



М.В. Дибков¹, І.Р. Гартовська², Г.Д. Телегеев¹, С.С. Малюта¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Гематологічне відділення Київського обласного онкодиспансеру МОЗ України, Київ

РОЗРОБКА ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЇ V617F ГЕНА JAK2 У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ



Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано тест-систему для виявлення мутації за допомогою методу зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції та прямого секвенування отриманих ампліфікатів.

Ключові слова: V617F, JAK2, мієлопроліферативні захворювання, діагностика, ПЛР.

З кожним роком молекулярно-генетичні методи все ширше впроваджуються в клінічну практику як для вдосконалення діагностичних критеріїв, так і для контролю ефективності лікування. І хоча молекулярно-генетичні тести в більшості випадків не самодостатні, проте вони значно прискорюють установлення діагнозу та підвищують його достовірність.

Хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) – гетерогенна група неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. До ХМПЗ у різний час відносили різні захворювання. Так, у 1951 р. W. Dameshek, який запропонував термін «мієлопроліферативні захворювання» (МПЗ), відніс до них хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), справжню поліцитемію (СП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ), ідіопатичний мієлофіброз (ІМФ) та еритролейкемію [1].

Згідно з чинною класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я до хронічних міє-

лопроліферативних захворювань відносяться хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), хронічна нейтрофільна лейкемія, хронічна еозинофільна лейкемія, справжня поліцитемія, есенціальна тромбоцитемія, ідіопатичний мієлофіброз та некласифіковані хронічні мієлопроліферативні захворювання.

Донедавна лише для ХМЛ було описано чіткий цитологічний маркер – *Ph*-хромосому [t (9; 22)(q34; q11)]. Описана транслокація на молекулярному рівні призводить до утворення химерного гена *bcr/abl*, виявлення якого за допомогою ЗТ-ПЛР значно спростило діагностику цього захворювання.

Оскільки для решти ХМПЗ донедавна молекулярно-генетичних маркерів не було описано, то їх називали *Ph*-негативними хронічними мієлопроліферативними захворюваннями. Але в 2005 р. майже одночасно вийшли роботи [3–7], де було описано мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2*, який локалізовано на дев'ятій хромосомі, що призводила до заміни G → T і, відповідно, на рівні білка – валіну на фенілаланін у позиції 617. Мутація



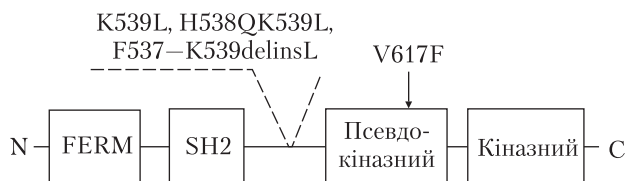


Рис. 1. Схема доменної організації білка JAK2 та локалізація основних мутацій, що виявляються у пацієнтів з хронічними мієлопроліферативними захворюваннями. Домен: FERM – FERM гомологічний (F – з білком 4.1, E – з езріном, R – з радксином, M – з мезином); SH2 – SRC 2 гомологічний. Стрілками позначено локалізацію мутацій

V617F виявляється у 80–95 % хворих на справжню поліцитемію, приблизно у 50 % хворих на есенціальну тромбоцитемію, ідіопатичний мієлофіброз та у 20 % хворих на хронічну нейтрофільну лейкемію. Окрім мутації V617F описано ряд змін в 12-й екзоні гена *jak2* (K539L, H538QK539L, F537-K539delinsL тощо) [8]. Ці зміни виявляють у 5 % хворих на справжню поліцитемію.

Вважається, що на функціональному рівні мутації в псевдокіназному домені призводять до втрати регуляції та конститутивної активації JAK2 тирозинкінази (подібно до активації кінази ABL в складі химерного білка BCR/ABL). Внаслідок цього відбувається втрата регуляції JAK-STAT сигнального шляху, що призводить до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів.

Локалізацію описаних мутацій наведено на рис. 1.

Виходячи з отриманих даних у 2008 р. було запропоновано ревізію класифікації та діагностичних критеріїв для мієлопроліферативних захворювань [9–10]. І хоча мутація V617F не є специфічною для якогось одного захворювання, її було включено як важливий діагностичний критерій. Так у разі її виявлення виключають вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку (secondary bone marrow fibrosis) тощо. На сьогодні в Україні такі тест-системи не розробляються.

