

# Мутација *JAK2-V617F* код болесника с мијелопролиферативним неоплазијама: веза са мутацијом *FLT3-ITD*

Весна Спасовски<sup>1</sup>, Наташа Тошић<sup>1</sup>, Татјана Костић<sup>1</sup>, Соња Павловић<sup>1</sup>, Милица Чоловић<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

<sup>2</sup>Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд, Србија

## КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Стечена соматска мутација *V617F* у гену за Јанус киназу 2 (*JAK2*) узрок је неконтролисана пролиферације ћелија код болесника с мијелопролиферативним неоплазијама. Познато је да до пролиферације ћелија мијелоидне лозе долази и под утицајем мутација у другим генима, као што су мутације у гену за тирозин-киназни рецептор *FLT3*, који је најчешћи мутирани ген у акутним мијелоидним леукемијама. Од посебног је значаја то што мутирани протеин *FLT3* користи исти сигнални пут као протеин *JAK2*. То је сигнални пут преко протеина *STAT5*, чија је активација важна за самообнављање матичних ћелија хематопоезе.

**Циљ рада** Циљ истраживања је био да се открије мутација *V617F* у гену за *JAK2* код болесника с мијелопролиферативним неоплазијама. Испитано је и истовремено присуство мутације *FLT3-ITD* код ових болесника ради расветљавања хипотезе о сличној улози ова два молекуларногенетичка маркера у хематолошким малигнитетима.

**Методе рада** Методом алел-специфичног *PCR* (енгл. *polymerase chain reaction*) анализиран је 61 болесник са потврђеном дијагнозом мијелопролиферативне неоплазије на мутацију *V617F* у гену за *JAK2* или сумњом на ову дијагнозу. Код болесника са мутацијом у гену *JAK2* је затим испитано постојање мутације *FLT3-ITD* методом *PCR*.

**Резултати** Код 18 испитаника је откривена мутација *V617F* у гену за *JAK2*. Међу њима је код осам болесника дијагностикована полицитемија вера, а код десет есенцијална тромбоцитемија. Ни код једног испитаника с мутацијом *V617F* у гену за *JAK2* није откривена мутација *FLT3-ITD*.

**Закључак** Резултати овог истраживања подржавају хипотезу да је за малигну трансформацију матичне ћелије хематопоезе довољна једна мутација која изазива поремећај пролиферације ћелије.

**Кључне речи:** мијелопролиферативне неоплазије; мутација *JAK2-V617F*; алел-специфични *PCR*; мутација *FLT3-ITD*

## УВОД

Мијелопролиферативне неоплазије су група хематолошких малигних обољења коју одликује клонална пролиферација једног малигно измењеног клона мијелоидне крвне лозе или више њих. У ову групу обољења убрајају се полицитемија вера, есенцијална тромбоцитемија и примарна мијелофиброза [1]. Код мијелопролиферативних обољења матичне ћелије хематопоезе задржавају потенцијал да се диференцирају, али се одликују повећаном осетљивошћу на факторе раста [2, 3, 4]. Недавно је откривена активирајућа соматска мутација у гену за Јанус киназу 2 (*JAK2*), која је забележена код 65-97% болесника са полицитемијом вером, 57% са есенцијалном тромбоцитемијом и 50% са примарном мијелофиброзом [5]. Ова мутација подразумева трансверзију нуклеотида *G* у нуклеотид *T* на позицији 1849 у егзону 14 гена *JAK2* [5-10]. На протеинском нивоу ова промена доводи до замене аминокиселине валин у фенилаланин на позицији 617 (*V617F*) протеина *JAK2*. Мутација се налази у аутоинхибиторном региону протеина *JAK2* и изазива његову конститутивну акти-

вацију [11]. То доводи до повећане осетљивости ћелија на долазеће стимулусе, као што су фактори раста. Постојање мутације доноси пролиферативну предност ћелијама које је поседују изазивајући клоналну експанзију хематопоеетских прогенитора у мијелопролиферативним неоплазијама. Као последица ове мутације активира се сигнални пут низводно од протеина *JAK2*, односно *STAT* пут, чиме долази до интензивне транскрипције гена укључених у деобу ћелије [12, 13].

