



Un semplice sistema di *score* basato sull'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria e sulla percentuale di precursori granulocitari circolanti predice la mutazione JAK2 V617F nei pazienti con mielofibrosi primaria

Luca Roma¹, Erica Travaglini¹, Laura Villani², Gaetano Bergamaschi²,
Rosangela Invernizzi¹, Giovanni Barosi³

¹Clinica Medica III, ²Clinica Medica I e ³Laboratorio di Epidemiologia Clinica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Un semplice sistema di score basato sull'attività della fosfatasi alcalina leucocitaria e sulla percentuale di precursori granulocitari circolanti predice la mutazione JAK2 V617F nei pazienti con mielofibrosi primaria

Circa il 50% dei casi di mielofibrosi primaria (MFP) presenta una mutazione somatica acquisita localizzata nell'esone 14 del gene JAK2 (V617F JAK2): questa mutazione porta ad un'attivazione costitutiva dell'attività chinasi della proteina JAK2. Recenti studi su pazienti affetti da MFP hanno riportato una corrispondenza tra quantità di carico allelico JAK2-mutato ed aumentati livelli di emoglobina e di conta leucocitaria neutrofila oltre che un'associazione indipendente tra l'alterazione molecolare ed alcune variabili prognostiche quali: rischio aumentato di morte per ogni causa e di trasformazione leucemica, sviluppo di splenomegalia marcata e maggiore ricorso a splenectomia o chemioterapia. Anche i livelli di attivazione dei neutrofili sono risultati essere correlati con la presenza della mutazione V617F JAK2.

Dal momento che l'aumentata espressione della fosfatasi alcalina leucocitaria (FAL) è considerata un *marker* di attivazione dei granulociti e diversi livelli di espressione sono descritti nella MFP, ci siamo proposti di valutare, in questo studio, l'attività della FAL con metodo citochimico in 247 pazienti con MFP alla diagnosi e di ricercare possibili correlazioni tra *score* dell FAL, stato mutazionale JAK2 V617F determinato attraverso reazione polimerasica a catena (PCR) allele-specifica, ed alcune variabili clinico-laboratoristiche.

I nostri risultati, oltre a confermare l'influenza indipendente ed il valore predittivo dello *score* della FAL nei confronti dello stato mutazionale del gene JAK2 come già descritto da altri Autori, hanno permesso di identificare nella percentuale di precursori mieloidi circolanti un nuovo parametro potenzialmente predittivo della mutazione V617F di tale gene. Dopo aver individuato attraverso l'analisi delle curve ROC valori soglia utili a discriminare i pazienti mutati da quelli *wild-type*, abbiamo quindi creato un semplice sistema di *score* per predire la presenza/assenza della mutazione JAK2 V617F. Applicando tale sistema alla casistica, in maniera retrospettiva, abbiamo potuto classificare correttamente l'81% dei casi, con una elevata sensibilità e specificità. Inoltre applicando lo stesso criterio in una casistica prospettica di 129 pazienti con MFP, abbiamo correttamente identificato il 91% dei pazienti.

A simple scoring system based on leukocyte alkaline phosphatase activity and peripheral granulocyte precursor percentage predicts JAK2 V617F mutation in patients with primary myelofibrosis

A recurrent mutation in the JAK2 gene consisting of a valine-to-phenylalanine change at position 617 (JAK2 V617F) was reported in half and more of the patients with primary myelofibrosis (PMF). This mutation increases JAK2 kinase activity affecting phenotype and clinical outcome. Recently, some of us observed that in PMF JAK2 V617F mutation is significantly associated with higher white blood cell count and granulocyte activation and it independently predicts the evolution toward large splenomegaly, need of splenectomy and a leukemic transformation.

Since increased leukocyte alkaline phosphatase (LAP) expression is considered a granulocyte activation marker and variable LAP levels are found in PMF, we evaluated LAP activity by cytochemistry in peripheral blood smears from 247 PMF patients at diagnosis searching for possible correlation among LAP score, JAK2 V617F mutation status, as assessed by allele specific PCR, and clinical-pathological features. Our results, besides confirming the influence of the independent predictive value of LAP scores against the mutational status of JAK2 gene as described by other authors, have identified the percentage of circulating myeloid precursors as a new parameter potentially predictive for V617F mutation of this gene.