Дана робота присвячена питанню створення розробки тест-систем для виявлення мутації V617F за допомогою ПЛР та прямого сиквенування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для виявлення мутації нами використовувалися зразки крові хворих (за їх згодою), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли за методом [11] або за допомогою комерційних наборів для виділення РНК фірм Qiagen та MO BIO Laboratories Inc. Для проведення зворотної транскрипції використовували 1x буфер для зворотної транскриптази, 1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer, 300 од зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20 од РНАзіну та 1–3 мкг РНК. Реакцію проводили при температурі 42 °С протягом 1 год і зупиняли протягом 10 хв прогріванням при 70 °С. Для проведення ПЛР відбирали 2 мкл реакційної суміші. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94 °С – 35 с, 55 °С – 35 с, 72 °С – 45 с.) з використанням 10 pmol праймерів J1F (5'-CACCAACATTCAGAGGCCTAC-3') та J1R (5'-GCCAGGATCACTAAGTTTGATG-3'). Для проведення другого етапу ПЛР (в разі недостатньої кількості ампліфікату для проведення сиквенування) відбирали по 0,5 мкл реакційної суміші і проводили синтез із використанням праймерів J2F (5'-CGGTCAACTGCATGAAACAG-3') та J2R (5'-TTGGCACATACATTCCTCATG-3'). Для позитивного контролю використовували праймери для виявлення β-актину (5'-GCTCGTCGTCCGACAACGGCTC-3' та 5'-CAAACATGATCTGGTTCATCTTCTC-3') (Invitrogen, США) та/або 18s rRNA (5'-CGGCTACCACATCCAAGAA-3' та 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'). Продукти ампліфікації аналізували в 2%-му агарозному гелі.

Отримані продукти ПЛР були очищені та сиквенувані з використанням праймерів J2F, J2R. Отримані послідовності були проаналізовані за допомогою програм BioEdit та BLAST.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень для виявлення мутації V617F ми запропонували використовувати зворотно-транскриптазну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР) з подальшим прямим сиквенуванням отриманих ампліфікатів. Хоча виявлення мутації можливе і без проведення зворотної транскрипції з використанням ПЛР ДНК, вважаємо за доцільне використання саме ЗТ-ПЛР, оскільки отриману на першому етапі аналізу кДНК можна також використовувати для виявлення інших можливих генетичних змін (наприклад, злитого гена *bcr/abl* [12]), тобто даний підхід уніфікує початкові процедури дослідження зразків крові. РНК виділяли переважно за допомогою методу [11], однак використання комерційних наборів для виділення РНК не призводило до будь-яких проблем при проведенні аналізів. Комплементарну ДНК синтезували з використанням затравки розсіяного праймеру d(NTP)₆, що дає можливість виявляти не тільки мутації в гені *jak2*, а й інші генетичні аномалії, насамперед генетичні зміни гена *bcr/abl*.

Перший етап ПЛР, який проводили з використанням праймерів J1F та J1R зазвичай не дає кількості продукту, необхідної для електрофоретичного аналізу та подальшого сиквенування ампліфікатів. Тому проводили другий етап ПЛР використовуючи аліквоту ПЛР-продукту з першого етапу та внутрішні праймери J2F та J2R. Окрім збільшення кількості продукту використання внутрішніх праймерів забезпечує додаткову специфічність діагностики. Оскільки праймери підбрано на різні екзони гена *jak2* і ген має протяжні інтрони, то домішки ДНК не можуть впливати на проведення ЗТ-ПЛР.

Сиквенування ампліфікатів проводили на автоматичному сиквенаторі з використанням праймерів (роздільно) J2F та J2R. Сиквенування обох ланцюгів ампліфікату слугує для високої надійності виявлення мутації та виключення випадкових артефактів при встановленні послідовності.