Раст и диференцијација хематопоеетских ћелија одвија се под утицајем различитих фактора раста и њихових рецептора. Један од ових рецептора је и тирозин-киназа *FLT3* (енгл. *FMS-like tyrosine kinase 3*), који је члан групе тирозин-киназних рецептора типа III [14]. Овај протеин се углавном експримира на матичним ћелијама хематопоезе и учествује у контроли њихове диференцијације и пролиферације [15]. Током хематопоезе, везивање одговарајућег лиганда за рецептор *FLT3* доводи до димеризације рецептора, активације рецепторске тирозин-киназе, аутофосфорилације рецептора и активације низводних сигналних путева [16]. Описане су две класе активирајућих мутација у гену за ре-

## Correspondence to:

Milica ČOLOVIĆ  
Institut za hematologiju  
Klinički centar Srbije  
Dr Koste Todorovića 2,  
11000 Beograd, Srbija  
marcolov@sbb.rs

цептор *FLT3*. У прву класу убрајају се унутрашње тандемске дупликације (енгл. *internal tandem duplication*) у егзонима 14 и 15, које на протеинском нивоу доводе до инсерције одређеног броја аминокиселина [17, 18]. У другу класу мутација убрајају се супституције, мале делеције и инсерције [19, 20, 21]. Најчешћа мутација из друге групе је тачкаста мутација *D835* [22]. Све ове мутације су активирајуће и изазивају активацију рецептора независну од лиганда [16, 19, 20]. Мутације у гену за *FLT3* су најчешће генетичке аберације у акутној мијелоидној леукемији, а откривене су код око 30% одраслих болесника [16, 23]. У студији изведеној у Србији која је обухватила болеснике с акутном мијелоидном леукемијом показано је да је учесталост мутације *FLT3-ITD* 17,7%, а мутације *D835* 3,5%, те да је мутација *FLT3-ITD* неповољан прогностички маркер [24].

## ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да се установи мутација *JAK2-V617F* код болесника са мијелопролиферативним неоплазијама. Испитано је и постојање мутације *FLT3-ITD* код ових болесника ради расветљавања хипотезе о сличној улози ова два молекуларногенетичка маркера у хематолошким малигнитетима.

## МЕТОДЕ РАДА

### Алел-специфични PCR у утврђивању мутације *JAK2-V617F*

Мутација *JAK2-V617F* је установљена према модификованом протоколу Бакстера (*Baxter*) и сарадника [5]. Као извор ДНК коришћени су гранулоцити периферне крви који су изоловани на градијенту фикола (*SIGMA Aldrich, USA*) према упутству произвођача. Геномска ДНК изолована је из гранулоцита коришћењем *QIA-ampDNA BloodMini Kit (QIAGEN, Germany)*. За PCR амплификацију коришћено је 80 ng ДНК за сваки узорак. Прајмери коришћени у PCR амплификацији били су:

- контролни (*Fcont*): 5'ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG3'
- специфични (*Fspec*): 5'AGCATTTGGTTTTAAAT-TATGGAGTATATT3'
- реверзни (*Rev*): 5'CTGAATAGTCCTA-CAGTGTTTTCAGTTTCA3'

Амплификација прајмерима *Fcont* и *Rev* даје производ од 364 базних парова (*bp*) који се добија и са нормалног и са мутантног алела, а служи као интерна контрола PCR. Амплификација са прајмерима *Fspec* и *Rev* даје производ од 203 *bp* са мутантног алела уколико постоји мутација. Модификација методе односи се на увођење два одвојена циклуса амплификације. Први циклус урађен је са 1  $\mu\text{mol/l}$  прајмерима *Fcont* и *Rev*, а други циклус са 1  $\mu\text{mol/l}$  прајмерима *Fspec* и *Rev*. У свим реакцијама коришћена је полимераза *QIAGEN Hot start*. Услови за први циклус умножавања били су 15 мину-

та на 95°C, а затим 35 циклуса (94°C, 58°C и 72°C, сваки у трајању од 30 секунди) и 10 минута на 72°C финалне елонгације. Услови за други циклус били су исти, осим температуре хибридикације прајмера, која је била 62°C. Производи добијени применом PCR су анализирани на двоцентним агарозним геловима.