A ROC curve analysis allowed us to identify a LAP score of 100 (AUC=0.81, 95% CI 0.76-0.86) and a peripheral granulocyte precursor percentage of 10 (AUC=0.80, 95% CI 0.64-0.79) as optimal cut-off to discriminate mutated patients with good sensitivity and specificity (range 84-98%). On the basis of these variables, we defined a simple scoring system to predict JAK2 V617F mutation. Applying this system to the series, retrospectively, we were able to correctly classify 81% of cases with a high sensitivity and specificity. Also testing the same criteria in a prospective series of 129 patients with MFP, we correctly identified 91% of patients.

Introduzione

La mielofibrosi primaria (MFP) è una neoplasia mieloproliferativa cronica *Phildelphia* (Ph) negativa ad espressione fenotipica variabile, derivante da un'alterazione clonale di una cellula staminale multipotente. Viene riportata un'incidenza compresa fra 0.5 ed 1:100000 individui per anno, con un'età media alla diagnosi di circa 60 anni; raro è il riscontro durante l'infanzia [1]. La sopravvivenza media dei pazienti con MFP è compresa tra 3.5 e 5 anni; vi è, tuttavia, un'ampia variabilità, dal momento che alcuni pazienti muoiono entro 1-2 anni dalla diagnosi mentre altri sopravvivono per oltre una decade [2-3]. I sistemi di *score* prognostici hanno come obiettivo quello di identificare alla diagnosi diversi sottogruppi di pazienti con prognosi diversa.

Circa il 50% dei casi di MFP presenta una mutazione somatica acquisita localizzata nell'esone 14 del gene JAK2 (V617F JAK2) [4-7], ed un ulteriore 8-10% risulta portatore della mutazione W515L/K/A nel codone 15 del gene Mpl [8]: tali mutazioni sono state incluse tra i criteri diagnostici maggiori secondo la classificazione WHO delle neoplasie mieloproliferative del 2008, ma non sono specifiche per questa neoplasia, ritrovandosi in percentuali diverse in PV, TE ed altri disordini più rari [9]. La mutazione del gene JAK2 causa la sostituzione di una valina con una fenilalanina in posizione 617 della sequenza aminoacidica del dominio inibitore JH2, portando ad un'attivazione costitutiva dell'attività chinasi della proteina JAK2. Recenti studi su pazienti affetti da MFP hanno riportato una corrispondenza tra quantità di carico allelico JAK2-mutato ed aumentati livelli di emoglobina e di conta leucocitaria neutrofila oltre che un'associazione indipendente tra l'alterazione molecolare ed alcune variabili prognostiche quali: rischio aumentato di morte per ogni causa e di trasformazione leucemica, sviluppo di splenomegalia marcata e maggiore ricorso a splenectomia o chemioterapia [10-11]. Anche i livelli di attivazione dei neutrofili sono risultati essere correlati con la presenza della mutazione V617F JAK2 [12-13].

La fosfatasi alcalina leucocitaria (FAL) è un enzima contenuto nei granuli terziari dei neutrofili: l'incremento della sua espressione è considerato un *marker* di attivazione di questa popolazione cellu-

lare, impiegato, nella pratica clinica ematologica, nella diagnosi differenziale delle leucocitosi. Nei disordini mieloproliferativi Ph-negativi, i neutrofili circolanti risultano attivati sulla base della maggior espressione della FAL, della mieloperossidasi, e del contenuto e rilascio di elastasi; tale condizione simula quella osservata in soggetti sani dopo somministrazione di G-CSF [14]. Sulla base di queste evidenze, ci siamo proposti di valutare con metodo citochimico l'attività della FAL in pazienti con MFP alla diagnosi, di ricercare eventuali correlazioni tra livelli di attività della FAL, stato mutazionale del gene JAK2 e aspetti clinico-laboratoristici, e di evidenziare l'eventuale valore predittivo dello *score* della FAL nei confronti della mutazione JAK2 V617F.

