 10 ¹² /L Ž Ref. v. [4,32–5,66] x 10 ¹² /L M	7,70	5,63	5,53	5,59	5,55	5,89
lkci x 10 ⁹ /L/ Ref. v. [3,9–11,1] x 10 ⁹ /L Ž Ref. v. [3,7–9,5] x 10 ⁹ /L M	9,2	9,6	10,0	11,5	7,6	3,5
tr x 10 ⁹ /L/ Ref. v. [157–384] x 10 ⁹ /L	340	202	279	286	225	153
nivo Epo v serumu IU/mL/ Ref. v. [3,3–16,6] IU/mL	NA	1,9	3,0	7,5	7,0	5,8
mutacija <i>JAK2</i> V617F	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna
mutacije v eksonu 12 gena <i>JAK2</i>	E543-D544del	N542-E543del	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna	Ni prisotna

Legenda: Ž (ženska); M (moški); PV (prava policitemija); KM (kostni mozeg); Erci (eritrociti); Lkci (Levkociti); Tr (trombociti); Epo (eritropoetin); NA / ni na voljo.



Slika 3: Somatski mutaciji v eksonu 12 gena *JAK2* pri dveh bolnicah s pravo policitemijo.

Rezultati določitve mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*

S presejalno metodo krivulje taljenja hibridizacijskih sond na napravi LightCycler 2.0 smo dokazali prisotnost mutacije v eksonu 12 pri bolnici 1 in bolnici 2. Pri vseh drugih bolnikih pa smo z metodo taljenja krivulje izključili prisotnost mutacije v eksonu 12 gena *JAK2*. Na grafu krivulje taljenja, na katerem je negativen prvi odvod ($-dF/dT$) fluorescence v odvisnosti od temperature kaže kot enojni vrh pri temperaturi krivulje taljenja $\sim 67^\circ\text{C}$, predstavlja bolnika, pri katerem mutacija v eksonu 12 ni prisotna (wt) (Slika 1). Iz grafa je razvidno, da sta pri bolnici 1 prisotna dva vrhova pri različnih temperaturah krivulje taljenja ($T_{m1} = 61^\circ\text{C}$ in $T_{m2} = 67^\circ\text{C}$), kar potrjuje prisotnost mutacije v eksonu 12. Prav tako sta prisotna dva vrhova tudi pri bolnici 2 z različnima temperaturama krivulje taljenja ($T_{m1} = 59^\circ\text{C}$ in $T_{m2} = 67^\circ\text{C}$). Izsledki potrjujejo prisotnost mutacije v eksonu 12 pri obeh bolnicah.

Pri bolnici 1 in bolnici 2 smo uspešno potrdili prisotnost mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* tudi z metodo kvalitativne reakcije PCR, kar je razvidno iz elektroforograma (Slika 2). Na agaroznem gelu v primeru odsotnosti mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* dobimo fragment velikosti 163 bp. V primeru prisotnosti mutacije pa so na agaroznem gelu poleg fragmenta velikosti 163 bp prisotni še fragmenti, ki so večji od 163 bp. Velikost fragmentov je odvisna od vrste prisotnih mutacij v eksonu 12 (npr. delecije, insercije nukleotidov). Pri bolnici 1 in bolnici 2 sta poleg fragmenta velikosti 163 bp

prisotna še dva fragmenta, njuna velikost pa je večja od ~ 180 bp, kar potrjuje prisotnost mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* (Slika 2). Pri drugih bolnikih pa smo dobili le fragment velikosti 163 bp. Za izključitev mutacij smo opravili še sekvenčno analizo.