## Директно секвенцирање PCR производа

Геномска ДНК је изолована из гранулоцита периферне крви и амплификована у PCR коришћењем прајмера *Fcont* и *Rev*. PCR производ је секвенциран коришћењем прајмера *Rev* на машини *ABI 3700* применом комерцијалног сета (*BigDye Terminator Sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Хроматограми су анализирани софтвером *Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems)*.

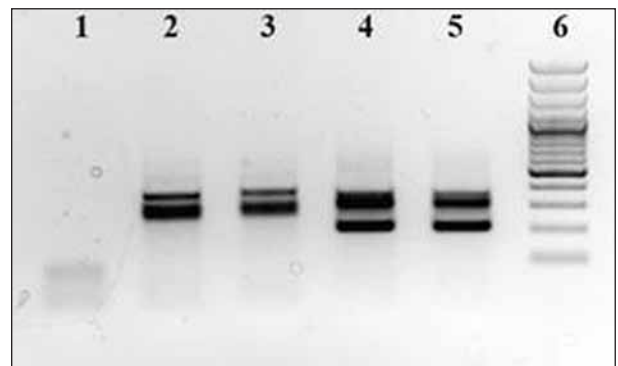
## Анализа постојања мутације *FLT3-ITD*

Мутација *FLT3-ITD* је анализирана методом коју је разрадила Чоловићева са сарадницима [24].

## РЕЗУЛТАТИ

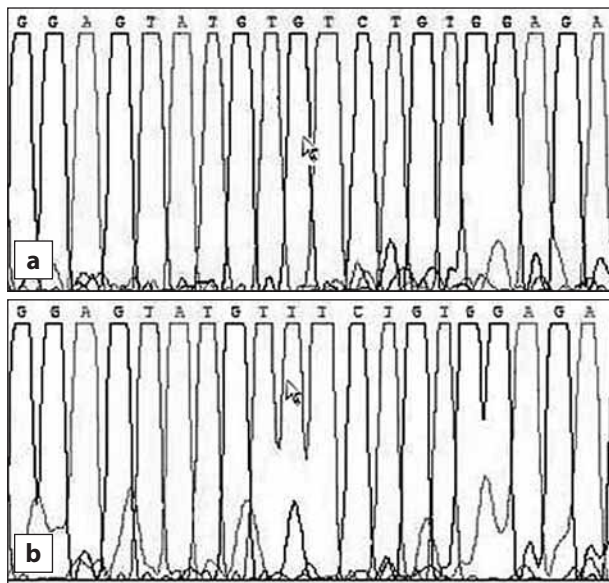
### Алел-специфични PCR у анализи постојања мутације *JAK2-V617F*

Методом алел-специфичне PCR анализиран је 61 болесник са потврђеном дијагнозом мијелопролиферативне неоплазије на мутацију *JAK2-V617F* или сумњом на ову дијагнозу. У студији је оптимизована осетљива, поуздана и брза метода за препознавање мутације *V617F* гена *JAK2*. Код 18 испитаника (34%) је установљена мутација, док је код 43 болесника (66%) није било (Слика 1). Код осам болесника је дијагно-



Слика 1. Откривање мутације *V617F* у гену *JAK2* методом алел-специфичног PCR

**Figure 1.** Detection of *JAK2-V617F* mutation by allele-specific PCR  
1 – контрола PCR; 2 и 3 – узорци болесника негативних за мутацију *JAK2-V617F*; 4 и 5 – узорци болесника позитивних за мутацију *JAK2-V617F*; 6 – ДНК маркер (лествица од 100 *bp*)  
1 – water control; 2 and 3 – *JAK2-V617F*-negative patients; 4 and 5 – *JAK2-V617F*-positive patients; 6 – DNA marker (100 *bp* ladder)