Materiali e Metodi

Nella nostra ricerca abbiamo incluso 247 casi di MFP, giunti al laboratorio di Citomorfologia presso la Clinica Medica III della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia tra gli anni 2000-2009. Le caratteristiche demografiche ed i parametri clinico-laboratoristici della casistica del nostro studio, valutati al momento della diagnosi, sono riassunti nella tabella 1.

La determinazione dello stato mutazionale del gene JAK2 è stata effettuata mediante reazione polimerasica a catena (PCR) allele-specifica su DNA purificato da granulociti circolanti e successiva digestione enzimatica con l'enzima di restrizione BsaXI del prodotto di amplificazione [7]. Nei pazienti non mutati la digestione enzimatica produceva tre frammenti di 241, 189 e 30 bp (quest'ultimo non visibile al transilluminatore UV). Nei casi portatori della mutazione V617F del gene JAK2 allo stato omozigote, invece, si osservava un'unica banda corrispondente al prodotto di amplificazione indigerito (circa 460 bp), mentre gli eterozigoti mostravano un pattern combinato con bande corrispondenti a frammenti di 460, 241 e 189 bp.

L'attività della FAL è stata determinata mediante reazione citochimica su strisci di sangue periferico secondo la metodica di Hayhoe e Quaglino (1958), e valutazione semiquantitativa dell'attività enzimatica con il metodo dello *score*: su ciascuno striscio venivano esaminati 100 neutrofili consecutivi, attribuendo a ciascuno un punteggio da 0 a 4 sulla base del pattern di reattività; lo *score* totale risultava dalla somma degli *score* parziali. Il *range* di normalità calcolato presso il nostro laboratorio era compreso tra 40 e 140. Per l'analisi statistica descrittiva sono stati calcolati la mediana, i quartili ed il *range* per le variabili continue, data la loro ampia dispersione, e le frequenze relative ed assolute per le variabili categoriche ed ordinali. La significatività delle differenze è stata calcolata tramite test statistici non parametrici di analisi della varianza basati sui ranghi. Per il calcolo sono stati utilizzati i seguenti software: STATISTICA 6.0, MedCalc® 9.3 e MICROSOFT EXCEL® 2000.

Risultati

La mutazione è stata osservata nel 65% dei casi, un dato lievemente superiore a quanto espresso dalla letteratura, in cui la frequenza di tale mutazione nella MFP è compresa tra il 35 e il 50%. Rispetto ai casi non mutati, i pazienti portatori della mutazione mostravano livelli più elevati di emoglobina e di piastrine, ma non di globuli bianchi. Inoltre la percentuale di precursori mieloidi circolanti, così come di quelli eritroidi e la quota di cellule CD34 positive, risultavano significativamente ridotte nei casi JAK2 mutati (Tabella 2). L'associazione tra mutazione del gene JAK2 e percentuale inferiore di precursori granulocitari persisteva dopo analisi multivariata con le altre variabili considerate.

Per quanto riguarda l'attività della FAL, i pazienti mutati presentavano *score* significativamente più elevati, senza differenza tra casi omozigoti ed eterozigoti; in modo interessante, inoltre, abbiamo notato che tutti i pazienti con *score* della FAL superiore alla norma presentavano la mutazione JAK2 V617F ($p < 0.0001$; Figure 1 e 2).

Non sono emerse correlazioni significative tra i parametri clinico-laboratoristici considerati alla diagnosi (conta leucocitaria e piastrinica, Hb, splenomegalia e *score* di Lille) e i livelli di attività della FAL, a parte una correlazione inversa significativa tra *score* della FAL e percentuale di precursori mieloidi circolanti.

L'analisi delle curve ROC (Figura 3) ha consentito di identificare uno *score* della FAL di 100 e una percentuale di precursori mieloidi circolanti di 10 come *cut-off* ottimale per discriminare i pazienti mutati con buona sensibilità e specificità. Sulla base di queste variabili abbiamo definito un semplice sistema di *score* in grado di predire la mutazione: i pazienti con *score* FAL >100 e percentuale di precursori mieloidi <10 ricevevano il punteggio più alto, ovvero 3 (Tabella 3). Abbiamo applicato retrospettivamente questo sistema di *score* alla nostra casistica e, scegliendo come *cut-off* un punteggio di 2, identificavamo correttamente l'81% dei pazienti con buona sensibilità e specificità (73% e 98% rispettivamente). Inoltre tutti i casi con *score* 3 erano mutati mentre il 94% di quelli con *score* 0 non era mutato (Tabella 4). Utilizzando lo stesso sistema di *score* in una casistica prospettica di 129 pazienti con MFP abbiamo ottenuto risultati analoghi ai precedenti (Tabella 5).

