

Neoplasias mieloproliferativas Ph y JAK2 V617F negativas: experiencia institucional en la detección de otras mutaciones en *CALR*, *MPL* y *JAK2* (exón 12)

Myeloproliferative neoplasms Ph and JAK2-V617F negative: institutional experience in detection of other mutations in *CALR*, *MPL* and exon 12 of *JAK2*

Zanella ME, Maldonado AC*, Corio C, Gutiérrez MI.

Stamboulían Laboratorio, Buenos Aires, Argentina.

**Actualmente en Laboratorio Manlab, Bs As, Argentina*

mgutierrez@stamboulían.com.ar

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL EN EL MARCO DEL XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA

Fecha recepción: 02/07/2018

Fecha aprobación: 17/12/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 22 n° 3: 244-249

Septiembre - Diciembre 2018

Palabras claves: mieloproliferativo, perfil mutacional, clonalidad.

Keywords: myeloproliferative, mutational profile, clonality.

Resumen

Las neoplasias mieloproliferativas que no presentan cromosoma Filadelfia ni la mutación 1849G>T (V617F) en el gen *JAK2* (NMP Ph-/*JAK2*-) pueden presentar mutaciones en los genes calreticulina (*CALR*), del receptor de trombopoyetina (*MPL*) y en el exón 12 de *JAK2* (ex12*JAK2*) en aproximadamente 50% de los casos. Éstas tienen implicancia clínica y se sugieren como algoritmo diagnóstico para estos pacientes. Más aún, el tipo de mutación es un nuevo factor pronóstico en algunas situaciones. Por lo tanto se realizó un estudio retrospectivo del perfil mutacional de pacientes con diagnóstico posible o confirmado de NMP Ph-/*JAK2*-. Se rea-

lizaron 296 estudios moleculares en 238 casos (53 TE, 6 PV, 10 MF y 169 posibles neoplasias mieloproliferativas). Se observaron 56 mutaciones en *CALR* (29%), de las cuales el 41% eran deleción tipo 1, 37% inserción tipo 2 y 22% otras variantes, 3 de ellas noveles, no descritas previamente. Estas mutaciones diferentes se observaron únicamente en TE. En el gen *MPL* se detectaron 3 mutaciones (6%), siendo las ya reportadas W515L (2) y W515K (1). No se observó ninguna mutación en ex12*JAK2* en sangre periférica de estos pacientes. En cuanto a los diagnósticos, el 49% de las TE y el 40% de las MF presentaron mutaciones en *CALR*. Una TE y una MF presentaron mutación en *MPL* (2% y 10%,

respectivamente), mientras que ninguna PV demostró mutaciones en estos genes. En los pacientes con diagnóstico la frecuencia de mutaciones en *CALR* y *MPL* fue la esperada, así como el perfil mutacional es similar a datos publicados. Todas las mutaciones fueron mutuamente excluyentes. El estudio de mutaciones permitió confirmar clonalidad en un subgrupo de pacientes con posible NMP, contribuyendo al diagnóstico.

Abstract

Philadelphia negative and JAK2-V617F negative myeloproliferative neoplasms (MPN Ph-/JAK2-) frequently carry mutations in other genes, namely calreticulin (*CALR*), thrombopoietin receptor (*MPL*) or in another region (exon 12) of *JAK2* (ex12*JAK2*). These mutations have clinical relevance and contribute to the present diagnostic algorithm. Furthermore, the type of mutation is a new prognostic factor in certain situations. Thus, we did a retrospective study of the mutational profile of *CALR*, *MPL* and ex12*JAK2* in patients with diagnosis or suspicion of MPN Ph-/JAK2-. We did 296 molecular tests in 238 cases (53 ET, 10 MF, 6 PV and 169 only characterized as potential MPN). We observed 56 mutations in *CALR* (29%): 41% type 1 deletion, 37% type 2 insertion and the remaining 22% were other variants, 3 of them not previously described. These unique variants were observed only in ET. In the *MPL* gene we found 3 mutations (6%): W515L (2) and W515K (1). We did not detect any ex12*JAK2* mutation in peripheral blood. Among those patients with a confirmed diagnosis, *CALR* was mutated in 49% of ET and 40% MF while *MPL* was mutated in 2% and 10%, respectively. No PV showed mutation in these genes. In diagnosed patients, these frequencies of mutations were as expected, similar to the mutational profile in the literature. All mutations were mutually exclusive. Our mutational analyses allowed confirmation of clonality in a subgroup of patients under evaluation for MPN, therefore contributing to the diagnosis.