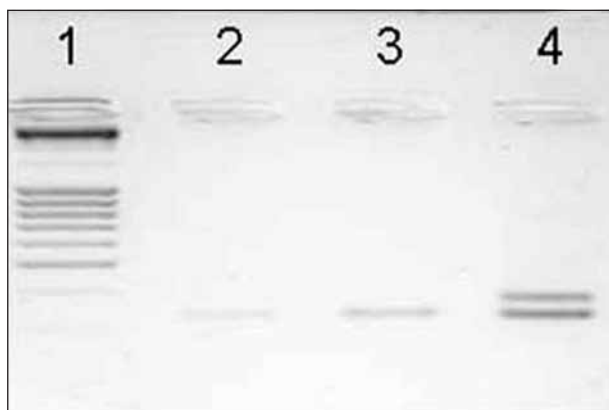
**Слика 2.** Директно секвенцирање *PCR* производа егзона 14 гена *JAK2* (a – секвенца ДНК која нема *JAK2-V617F* мутацију; b – секвенца ДНК са мутацијом *JAK2-V617F – G>T*)

**Figure 2.** Direct sequencing of exon 14 of *JAK2* gen amplified by *PCR* (a – wild type sequence; b – *JAK2-V617F* mutation – *G>T*)

стикована полицитемија вера, а код десет есенцијална тромбоцитемија. Да би се провериле поузданост и валидност оптимизоване методе, умножен је део егзона 14 гена *JAK2* методом *PCR* и секвенциран. Секвенцирањем је потврђена мутација *G>T* у егзону 14 гена *JAK2* (Слика 2).

### Анализа мутације *FLT3-ITD* код болесника позитивних на *JAK2*

Откривање мутације *FLT3-ITD* урађено је код 18 испитаника позитивних на мутацију *JAK2-V617F*. Сви они били су негативни на мутацију *FLT3-ITD* (Слика 3).



**Слика 3.** Откривање мутације *FLT3-ITD*. Анализа *PCR* производа на двопостотном агарозном гелу.

**Figure 3.** Detection of the *FLT3-ITD* mutation on 2% agarose gel electrophoresis

1 – ДНК маркер (лествица од 100 bp); 2 и 3 – узорци болесника негативних на *FLT3-ITD*; 4 – узорак болесника с акутном мијелоидном леукемијом позитивног на *FLT3-ITD* (позитивна контрола)

1 – DNA marker (100 bp ladder); 2 and 3 – *FLT3-ITD*-negative patients; 4 – *FLT3-ITD*-positive patient with acute myeloid leukaemia (positive control)

## ДИСКУСИЈА

Мијелопролиферативне неоплазије су група хематолошких малигних обољења која припада већој групи хроничних мијелопролиферативних болести, у које се убрајају и: хронична мијелоидна леукемија, хронична мијеломоноцитна леукемија, хиперезинофилни синдром и хронична еозинофилна леукемија [6]. Мијелопролиферативне неоплазије се одликују интензивном хематопоезом независном од стимулације факторима раста, као што су еритропоетин и тромбопоетин [2, 3, 4]. Главна клиничка компликација ових обољења је тромбоза, мада се може јавити и крварење [5]. Као касна компликација полицитемије вере и есенцијалне тромбоцитемије могу настати мијелофиброза и акутна мијелоидна леукемија [5]. Касни стадијум примарне мијелофиброзе одликује се фиброзом коштане сржи, цитопенијом и спленомегалијом, и такође може прећи у акутну мијелоидну леукемију [5].

Активирајућа соматска мутација *V617F* у гену *JAK2* узрок је клоналне пролиферације код мијелопролиферативних неоплазија. Готово истовремено су током 2005. године четири групе истраживача установиле ову мутацију код већине болесника са полицитемијом вером и код око половине болесника с есенцијалном тромбоцитемијом и примарном мијелофиброзом [5-10]. Истраживања су показала да гранулоцити изоловани из крви ових болесника расту у култури ћелија без додатака фактора раста [2, 3, 4].

Фамилија *JAK* обухвата нерцепторске тирозин-киназе *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* и *TYK2*. Ове киназе су спрегнуте с рецепторима за цитокине и преносе сигнале низводно од типа *I* и типа *II* цитокиних рецептора до једра посредством сигналних преносилаца и регулатора транскрипције (*STAT*) [12, 13]. Протеини *STAT* су транскрипциони фактори укључени у многе ћелијске процесе, као што су пролиферација, диференцијација и апоптоза [12, 13]. Имају важну улогу у имуном одговору, ангиогенези и хематопоези, а мутације у генима за протеине *STAT* доводе до развоја солидних и хематолошких тумора [12, 13].