Discussione

La determinazione dello stato mutazionale del gene JAK2, ottenuta attraverso procedure piuttosto indaginose e costose, rappresenta uno dei marcatori biologici più innovativi per l'inquadramento diagnostico della MFP e, in generale, di tutti i disordini mieloproliferativi Ph-negativi. L'apporto sul fronte diagnostico è stato seguito negli anni da studi su eventuali correlazioni tra la presenza di un genotipo JAK2 V617F-mutato ed alcuni parametri clinico-laboratoristici utili nella stratificazione prognostica dei pazienti.

Nel nostro studio ci siamo proposti di studiare in 247 pazienti affetti da MFP i livelli dell'attività della FAL con metodica citochimica, così come lo stato mutazionale del gene JAK2, e di ricercare possibili correlazioni tra questi parametri e le principali caratteristiche clinico-laboratoristiche. Inoltre abbiamo valutato la correlazione tra grado di attivazione dei neutrofili e stato mutazionale del gene JAK2 con lo scopo di evidenziare un eventuale valore predittivo del semplice saggio citochimico nei confronti della mutazione V617F.

I nostri risultati, oltre a confermare l'influenza indipendente ed il valore predittivo dello *score* della FAL nei confronti dello stato mutazionale del gene JAK2 come già descritto da altri Autori [12-13], hanno permesso di identificare nella percentuale di precursori mieloidi circolanti un nuovo parametro potenzialmente predittivo della mutazione V617F di tale gene. Dopo aver individuato attraverso l'analisi delle curve ROC valori soglia utili a discriminare i pazienti mutati, sia allo stato eterozigote che omozigote, da quelli *wild-type*, abbiamo quindi creato un semplice sistema di *score* per predire la presenza/assenza della mutazione JAK2 V617F. Applicando tale sistema alla casistica, in maniera retrospettiva, abbiamo potuto classificare correttamente l'81% dei casi, con una elevata sensibilità e specificità. Inoltre applicando lo stesso criterio in una casistica prospettica di 129 pazienti con MFP, abbiamo correttamente identificato il 91% dei pazienti. In conclusione i nostri risultati, oltre a dimostrare una forte associazione tra l'attività della FAL e lo stato mutazionale del gene JAK2, ci hanno permesso di elaborare un sistema di *score* semplice, poco costoso e riproducibile in grado di predire con elevata specificità e accettabile sensibilità la presenza della mutazione JAK2 V617F nei pazienti con MFP, con le implicazioni diagnostiche prognostiche e terapeutiche che derivano dalla presenza di tale alterazione molecolare.

Tabelle e Figure

Tabella 1. Caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti con MFP espresse in termini di valori medi e range interquartile (RIQ) o di frequenza relativa ed assoluta.

Parametri demografici e clinico-laboratoristici della casistica	Mediana (RIQ) o frequenza
<i>Pazienti</i>	247
<i>Sesso M (%)</i>	149 (60%)
<i>Età (anni)</i>	59 (47-67)
<i>Organomegalia (% dei casi)</i>	224 (91%)
<i>GB ($\times 10^9/L$)</i>	8.9 (5.8-14)
<i>Hb (g/dL)</i>	10.7 (9.2-13.3)
<i>PLT ($\times 10^9/L$)</i>	254 (111-472)
<i>% precursori mieloidi circolanti*</i>	6 (1-10)
<i>% eritroblasti circolanti</i>	1 (0-3)
<i>Screzio leucoeritroblastico (% dei casi)</i>	192 (78%)
<i>Dacriocitosi (% dei casi)</i>	160 (65%)
<i>CD34+ circolanti ($\times 10^6/L$)</i>	36.5 (8-115.2)
<i>Stadio della malattia (prefibrotico/fibrotico/accelerato)</i>	30/210/7
<i>Gruppo prognostico secondo Visani (grado 0/1/2)</i>	100/37/74
<i>Gruppo prognostico secondo Dupriez (grado 0/1/2)</i>	109/65/21

Tabella 2. Differenze circa i parametri clinico-laboratoristici ed i reperti morfologici considerati tra i pazienti portatori della mutazione JAK2 V617F e i pazienti *wild-type*.