Introducción

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) Filadelfia negativas son un grupo heterogéneo de patologías que comprende a la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP), además de otras enfermedades me-

nos frecuentes (mastocitosis, leucemia neutrofílica crónica y leucemia eosinofílica crónica)⁽¹⁾. La clasificación actual se basa en criterios clínicos, histológicos y moleculares⁽²⁾. Las mutaciones génicas no son específicas para una patología en particular, con lo cual el análisis molecular es parte importante del diagnóstico, pero el estudio anatómo-patológico de la médula ósea es fundamental. La principal vía patogénica es la del JAK-STAT siendo la mutación V617F en *JAK2* la alteración más frecuente. Ésta se observa en más del 95% de los pacientes con PV y aproximadamente en el 40-60% de los pacientes con TE y MFP⁽³⁾.

JAK2 es una tirosina-quinasa citoplasmática indispensable para la expansión celular mediada por factores de crecimiento. La mutación más frecuente es el cambio c.1849G>T, p.Val617Phe que resulta en la activación constitutiva de *JAK2*⁽⁴⁻⁶⁾. El estudio de esta mutación es importante en el diagnóstico de PV, TE o MFP, ya que indica su clonalidad, aunque no permita diferenciarlas.

En la última década se demostró que las NMP que carecen de la mutación V617F del *JAK2* (NMP Ph-/*JAK2*-) pueden presentar mutaciones en otros genes: calreticulina (*CALR*)⁽⁷⁻⁸⁾, gen del receptor de trombopoietina (*MPL*)⁽⁹⁾ y en el exón 12 de *JAK2* (ex12*JAK2*) en aproximadamente 50% de los casos⁽¹⁰⁾. Todas estas mutaciones son mutuamente excluyentes y también constituyen parte del algoritmo diagnóstico⁽¹¹⁻¹²⁾. En TE y MFP se sugiere el estudio de *CALR* y *MPL* mientras que en PV se debe estudiar el ex12*JAK2*. Más aún, en la clínica asistencial actual la determinación del tipo de mutación no sólo tiene valor diagnóstico, sino también pronóstico⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Calreticulina es una proteína chaperona que participa del plegado de las glicoproteínas en el retículo endoplásmico y en la homeostasis de iones Ca²⁺. Si bien el mecanismo no está totalmente dilucidado, *CALR* activa STATs⁽¹⁶⁾. Las mutaciones sólo se observaron en TE y MF; ocurren en el exón 9 del gen y generalmente comprenden pequeñas deleciones o inserciones produciendo un corrimiento del marco de lectura en una base⁽⁷⁻⁸⁾. Por lo tanto, se altera el extremo carboxi-terminal, perdiendo la señalización del retículo endoplásmico (residuos KDEL) y originando un dominio común a todas las mutaciones: los aminoácidos cargados negativamente se reemplazan por aminoácidos neutros o cargados positivamente. Esto afectaría la capacidad de la proteína mutada de

asociarse a los iones Ca^{2+} (17). Se describieron más de 50 *indels* diferentes pero hay dos que son las más frecuentes: delección de 52 pb (L367fs*46, tipo 1) e inserción de 5 pb (K385fs*47, tipo 2); ambas constituyen más del 80% de los pacientes con mutación(1,7,8,17). *CALR* mutado tipo 1 se asocia a mejor pronóstico en MF y menor riesgo de trombosis en TE, comparando con *JAK2* mutado(13,14,17,18).

MPL es el receptor de trombopoyetina y claramente las mutaciones del gen *MPL* también afectan la vía JAK-STAT. Las mutaciones ocurren en el exón 10, y generalmente son mutaciones puntuales en el trip-tófano 515 (W515L, W515K). Están descritas sólo en TE y MF y no se observaron en PV(9,16,19).

El gen *JAK2*, además de la mutación 1849G>T (V617F) en el exón 14, puede presentar mutaciones en el exón 12 descritas en 1-3% de las PV (siempre negativas para V617F) con pequeñas delecciones o inserciones(10,20,21).

El objetivo de este trabajo descriptivo consistió en evaluar el perfil mutacional en los genes *CALR*, *MPL* y *ex12JAK2* en pacientes con diagnóstico de NMP o posible NMP Ph-/*JAK2* V617F- en una institución ambulatoria, donde los tests se realizan siguiendo las órdenes médicas.