Мутація V617F, яка, як згадувалося вище, призводить до заміни валін та фенілаланін, є наслідком точкової мутації G→T, тобто зміни кодону GTC на TTC. Оскільки кількість молекул із мутацією та без неї може змінюватися, то

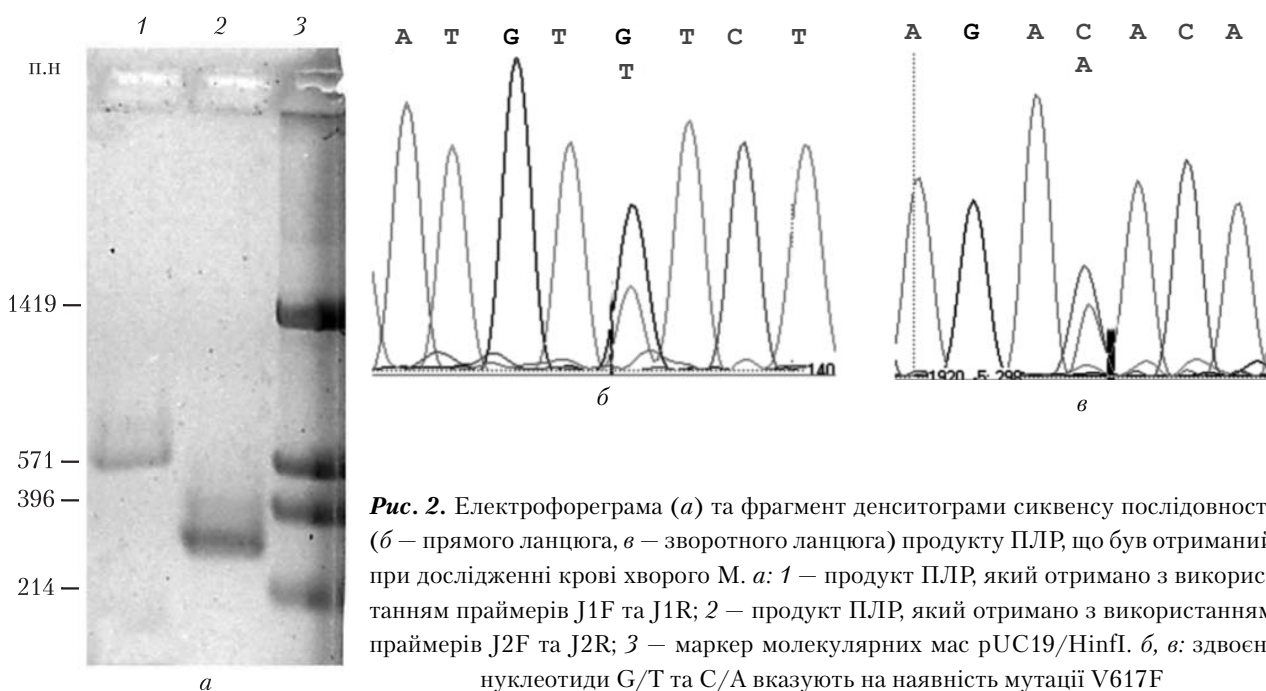


Рис. 2. Електрофореграма (а) та фрагмент денситограми сиквенсу послідовності (б – прямого ланцюга, в – зворотного ланцюга) продукту ПЛР, що був отриманий при дослідженні крові хворого М. а: 1 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J1F та J1R; 2 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J2F та J2R; 3 – маркер молекулярних мас рUC19/HinfI. б, в: здвоєні нуклеотиди G/T та C/A вказують на наявність мутації V617F

при аналізі послідовності ампліфікатів необхідно обов'язково проводити візуальний аналіз вихідних даних сиквенатора (за допомогою передвстановленого програмного забезпечення чи безкоштовних програм на кшталт BioEdit) або знижувати в програмному забезпеченні поріг виявлення нуклеотидів до 5–10 %.

На рис. 2 представлено електрофореграму продуктів ПЛР та результати сиквенування ампліфікатів хворого М., 1942 року народження, який хворіє на справжню поліцитемію від 1999 р. Хворий отримував симптоматичну та специфічну терапію. Як видно з рисунка, на денситограмі спостерігаються два піки, що відповідають нуклеотидам G і T в позиції 2343 (нумерація згідно з послідовністю мРНК *jak2* NM_004972.2 Homo sapiens Janus kinase 2), тобто виявляється як нормальний ГТС-кодон, так і мутантний ТТС. Аналогічна картина спостерігається в послідовності нуклеотидів у зворотних ланцюгах ампліфікату (виявлено заміну С→А в позиції 2343), тобто було виявлено мутацію V617F, що є молекулярним підтвердженням поставленого діагнозу «*справжня поліцитемія*».

