



Molekylärgenetisk diagnostik av Polycytemia vera, Essentiell trombocytemi och Primär myelofibros.

Författare: Rolf Billström Docent, Överläkare Medicin 1, Skaraborgs Sjukhus, Skövde och Eva Arkblad sjukhusgenetiker, Unilabs AB, Skövde

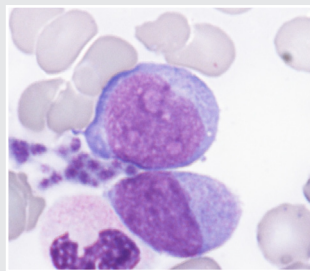
Analys avseende förekomst av JAK2 V617F med PCR på venblod är idag en viktig hörnsten vid utredning av förhöjt blodvärde, oförklarad trombocytökning eller annan klinisk bild som inger misstanke på myeloproliferativ sjukdom.

Philadelphianegativa myeloproliferativa sjukdomar inkluderar Polycytemia vera (PV), Essentiell trombocytemi (ET) och Primär myelofibros (PMF). Dessa sjukdomar har liknande klinisk presentation och kan ibland även övergå i varandra. Vid ET ses en okontrollerad ökning av trombocytbildning. Detta resulterar i kraftigt förhöjda trombocytvärden i blodet, vilket innebär ökad risk för proppbildning (tromboembolism) såväl på artär- som vensidan. Dessutom kan paradoxalt nog ökad blödningsbenägenhet uppstå, eftersom trombocytfunktionen och delar av koagulationskaskaden kan störas när trombocytkoncentrationen i blodet blir kraftigt ökad. Vid PV ses också ökad trombocytbildning,

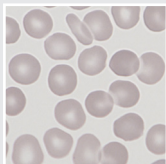
men här karakteriseras sjukdomsbilden framför allt av ökad bildning av röda blodkroppar med förhöjd Hb-koncentration och förhöjd hematokrit ("tjocklek"). Även PV utmärks av riskökning för proppstillstånd. PMF karakteriseras av bindvävsökning i benmärgen (fibros), sannolikt relaterad

till abnormt ökad förekomst av megakaryocyter (förstadiacell till trombocyter), störd arkitektur i benmärgen samt blodbildning i mjälte och lever. Symptomen vid PMF varierar, liksom allvarlighetsgraden.

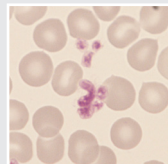
Till viss del har dessa sjukdomar en gemensam molekylär bakgrund där mutation har uppstått i en hematopoietisk (blodbildande) stamcell vilket orsakar en klonalt ökad tillväxt (proliferation) av en eller flera blodcelltyper. Det är ingen nedärvd eller medfödd mutation. Den uppstår under livet, oftast i vuxen ålder, ses bara i blod- och benmärgsceller och är alltså ett exempel på s.k. somatisk mutation.



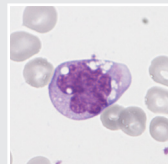
Progenitor "STAMCELL"



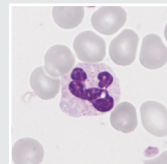
Röda blodkroppar
Erythrocyter



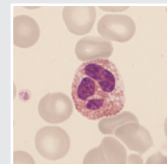
Blodplättar
Trombocyter



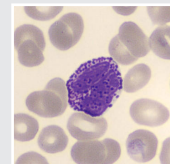
Monocyt



Neutrofil



Eosinofil



Basofil

SJUKDOM:

Polycytemia vera
Essentiell trombocytemi
Primär myelofibros

AKTIVERANDE MUTATION:

JAK2 V617F, JAK2 Exon 12
JAK2 V617F, MPLW515L, CALR Exon 9
JAK2 V617F, MPLW515L, CALR Exon 9



Molekylärgenetisk diagnostik av Polycytemia vera, Essentiell trombocytemi och Primär myelofibros.

▶ ▶ Fortsättning från sid 1

Att cellproliferationen är klonal vid dessa sjukdomar har varit känt i många år, men man har inte haft någon klar bild av bakomliggande mutation(-er) fram tills 2005. Då publicerade två oberoende forskargrupper uppgifter om att JAK2 mutation är starkt knutet till PV/ET/PMF. Detta har ökat förståelsen för biologin bakom sjukdomarna, förbättrat och förenklat diagnostik och klassifikation samt gett underlag för utveckling av nya läkemedel.