Materiales y métodos

Entre marzo 2014 y junio 2017 se analizaron 238 pacientes Ph- y *JAK2* V617F negativos: 53 pacientes con TE; 6 pacientes con PV; 10 pacientes con MF y 169 pacientes con posible NMP (diagnóstico definitivo no disponible). Estas muestras fueron anonimizadas, codificadas y no se relacionan a un paciente. Por lo tanto, no se establecerá correlación clínica con los resultados obtenidos. Sólo se utilizarán como población con neoplasia mieloproliferativa en estudio de nuestro laboratorio.

La metodología empleada para el análisis de los tres genes fue PCR-secuenciación. Para ello se extrajo ADN genómico de sangre periférica por el método automatizado MagNAPure Roche, Mannheim, Alemania. Según el pedido médico, se amplificaron los fragmentos correspondientes de los genes *CALR* (exón 9)(7), *MPL* (exón 10)(22) y *JAK2* (exón 12) (modificado de 23) y se secuenciaron mediante la técnica de Sanger en un equipo ABI3500, Applied Biosystems, Foster City, California. Las secuencias en ambos sentidos fueron analizadas visualmente utilizando el programa Chromas Pro. Las mutacio-

nes encontradas se compararon con las reportadas en la bibliografía.

Resultados

Se realizaron 296 estudios moleculares: 194 de *CALR*, 49 de *MPL* y 53 de *ex12JAK2*. En este estudio de 238 pacientes se observaron 56 mutaciones en *CALR* (29%) de 14 tipos diferentes, de las cuales el 41% era una delección de 52 pb, tipo 1 (L367fs*46) y 37% una inserción TTGTC, tipo 2 (K385fs*47) (Figura 1). Además se detectaron 5 delecciones diferentes (9%), 5 *indels* complejas (9%), 1 inserción (2%) y 1 sustitución de aminoácido (2%), todas diferentes y únicas (Figura 2). En todos los casos de corrimiento del marco de lectura se confirmó la existencia del extremo C-terminal característico de *CALR* mutada (Figura 3). Tres de estas mutaciones no fueron encontradas en la bibliografía.

En el gen *MPL* se detectaron 3 mutaciones (6%), siendo las previamente reportadas W515L (2) y W515K (1) (Figura 4). No se observó ninguna mutación en *ex12JAK2*.

En cuanto a los diagnósticos, el 49% de las TE y el 40% de las MF presentaron mutaciones en *CALR*. Una TE y una MF presentaron mutación en *MPL* (2% y 10%, respectivamente) mientras que ninguna PV demostró las mutaciones estudiadas. En el grupo de pacientes con posible NMP se observaron 27 *CALR* mutados y 1 *MPL* mutado.

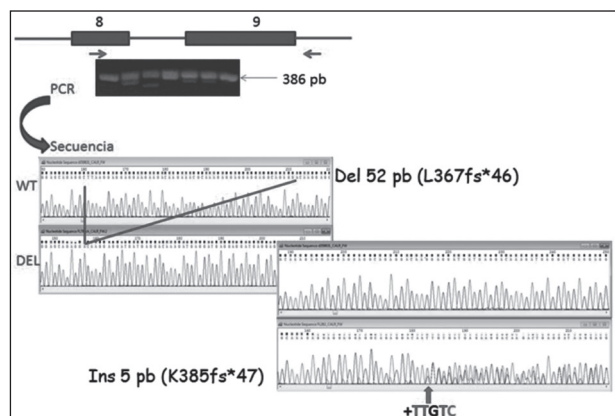


Figura 1. Esquema del análisis de mutaciones en el exón 9 del gen *CALR*. Se realiza una PCR con los cebadores indicados y el producto de amplificación de 386 pb se secuencian. Se muestran secuencias parciales de las 2 mutaciones más frecuentes en *CALR*, alineadas con la secuencia normal e indicando con flechas rojas la delección de 52 pb y la inserción de 5 pb.

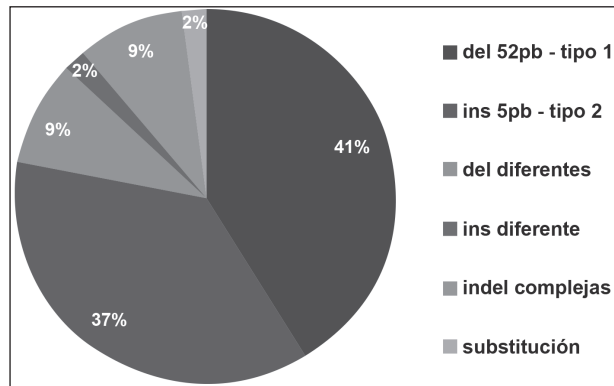


Figura 2. Perfil mutacional de CALR con sus frecuencias.