Z metodo sekvenciranja smo nato pri posameznem bolniku iz produktov PCR določili nukleotidno zaporedje, ki smo ga primerjali z nukleotidnim zaporedjem divjega tipa gena *JAK2*. Z metodo sekvenciranja smo pri bolnici 1 določili mutacijo E543-D544del, kjer je prišlo do izgube fragmenta velikosti 6 bp. Prišlo je do delecije 6 nukleotidov GAA GAT na mestih 1627–1632 (1627–1632del6). Pri mutaciji je v aminokislinskem zaporedju prišlo do delecije glutaminske kisline na mestu 543 in aspartata na mestu 544 (Slika 3). Pri bolnici 2 je bila prisotna mutacija N542-E543del, pri kateri je prav tako prišlo do izgube fragmenta velikosti 6 bp. Do delecije 6 nukleotidov AAT GAA je prišlo na mestih 1624–1629 (1624–1629del6). Pri tej mutaciji je v aminokislinskem zaporedju prišlo do delecije asparagina na mestu 542 in glutaminske kisline na mestu 543 (Slika 3).

Pri bolniku 3 in bolniku 5 z negativno mutacijo *JAK2* V617F in s klinično sliko za PV v granulocitih periferne krvi nismo določili prisotnosti mutacije v eksonu 12 gena *JAK2*. Prav tako je nismo določili niti pri drugih dveh bolnikih^{4,6} s klinično sliko eritrocitoze.

Razpravljanje

Mutacija v V617F gena *JAK2* je po razvrstitvi Svetovne zdravstvene organizacije pomembno molekularno-diagnostično merilo prave policitemije. Nedavne raziskave so pokazale, da pri teh bolnikih ugotovimo mutacijo v več kot 5 % znotraj eksona 12 gena *JAK2*. Od šestih analiziranih bolnikov s pravo policitemijo ali z eritrocitozo smo pri dveh bolnicah dokazali prisotnost mutacije v eksonu 12. Bolnici sta bili ob določitvi mutacij stari 56 in 55 let (Tabela 1). Zanimivo je, da podatki iz predhodno objavljenih raziskav potrjujejo, da so mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* prisotne v večjem deležu pri ženski kot pri moški populaciji. Mediana starosti je manjša od 60 let. Nasprotno pa

je mutacija V617F v genu *JAK2* prisotna v večjem deležu pri moški populaciji, kjer je mediana starosti manjša od 70 let.⁹

Za PV so značilni dejavniki, kot so povečana vrednost hematokrita, povečana masa eritrocitov, prisotnost mutacije *JAK2* V617F in zmanjšana koncentracija Epo v serumu. Raziskave so pokazale, da mutacije v eksonu 12 gena *JAK2* ugotavljamo pri bolnikih s PV ali z idiopatsko eritrocitozo (IE), ki pa ni povezana s trombocitozo in levkocitozo.¹¹⁻¹⁵ V našem primeru sta imeli bolnici s prisotnima mutacijama v eksonu 12 gena *JAK2* povečano število eritrocitov, povečano vrednost hematokrita ter povečano koncentracijo hemoglobina. Pri obeh bolnicah sta bila število levkocitov in število trombocitov v mejah referenčnih vrednosti (Tabela 1), kar je v skladu z raziskavami. Bolnica 2 je imela prav tako nizko koncentracijo Epo v serumu.

Preiskave za določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* izvajamo stopenjsko. Najprej opravimo analizo taljenja krivulje, nato pa potrjujemo prisotnost in vrsto mutacije z metodo sekvenciranja. Pri bolnicah smo določili mutaciji vrste N542-E543del in E543-D544del, ki sta hkrati tudi najpogostejši mutaciji v področju znotraj eksona 12.⁷

Največ mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* se zgodi znotraj regije, ki jo pokrivajo kodoni 537-543.^{16,14} Do sedaj poznamo več kot 15 različnih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*, kot so duplikacije (podvajanje), insercije (vstavljanje), delecije (izbris) in substitucije (zamenjava) določenih nukleotidov. Najpogostejše med njimi so delecije, kjer pride do izgube fragmenta velikosti 6 bp. Te ne vplivajo na bralni okvir, vendar spremenijo končno aminokislinsko sestavo. Analiza sekvenc najpogostejših delecijskih točkovnih prelomov kaže, da se delecije pri mutacijah v eksonu 12 zgodijo znotraj dveh kratkih ponovitev (AGA).