У нормалним условима *JAK* протеини се активирају преко интермолекуларних и интрамолекуларних фосфорилација, када се за цитокини рецептор веже његов одговарајући лиганд (нпр. еритропоетин, тромбопоетин) [25]. Фосфорилација преко *JAK* протеина регрутује протеине *STAT*. Активирани протеини *STAT* димеризују и транслоцирају се у једро, где доводе до активације експресије различитих гена [25]. Протеини *STAT* су првобитно били означени као циљни ефектори *JAK* протеина, док новија истраживања показују да и други стимулуси могу да активирају *STAT* пут независно од *JAK* протеина. Један од аберантних путева активације *STAT5* пута одвија се под утицајем мутаног *FLT3-ITD* производа, што је описано у неколико студија [26, 27]. Каскада која укључује протеин *STAT5* мења апоптотски одговор, самообнављање и пролиферативни капацитет мијелоидних ћелија [28]. Ова чињеница потпуно објашњава мијелоидну проли-



ферацију у коју су укључени мутирани протеини *JAK* или *FLT3*. Показано је да нормалан *FLT3* протеин не користи *STAT5* пут сигналне трансдукције, док мутирани *FLT3-ITD* користи овај пут потпуно независно од *JAK* протеина [29].

Према хипотези двоструког мутационог догађаја (енгл. *two-hit model*), у леукемогенези је потребна кооперација две независне мутације: мутације класе 1, која изазива мијелопротиферацију, и мутације класе 2, која узрокује блок у диференцијацији [30]. Према овом критеријуму, мутације *JAK2-V617F* и *FLT3-ITD* припадају истој класи мутација – класи 1.

Циљ нашег истраживања био је да се утврди да ли мутација *FLT3-ITD* постоји код болесника са мијелопротиферативним неоплазијама који имају мутацију у гену за *JAK2*. Анализа гена *FLT3* код 18 болесника са мутацијом *JAK2-V617F* показано је да ген за *FLT3* код њих није мутиран. Досад је у литератури описано неколико случајева удружености мутираних *JAK2* и *FLT3* гена код особа с акутном мијелоидном леукемијом [28, 31]. Претпоставља се да је код ових болесника, који имају удружене мутације у *JAK2* и *FLT3* гену, реч о два независна клона [32]. Постојање другог маркера пролиферације могло би да објасни развој мијелопротиферативних неоплазија у акутну мијелоидну леукемију, која је једна од касних компликација ове групе обољења. Сви болесници нашег истраживања су испитани на постојање мутација *JAK2-V617F* и *FLT3-ITD* у раној фази болести, непосредно

након постављања дијагнозе на основу других критеријума. Дугорочно клиничко праћење ових болесника на маркере пролиферације, међу којима је и *FLT3-ITD*, могло би да има значаја у расветљавању патогенезе ових обољења и њихово напредовање у акутну мијелоидну леукемију.

## ЗАКЉУЧАК

Према новим критеријумима Светске здравствене организације из 2008. године, мутација *V617F* у гену за *JAK2* уведена је у групу главних критеријума за дијагностиковање полицитемије вере, односно у групу помоћних критеријума за утврђивање есенцијалне тромбозитемије [33]. Ово говори о значају откривања ове мутације код болесника с мијелопротиферативним неоплазијама. Треба истаћи и да су у последњим фазама клиничких испитивања лекови који испољавају своје терапеутско дејство на молекуларногенетички маркер мијелопротиферативних неоплазија, мутацију *JAK2-V617F*. Када ови лекови почну да се примењују, значај дијагностике ове мутације биће још већи.

## НАПОМЕНА

Овај рад је урађен у оквиру пројекта 145061 Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије.