WT	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEEDKKRKEEEEAEDEKEDDEDKDEDEEDEDKEEEDVPGQAKDEL
L367fs*46 (Tipo 1)	AAE ... T RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
Tipo 1-like:	
E364fs*49	AAE... RQRT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
R366fs*53	AAE ... KRRRRQRT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
L367fs*52	AAE...RRRRQRT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
K368fs*51	AAE...RRRQRT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
K385fs*47 (Tipo 2)	AAE...NC RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
Tipo 2-like:	
A382fs*52	AAE... DKKRKEE RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
E383fs*46	AAE ... C RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
E386fs*46	AAE ... C RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
Otros:	
E371fs*49	AAE ... RERT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
D373fs*48	AAE...RT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
K374fs*56	AAE...RKR...RQRT RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
E378fs*46	AAE ... KKRKC RRRMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA

Figura 3. Extremo carboxi-terminal de la proteína calreticulina. Se muestra la secuencia de aminoácidos normal (WT), con la señalización KDEL. Los 3 recuadros muestran las secuencias de aminoácidos observadas en las proteínas alteradas, siguiendo la clasificación reportada como similar-tipo 1, similar-tipo 2 y otros. Todas las mutantes con corrimiento del marco de lectura presentan el mismo extremo terminal.

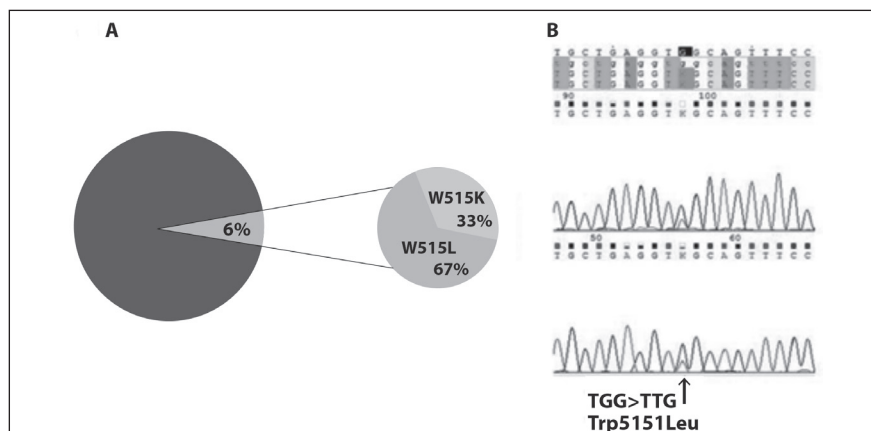


Figura 4. Distribución de mutaciones en MPL. Secuencia parcial de una mutante W515L, mostrando el cambio G>T.

Discusión

En este estudio se analizó la presencia de mutaciones en los genes *CALR*, *MPL* y *JAK2* (exón 12) en un grupo de pacientes con NMP, o posible NMP, todos previamente caracterizados como Ph negativos y *JAK2* V617F negativos. Todas las mutaciones encontradas fueron mutuamente excluyentes, ningún paciente presentó más de una.

Se observaron 14 mutaciones diferentes en *CALR* (Figuras 1, 2 y 3), tres de las cuales no se reportaron previamente en la bibliografía (D373N, A382fs*52 y K374fs*56). En todos los casos de corrimiento del marco de lectura (N=55), se verificó que el extremo carboxi-terminal sea el característico de *CALR* mutada (Figura 3). Como se esperaba^(7,8,13,17,18), las mutaciones más frecuentes fueron la delección de 52 pb tipo 1 (41%) y la inserción TTGTC tipo 2 (37%), constituyendo entre ambas el 78% de las mutaciones. Siguiendo la clasificación de Pietra y col.⁽¹⁷⁾, 4 de las mutaciones variantes en *CALR* corresponden a “símil tipo 1” (en total 27/56, 48%) y 3 a “símil tipo 2” (en total 24/56, 43%), siendo diferentes sólo 4 del total.