Druge, do sedaj poznane mutacije v eksonu 12, so: K539L, F537-K539delinsL, R541-E543delinsK, H538-K539delinsL, F537-I546dupF547L, E543del, H538QK539L, 547insLI540-F547, I540-E543delinsMK, F547V, H538DK539LI540S, F537-F547dup, I540-N542delinsS, V536-F547dup in V536-I546dup.^{7,16-19}

Rezultati naših preiskav so pokazali, da so rezultati analize krivulje taljenja v skladu z rezultati kvalitativne reakcije PCR ter z rezultati sekvenciranja. Analiza taljenja krivulje je bolj občutljiva metoda kot sekvenciranje, kar je tudi eden izmed razlogov, da obe preiskavi delamo hkrati in s tem povečamo občutljivost detekcije.

Če preiskavo opravljamo iz vzorca venske krvi, se lahko zgodi, da dobimo negativen rezultat, ki pa je lahko vzrok majhnega števila celic v periferni krvi s prisotno mutacijo v eksonu 12 gena *JAK2*. V tem primeru moramo za izključitev prisotnosti mutacij v eksonu 12 preiskavo ponoviti še na celicah kostnega mozga.

Zaključek

Uspešno smo vpeljali preiskavo, s katero določamo prisotnost mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*. S sekvenciranjem natančno določimo vrsto prisotne mutacije. Do sedaj smo odkrili več kot 15 različnih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*, kar pa ne izključuje dejstva, da je lahko prisotnih še več različnih vrst mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*. Tako metoda taljenja krivulje kot sekvenciranje omogočata določitev do sedaj še nepoznatih mutacij v eksonu 12 gena *JAK2*.

V Specializiranem hematološkem laboratoriju od leta 2011 to preiskavo rutinsko izvajamo kot molekularno-diagnostični prekus pri bolnikih z *JAK2* V617F-negativno pravo policitemijo. Določitev mutacij v eksonu 12 gena *JAK2* ima pomembno vlogo pri postavitvi diagnoze in razumevanju patofiziologije same bolezni in vpliva na odločitev o nadaljnjem zdravljenju.

Literatura

1. Tefferi A and Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22: 14–22.
2. Mlakar U. Smernice za odkrivanje in zdravljenje prave policitemije. *Zdravniški Vestnik* 2008; 77: 1–11–4.
3. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Human Pathology* 2008; 39: 795–810.
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. 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.
6. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA and Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia* 2007; 21: 1960–3.
7. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theoharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 111: 1686–9.
8. Kouroupi E, Zoi K, Parquet N, Zoi C, Kiladjian JJ, Grigoraki V, et al. Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythemia vera patients. *Br J Haematol* 2008; 142: 676–9.
9. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Geer T, Müller P, Mittermüller J, et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* 2009; 94: 414–8.
10. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007; 92: 1607–14.
11. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92(12): 1585–9.
12. Ohyashiki JH, Hisatomi H, Shimizu S, Sugaya M and Ohyashiki K. Detection of Low Allele Burden of JAK2 Exon 12 Mutations Using TA-cloning in Patients with Erythrocytosis. *Jpn J Clin Oncol* 2009; 39(8): 509–13.
13. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117 (10): 2813–6.
14. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459–68.
15. Martinez-Aviles L, Besses C, Alvarez-Larraín A, Cervantes F, Hernaández-Boluda JC, Bello-sillo B. JAK2 exon 12 mutations in patients with polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92: 1717–8.
16. Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2-V617F-negative polycythemia vera patients. *Leukemia* 2008; 22: 870–3.
17. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theoharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon 12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* 2008; 111: 3863–6.
18. Lakey MA, Pardanani A, Hoyer JD, Nguyen PL, Lasho TL, Tefferi A, et al. Bone Marrow Morphologic Features in Polycythemia Vera With JAK2 Exon 12 Mutations. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 942–8.
19. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011; 117 (10): 2813–6.