JAK2

I stort sett alla med PV har en i blod- och benmärgsceller påvisbar mutation i genen för Janus kinas 2 (JAK2). Cirka 95% av patienterna uppvisar mutationen, JAK2 V617F i exon 14 som leder till ett aminosyrautbyte från valin till fenylalanin. JAK2-genen är lokaliserad på korta armen av kromosom 9. JAK2 V617F är en gain-of-function-mutation som medför en ökad STAT-signalering och därmed en ökad/påskyndad celledelning. Resterande 4-5% har nästan alla i stället olika mutationer i exon 12 i JAK2. Mutationer i exon 12 i JAK2 kan vara komplexa men involverar vanligen aminosyra nr 539, som normalt är lysin.

Vid ET kan i ca 50% av fallen JAK2 V617F påvisas, alltså samma som den vanligaste mutationen hos patienter med PV. Även vid PMF har ungefär hälften av fallen JAK2 V617F-mutationen. Det förekommer även en klinisk glidning eller utveckling av sjukdomstillståndet och det som från början ser ut som ET kan komma att utveckla sig till PV eller till PMF. Generellt ser man en högre andel JAK2-mutationer (allelfrekvens) i cellerna från patienter med PV än ET eller PMF. Många PV-patienter har en homozygot mutation i sina klonala celler där en rekombination lett till att muterad JAK2 V617F förekommer på båda kopiorna av kromosom 9. En sådan rekombination följd av klonal expansion kan möjligen förklara en del av transformation från ET till PV. JAK2 exon12 mutationer ses normalt inte vid ET eller PMF.

MPL

Trombopoietinreceptorn MPL, ligger nedströms i JAK/STAT-signalkedjan och mutationer i exon 10 i MPL-genen har identifierats i ca 5% av patienter med ET och lite oftare hos patienter med PMF. Vanligast är mutationer som involverar ett aminosyrautbyte i position 515, från tryptofan till leucin, lysin, asparagin eller alanin. Alla dessa mutationer medför en aktivering av JAK/STAT-signalvägen och medför ökad celltillväxt. Spekulativt har MPL-mutationer en svagare påverkan på signaleringen då de inte påvisas hos patienter med PV.

CALR

Nyligen upptäcktes att mutationer i calretikulingenen (CALR) kunde påvisas i majoriteten (ca 70-80%) av de fall av ET och PMF där man tidigare inte kunnat hitta någon orsakande

mutation. CALR-mutationer förekommer i många olika, mer eller mindre komplexa former av deletioner/insertioner i exon 9, som alla har det gemensamma att de orsakar ett frame-shift till samma alternativa läsram och medför att calreticulinproteinets C-terminala ända byter laddning från övervägande negativa aminosyror till övervägande positiva aminosyror. CALR-mutationerna ses bara i JAK2- och MPL-negativa fall ("mutually exclusive"). Endera mutationen tycks alltså vara tillräckligt för att orsaka sjukdom. Man har även sett att CALR-muterade fall av ET och PMF verkar ha en annan klinisk utveckling än JAK2-muterade. Patienter med CALR-mutationer har en lägre risk för tromboser och verkar inte ha risk att utveckla PV. Risken för att få myelofibros verkar dock vara den samma. Patienterna är även, vid diagnos, generellt yngre och har lägre hemoglobinnivå och vita blodkroppar samt högre erytropoetin (EPO) och fler trombocyter.

Klinisk betydelse

I vissa fall där JAK2 V617F inte kan påvisas, går man vidare med analys av förekomst av de andra relevanta mutationerna enligt ovan. Andelen (allelfrekvensen) JAK2-muterade celler kan mätas i förnyade prover under ett behandlingsförlopp med t ex interferon eller efter donatorstamcellstransplantation.

Så snart JAK2-mutationens patofysiologiska roll vid PV/ET/PMF stod klar 2005, så började läkemedelsforskningens jakt på JAK2-hämmande substanser i förhoppningen att denna verkningmekanism skulle kunna användas i behandlingen. En JAK-hämmare, ruxolitinib, har hittills nått till registrering i Sverige och används i viss utsträckning. Effekten vid PV och ET är begränsad. Preparatets mest markanta kliniska effekt är egenskapen att vid PMF kunna krympa mjältstorleken, minska allmänsymptom som smärtor och avmagring samt att förbättra blodvärdena och möjligen också förbättra överlevnaden vid denna sjukdom. Många andra mer eller mindre specifika JAK-2-inhibitorer är i utvecklingspipeline, och flera har nått klinisk prövning med positiva resultat.

Referenser

Rumi et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocytemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 123 (10) s 1544-1551 (2014).

Tefferi A and Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocytemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 90 (2) s 162-173 (2015)

Vainchenker W and Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 32 s 2601-2613 (2013).