Parametri demografici e clinico-laboratoristici della casistica	Mutazione JAK2 V617F		P
	Assente	Presente	
<i>Pazienti</i>	86 (35%)	161 (65%)	
<i>Età</i>	56 (44-62)	58 (47-66)	0.14
<i>Sesso maschile</i>	55 (64%)	94 (58%)	0.47
<i>Hb (g/dL)</i>	10.2 (9.2-12.6)	11.5 (9.6-13.6)	0.0118
<i>GB ($\times 10^9/L$)</i>	9.3 (5.6-15)	8.7 (6-12.9)	0.96
<i>PLT ($\times 10^9/L$)</i>	236 (81-321)	309 (126-527)	0.0059
<i>CD34+ circolanti ($\times 10^3/\mu L$)</i>	49 (17-240)	28 (7-91)	0.0175
<i>Percursori mieloidi circolanti (%)</i>	12 (10-18)	4 (1-8)	0.0000
<i>Eritroblasti (%)</i>	2 (0-4)	1 (0-2)	0.0057
<i>Dacriocitosi (%)</i>	59 (66%)	103 (64%)	0.82
<i>Screzio leuco-eritroblastico</i>	74 (86%)	118 (73%)	0.0328
<i>Organomegalia (%)</i>	86 (100%)	138 (86%)	0.0006
<i>Stadio della malattia (prefibrotico/fibrotico/accelerato)</i>	2/78/6	28/132/1	0.0001
<i>Gruppo prognostico secondo Visani (0/1/2)</i>	23/10/44	77/27/28	0.0001

Tabella 3. Sistema di *score* prognostico basato sullo *score* della FAL e sulla percentuale di precursori mieloidi circolanti. Lo *score* finale è dato dalla somma dei due punteggi parziali.

PUNTEGGIO DA ASSEGNARE		
0	1	2
Score della FAL <100	--	Score della FAL ≥100
Precursori granulocitari circolanti ≥10%	Precursori granulocitari circolanti <10%	--

Tabella 4. Applicazione del sistema di *score* prognostico basato sullo *score* della FAL e sulla percentuale di precursori mieloidi circolanti alla nostra casistica (risultati espressi in termini di frequenza assoluta e relativa).

SCORE	JAK2 V617F MUTATI	JAK2 V617F NON MUTATI
0	5 (3%)	73 (85%)
1	39 (24%)	11 (13%)
2	21 (13%)	2 (2%)
3	96 (60%)	0

Tabella 5. Identificazione prospettica di casi JAK2 mutati attraverso lo *score* prognostico.

SCORE	JAK2 V617F MUTATI	JAK2 V617F NON MUTATI
0	0 (0%)	12 (32%)
1	8 (9%)	21 (57%)
2	20 (22%)	4 (11%)
3	64 (69%)	0 (0%)

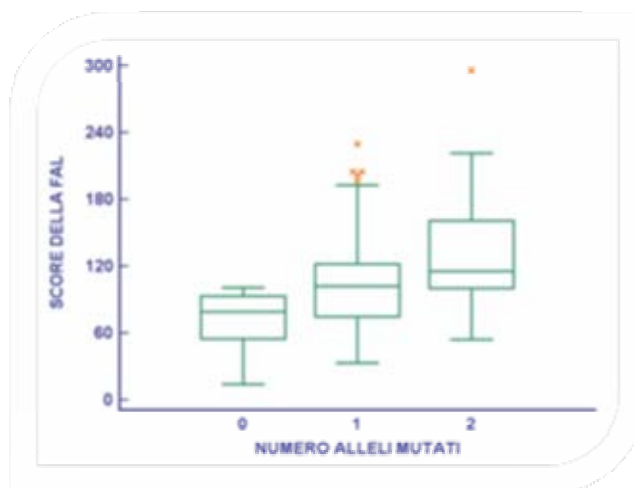


Figura 1. Rappresentazione grafica degli *score* della FAL in relazione allo stato mutazionale del gene JAK2.

