

Kvantifikácia JAK2 V617F/G1849T alely

Klinický význam

Janus tyrozínkináza 2 (JAK2) je dôležitá kľúčová molekula vo vnútrobunkovom signalingu mnohých cytokínov, vrátane erythropoetínu. Frekvencovaná mutácia V617F v géne JAK2 pacientov s myeloproliferatívnym ochorením (MPN) napomáha pochopeniu vzniku ochorenia, jeho klasifikácii a tiež pri jeho diagnóze. JAK2 V617F mutácia je detekovaná > 95 % u pacientov s polycytemiou vera (PV), v 50 – 60 % u pacientov s esenciálnou trombocytémiou a v 50 % u pacientov s primárnou myelofibrózou (PMF). Táto mutácia bola detekovaná v niektorých zriedkavých prípadoch chronickej myelomonocytovej leukémie, myelodisplastického syndrómu, systemickej mastocytózy, ale nebola detekovaná u pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou (CML).

Kvantifikácia JAK2 V617F/G1849T alely (alelická nálož) sa odporúča v prípade nových anti-JAK2 cielených terapeutík v klinickej praxi. Pri bežnej diagnostike BCR-ABL negatívnych MPN stačí kvalitatívne stanovenie mutácie V617F alelickou diskrimináciou a nie je nutná absolútna kvantifikácia.

Indikačné obmedzenia

Hematológia

Predanalytické informácie

Vyšetrenie sa realizuje zo vzorky 5 ml periférnej krvi (resp. kostnej drene, avšak nie je to nutné) odobratej do nezárazavého roztoku (EDTA).

Interferencia

Nie sú známe interferencie.

Neprítomnosť JAK2 V617F/G1849T mutácie v exóne 14 stanovené týmto kitom nevylučuje možnosť ďalších JAK2 mutácií v géne. Môžu sa prejavovať falošne negatívne výsledky v prípade ďalších mutácií, ktoré sú lokalizované v oblastiach (88504-88622).

Metóda

Z periférnej krvi (resp. kostnej drene) pacienta sa vyizoluje DNA a zmeria sa jej koncentrácia. Vzorka sa nariedi na 5 ng/μl v „DNase, RNase free vode“ a uloží pri 4 °C, ak sa vyšetrenie realizuje do 5 dní. V opačnom prípade sa vzorky uchovávajú pri -20 °C. Čistota získanej DNA je charakterizovaná pomerom OD₂₆₀/OD₂₈₀ a mala by byť v rozsahu 1,7 – 1,9. Na detekciu alelickej náložky JAK2 V617F sa používa kit od firmy Qiagen: Ipsogen JAK2 MutaQuant Kit (cat.no. 673523) a 7300 Real-Time PCR System. Na kvantifikáciu JAK2 V617F DNA vzoriek pacientov sa vyberá v softvéri prístroja metóda absolútnej kvantifikácie. Podstatou je použitie SNP špecifických primerov, ktoré umožňujú selektívnu amplifikáciu mutovanej a wild alely. Keďže sú primery značené rozdielnymi

fluorescenčnými značkami, môžu byť na základe merania intenzity fluorescence amplifikácie oboch alel detekované prístrojom Real-Time PCR paralelne. V kite sú vložené štandardy s mutovanou a wild alelou v rôznych koncentráciách, čím vzniká možnosť kvantifikácie neznámej vzorky podľa kalibračných kriviek a následných výpočtov percentuálneho zastúpenia jednotlivých alel podľa vzorca:

$JAK2\ V617F\ \% = [CNV617F : (CNV617F + CNWT)] \times 100$ (CNV617F = počet kópií mutovanej alely, CNWT = počet kópií wild alely).

Alelická nálož neurčuje, či ide o homozygóta, alebo heterozygóta nesúceho JAK2 V617F mutáciu v heterogénnej populácii buniek, ale o ich celkovú kvantitu mutovanej alely vo vzorke.

Referenčné rozpätie

Detekcia positivity je v rozsahu > 0,1 % – 100 %.

Dostupnosť vyšetrenia

Centrálne laboratórium Bratislava
Centrálne laboratórium Košice

Vypracoval

Medirex, a. s.: RNDr. Eva Hanušovská, CSc., laboratórny diagnostik

Kontakt

+421 2 208 29 272, eva.hanusovska@medirex.sk

Bratislava 01. 12. 2014

Literatúra

JAMES, C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. In *Nature*, 2005, 434, 1144

LEVINE, R.L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. In *Cancer Cell*, 2005, 7, 387.

KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. In *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, 1779.

BAXTER, E.J et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. In *Lancet*, 2005, 36, 1054

Van der Velden, V.H. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. In *Leukemia*, 2006, 20, 1925.

National Center for Biotechnology Information (NCBI): NT_008413, dostupné na internete:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>