La frecuencia de mutación de *CALR* en los pacientes con diagnóstico (49% en TE y 40% en MF) es similar a la previamente reportada, incluso en nuestro país⁽²⁴⁾. Es interesante que todas las alteraciones únicas se observaron en pacientes con TE, mientras que en MF sólo se observaron mutaciones de tipo 1 o 2. Esta observación también fue reportada en otro grupo de pacientes argentinos⁽²⁴⁾. Si bien el número de pacientes con MF es muy bajo, pareciera haber una sub-representación de mutaciones de tipo 2 (1 de 4), de forma similar a lo reportado por Tefferi y col.⁽¹⁸⁾ y en contraste con lo reportado por Ojeda y col.⁽²⁴⁾. Es necesario analizar más casos para confirmar esta observación. *CALR* mutada resultó más frecuente en hombres (61%) que en mujeres (37,5%) considerando sólo los pacientes con diagnóstico de TE y MF. En este grupo de pacientes sólo se observaron 3 mutaciones en *MPL* (Figura 5), todas en el triptófano 515. En los pacientes diagnosticados la frecuencia resultó similar a lo previamente reportado, 10% en MF y 2% en TE.

En el grupo de pacientes con posible NMP la frecuencia de mutaciones en *CALR* y *MPL* es muy baja, probablemente por incluir pacientes en los cuales no se confirmó un diagnóstico de TE o MF. Sin embargo, es destacable que algunos de ellos pre-

sentaron mutaciones en *CALR* o *MPL*, confirmando así la clonalidad de la enfermedad y colaborando al diagnóstico.

No se observaron mutaciones en el exón 12 de *JAK2*. Estas mutaciones son muy infrecuentes y sólo de reportaron en 1-3% de las PV *JAK2*-V617F negativas en trabajos previos^(10,20,21). En el presente estudio, el número de pacientes con diagnóstico de PV y negativos para *JAK2*-V617F es muy bajo (N=6) para establecer conclusiones.

En conclusión, este es un trabajo descriptivo del perfil de mutaciones observadas en *CALR*, *MPL* y *ex12JAK2* en pacientes con posible NMP. Más de un 20% de los pacientes presentan mutaciones en *CALR* diferentes al tipo 1 o 2, con lo cual es importante disponer de una metodología que permita detectarlas e informarlas.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

1. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms. A Contemporary Review. *JAMA Oncology*. 2015; 1: 97-105.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R y col. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2391-2405.
3. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, De Raeve H. Changing Concepts of Diagnostic Criteria of Myeloproliferative Disorders and the Molecular Etiology and Classification of Myeloproliferative Neoplasms: From Dameshek 1950 to Vainchenker 2005 and Beyond. *Acta Haematol*. 2015;133:36-51.
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP y col. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144-1148.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ y col. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365: 1054-1061.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS y col. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1779-1790.

7. Klampfl T, Gisslinger H, Ashot S y col. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2379-2390.
8. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ y col. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2391-2405.
9. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T y col. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006; 108: 3472-3476.
10. Scott LM, Tong W, Levine RL y col. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007; 356: 459-468.
11. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014; 123: 3714-3719.
12. Tefferi A, Pardanani A. CALR mutations and a new diagnostic algorithm for MPN. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 11: 125-126.
13. Tefferi A, Lasho TL, Finke C y col. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia.* 2014; 28: 1568-1570.
14. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL y col. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia.* 2014; 28: 2300-2303.
15. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddi M y col. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am J Hematol.* 2018; 93: 348-355.
16. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E y col. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov.* 2016; 6: 368-381.
17. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV y col. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016; 30: 431-438.
18. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A y col. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood.* 2014; 124: 2465-2466.
19. Boyd EM, Bench AJ, Godoy-Fernández A y col. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocytaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2010; 149: 250-257.
20. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am J Hematol.* 2011; 86: 668-676.
21. Passamonti F, Elena C, Schnittger S y col. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood.* 2011; 117: 2813-2816.
22. Pratti AF. Estudios moleculares en neoplasias mieloproliferativas cromosoma Philadelphia negativo. Tesis doctorado en ciencias biológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. 2013.
23. Butcher CM, Hahn U, To LB y col. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera patients. *Leukemia.* 2008;22:870-873.
24. Ojeda MJ, Bragós IM, Calvo KL y col. CALR, JAK2 and MPL mutation status in Argentinean patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2018; 23: 208-211.