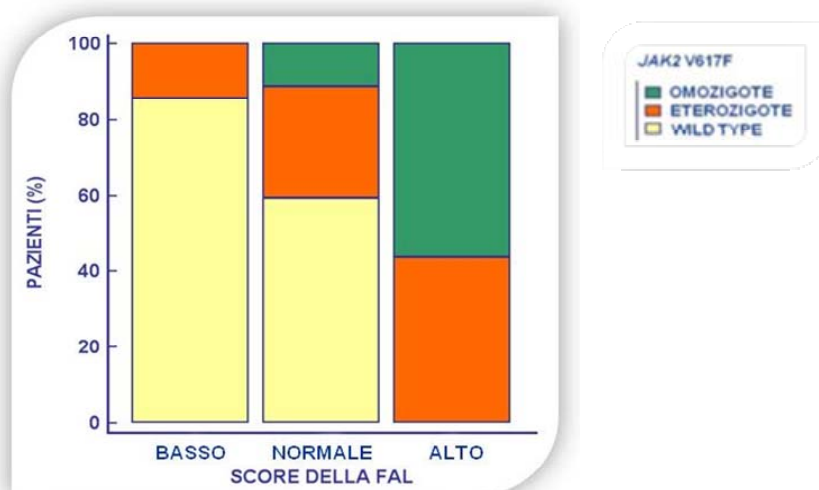


Figura 2. Rappresentazione grafica della suddivisione dei pazienti in base allo score della FAL ed allo stato mutazionale del gene JAK2 (bianco=genotipo *wild type*, arancione=mutazione V617F allo stato eterozigote, verde=mutazione V617F allo stato omozigote).

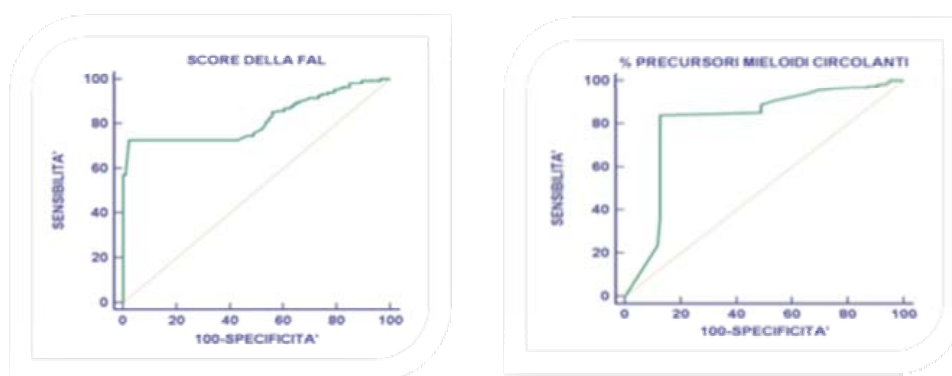


Figura 3. Analisi delle curve ROC per lo score della FAL e la percentuale di precursori mieloidi circolanti.

Bibliografia

1. McNally RJ, Rowland D, Roman E, et al. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 1997;15:173-189.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Pathology & Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. *IARC Press*, Lyon, 2001.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. *IARC Press*, Lyon, 2008.
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-1148.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):779-790.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-397.
7. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;366(9480):122.

8. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472-3476.
9. Thiele J, Kvasnicka HM. The 2008 WHO Diagnostic Criteria for Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis. *Curr Hematol Malign Rep* 2009;4:33-40.
10. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110:4030-4036.
11. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, et al. Low JAK2V617F allele burden in PMF, compared to either a higher allele burden or unmutated status, predicts inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008;22:756-761.
12. Basquiera AL, Fassetta F, Soria N, et al. Accuracy of leucocyte alkaline phosphatase score to predict JAK2 V617F mutation. *Haematologica* 2007;92:5:704-705.
13. Rambaldi A, Guerini V, Carobbio A, et al. Leucocyte alkaline phosphatase expression predicts the JAK2 V617F mutation status in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 2007;92(suppl.1):414-415.
14. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutational status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;107:3676-3682.