Хоча, як було зазначено вище, мутація V617F виявляється переважно у хворих на *Ph*-негативні хронічні мієлопроліферативні захворювання, траплялися випадки одночасного виявлення мутації V617F та злитого гена *bcr/abl*. Так, при аналізі крові хворої на ХМЛ пацієнтки Г., 1938 року народження, було виявлено як мутацію в гені *jak2*, так і підтверджено наявність злитого гена *bcr/abl* за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (згідно з [12]).

Природа таких випадків не з'ясована. Можливими вважаються дві теорії. За першою причиною одночасного виявлення описаних змін є присутність двох різних клонів, кожен з яких несе одну мутацію [13]. Друга теорія припускає, що обидві мутації мають місце в одному клоні, причому мутація в гені *jak2* передуює утворенню химерного гена *bcr/abl* [14]. Однак обидва припущення вимагають подальших досліджень.

Наведені результати свідчать про ефективність наведеного протоколу виявлення мутації V617F за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування для використання в молекулярно-генетичній диференційній діагностиці хронічних мієлопроліферативних захворювань. Дану систему можна рекомендувати до впровадження в профільних закладах системи охорони здоров'я, насамперед в гематологічних відділеннях обласних клінічних лікарень та медико-генетичних лабораторіях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes // *Blood*. — 1951. — V. 6. — P. 372–375.
2. Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms // *Blood*. — 2002. — V. 100. — P. 2292–2302.
3. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // *Lancet* 2005. — V. 365, N 9464. — P. 1054–1061.
4. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // *N Engl J Med* 2005. — V. 352, N 17. — P. 1779–1790.
5. Levine R.L., Wadleigh M., Coombs J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell* 2005. — V. 7, N 4. — P. 387–397.
6. Zhao R., Xing S., Li Z. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J Biol Chem*. 2005. — V. 280, N 24. — P. 22788–22792.
7. James C., Ugo V., Le Couedic J.P. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // *Nature* 2005. — V. 434. — P. 1144–1148.
8. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis // *N Engl J Med*. 2007. — V. 356, N 5. — P. 459–468.
9. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms // *Leukemia* 2008. — V. 22. — P. 14–22.
10. Spivak J.L., Silver R.T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal // *Blood* 2008. — V. 112, N 2. — P. 231–239.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* 1987. — V. 162. — P. 156–159.



12. Телегеев Г.Д., Дыбков М.В., Божко М.В. та ін. Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // Республіканський центр науково-медичної інформації. — Київ, 1997. — 20 с.
13. Hussein K., Bock O., Seegers A., Flasshove M. et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation // Blood 2007. — V. 109, N 9. — P. 4106—4107.
14. Vocchia M., Vannucchi A.M., Gozzetti A. et al. Insights into JAK2-V617F mutation in CML // Lancet Oncol 2007. — V. 8. — P. 864—866.

*М.В. Дыбков, И.Р. Гартовская,
Г.Д. Телегеев, С.С. Малиута*

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ V617F ГЕНА JAK2
У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Мутация V617F гена *jak2* является важным диагностическим критерием при хронических миелопролифератив-

ных заболеваниях. Предложено тест-систему для выявления мутации с помощью метода обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции и прямого секвенирования полученных амплификатов.

Ключевые слова: V617F, JAK2, миелопролиферативные заболевания, диагностика, ПЛР.

*M.V. Dybkov, I.R. Gartovska,
G.D. Telegeev, S.S. Maliuta*

DEVELOPMENT OF TEST SYSTEM
FOR DETECTION OF V617F MUTATION
OF JAK2 GENE IN PATIENTS WITH CHRONIC
MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

V617F mutation of *jak2* gene is an important diagnostic criterion for chronic myeloproliferative disorders. The test-system for detection of the mutation by using the method of reverse transcription polymerase chain reaction and direct sequencing of PCR products was proposed.

Key words: V617F, JAK2, myeloproliferative disorders, diagnostics, PCR.

Надійшла до редакції 17.04.09.