## ЛИТЕРАТУРА

- Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003; 200-24.
- Dai CH, Krantz SB, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera blood burst-forming units-erythroid are hypersensitive to interleukin-3. *J Clin Invest*. 1991; 87(2):391-6.
- Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood*. 2000; 96(10):3310-21.
- Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, Barnache S, Blanchet B, LeCouedic JP, et al. Overexpression of FKP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood*. 2002; 100(8):2932-40.
- 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(9464):1054-61.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the *JAK2-V617F* mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005; 106(6):2162-8.
- 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(17):1779-90.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired *JAK2* mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005; 280(24):22788-92.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037):1144-8.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4):387-97.
- Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of *Jak2* tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell*. 2003; 14(4):1448-59.
- Mertens C, Darnell JE Jr. SnapShot: *JAK-STAT* signaling. *Cell*. 2007; 131(3):612.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. *JAK-STAT* signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*. 2007; 282(28):20059-63.
- Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*. 1991; 9(2):380-5.
- Shurin MR, Esche C, Lotze MT. *FLT3*: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998; 9(1):37-48.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100(5):1532-42.
- Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, et al. *Flt3* mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and *STAT5* pathways. *Blood*. 2000; 96(12):3907-14.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *Flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996; 10(12):1911-8.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001; 97(8):2434-9.
- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human *FLT3*: implications for mutational analysis. *Br J Haematol*. 2001; 113(4):1076-7.
- Thiede C, Studel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002; 99(12):4326-35.
- Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the *FLT3* gene in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 100(9):3423-5.

23. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44(6):905-13.
24. Colovic N, Tosic N, Aveic S, Djuric M, Milic N, Bumbasirevic V, et al. Importance of early detection and follow up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2007; 86(10):741-7.
25. Tefferi A. JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49(3):388-97.
26. Beisenherz-Huss C, Mundt M, Herrala A, Vihko P, Schubert A, Groner B. Specific DNA binding and transactivation potential of recombinant, purified Stat5. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 183(1-2):101-12.
27. Chen J, Sadowski HB, Kohanski RA, Wang LH. Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(6):2295-300.
28. Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005; 106(1):265-73.
29. Choudhary C, Brandts C, Schwäble J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*. 2007; 110(1):370-4.
30. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol*. 2002; 39(4 Suppl 3):6-11.
31. Schnittger S, Bacher U, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. JAK2 seems to be a typical cooperating mutation in therapy-related t(8;21)/AML1-ETO-positive AML. *Leukemia*. 2007; 21(1):183-4.
32. Iwanaga E, Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. A JAK2-V617F activating mutation in addition to KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2009; 94(3):433-5.
33. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1):14-22.

## JAK2-V617F Mutation in Patients with Myeloproliferative Neoplasms: Association with FLT3-ITD Mutation

Vesna Spasovski<sup>1</sup>, Nataša Tošić<sup>1</sup>, Tatjana Kostić<sup>1</sup>, Sonja Pavlović<sup>1</sup>, Milica Čolović<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade, Serbia;

<sup>2</sup>Institute of Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

### SUMMARY

**Introduction** An acquired somatic mutation V617F in Janus kinase 2 gene (JAK2) is the cause of uncontrolled proliferation in patients with myeloproliferative neoplasms. It is known that uncontrolled myeloid cell proliferation is also provoked by alteration in other genes, e.g. mutations in receptor tyrosine kinase FLT3 gene. FLT3 represents the most frequently mutated gene in acute myeloid leukaemia. Interestingly, mutated FLT3-ITD (internal tandem duplication) protein is a member of the same signalling pathway as JAK2 protein, the STAT5 signalling pathway. STAT5 activation is recognized as important for self-renewal of haematopoietic stem cells.

**Objective** The aim of this study was the detection of JAK2-V617F mutation in patients with myeloproliferative neoplasms. Additionally, we investigated the presence of FLT3-ITD mutation in JAK2-V617F-positive patients in order to shed the light on the hypothesis of a similar role of these two molecular

markers in haematological malignancies.

**Methods** Using allele-specific PCR, 61 patients with known or suspected diagnosis of myeloproliferative neoplasms were tested for the presence of JAK2-V617F mutation. Samples that were positive for JAK2 mutation were subsequently tested for the presence of FLT3-ITD mutation by PCR.

**Results** Eighteen of 61 analysed patients were positive for JAK2-V617F mutation. Among them, 8/18 samples were diagnosed as polycythaemia vera, and 10/18 as essential thrombocythaemia. None of JAK2-V617F-positive patient was positive for FLT3-ITD mutation.

**Conclusion** This study suggests that one activating mutation is sufficient for aberrant cell proliferation leading to malignant transformation of haematopoietic stem cell.

**Keywords:** myeloproliferative neoplasms; JAK2-V617F mutation; allele-specific PCR; FLT3-ITD mutation