

DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-30-35



Случай выявления мутации в гене *CALR* у пациента с диагнозом истинной полицитемии и *JAK2*-негативным статусом

Т.Н. Субботина^{1,2}, И.Е. Маслокова¹, Д.В. Курочкин¹, М.А. Михалёв³, М.Г. Осадчая⁴, В.А. Хоржевский⁵, Т.А. Гаркуша⁵, Е.А. Дунаева⁶, К.О. Миронов⁶

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; Россия, 660041 Красноярск, проспект Свободный, 79;

²ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 660037 Красноярск, ул. Коломенская, 26;

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница»; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3А;

⁴КГБУЗ «Красноярская межрайонная поликлиника № 1»; Россия, 660003 Красноярск, ул. Академика Павлова, 4, стр. 7;

⁵КГБУЗ «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро»; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Д;

⁶ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиревская, 3А

Контакты: Татьяна Николаевна Субботина stn.25@mail.ru

Мутации *JAK2* могут быть связаны с любой фенотипической формой хронических миелопролиферативных неоплазий, тогда как мутации *MPL* и *CALR* возникают, как правило, в случаях эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза и не наблюдаются при истинной полицитемии. Представлен клинический случай наличия соматической мутации *CALR* (с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46) у пациента в возрасте 36 лет с *JAK2*-отрицательным статусом с диагнозом истинной полицитемии. В январе 2018 г. впервые зафиксированы изменения в гемограмме пациента, в июне 2018 г. на основании диагностического исследования трепанобиоптата костного мозга был поставлен диагноз истинной полицитемии. При молекулярно-генетическом исследовании ДНК пациента не выявлено мутаций в экзонах 12 и 14 гена *JAK2* и в гене *MPL*. Мутация в гене *CALR* обнаружена при скрининге методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, затем подтверждена и идентифицирована методом Сэнгера как с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46. Уровень аллельной нагрузки, определенный методом пиросеквенирования, в образце от июня 2018 г. составил 20 %. Можно предположить, что выявленная мутация *CALR* с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46 имеет значение в развитии фенотипа полицитемии у данного пациента.

Ключевые слова: миелопролиферативная неоплазия, истинная полицитемия, соматическая мутация, *JAK2*-отрицательный статус, *CALR*

Для цитирования: Субботина Т.Н., Маслокова И.Е., Курочкин Д.В. и др. Случай выявления мутации в гене *CALR* у пациента с диагнозом истинной полицитемии и *JAK2*-негативным статусом. Онкогематология 2022;17(2):30–5. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-30-35.

A case of *CALR* mutation in *JAK2*-negative patient with polycythemia

T.N. Subbotina^{1,2}, I.E. Maslyukova¹, D.V. Kurochkin¹, M.A. Mikhalev³, M.G. Osadchaya⁴, V.A. Khorzhevskiy⁵, T.A. Garkusha⁵, E.A. Dunaeva⁶, K.O. Mironov⁶

¹Siberian Federal University; 79 Svobodnyy Prospekt, Krasnoyarsk 660041, Russia;

²Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency; 26 Kolomenskaya St., Krasnoyarsk 660037, Russia;

³Regional Clinical Hospital; 3A Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

⁴Krasnoyarsk Interdistrict Polyclinic No. 1; Build. 7, 4 Akademika Pavlova St., Krasnoyarsk 660003, Russia;

⁵Krasnoyarsk State Regional Bureau of Pathology; 3D Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

⁶Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance; 3A Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia

Contacts: Tatiana Nikolaevna Subbotina stn.25@mail.ru

JAK2 mutations can be associated with any phenotypic form of chronic myeloproliferative neoplasia, while *MPL* and *CALR* mutations occur, as a rule, in cases of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis and they are not observed in polycythemia vera. In this article we describe a clinical case of *CALR* mutation (с.1154_1155insGTGTC;

p.E386fs*46) presence in a *JAK2*-negative polycythemia vera patient at age 36. In January 2018 changes in his hemogram were recorded for the first time. In June 2018, based on a diagnostic study of bone marrow trepanobiopsy, a diagnosis of polycythemia vera was made. Molecular genetic study of the patient's DNA didn't reveal mutations in the *JAK2* (12 and 14 exons) and the *MPL* genes. *CALR* mutation was revealed during the screening by heteroduplex analysis with the electrophoresis in polyacrylamide gel. Then the mutation was identified by Sanger's DNA sequencing as c.1154_1155insGTGTC; p.E386fs*46. The allelic burden level as determined by pyrosequencing was 20 % (June 2018). In conclusion we can suppose that the revealed *CALR* mutation c.1154_1155insGTGTC; p.E386fs*46 plays its role in our patient's polycythemia phenotype.

Key words: myeloproliferative neoplasm, polycythemia vera, somatic mutations, *JAK2*-negative status, *CALR*

For citation: Subbotina T.N., Maslyukova I.E., Kurochkin D.V. et al. A case of *CALR* mutation in *JAK2*-negative patient with polycythemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2022;17(2):30–5. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-30-35.

Введение

В основе патогенеза большинства случаев Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН) лежат соматические мутации в генах *JAK2*, *MPL* и *CALR*, которые наблюдаются приблизительно у 90 % больных [1, 2]. При этом мутации в гене *JAK2* могут быть ассоциированы с любой из фенотипических форм Ph-негативных МПН, тогда как мутации в генах *MPL* и *CALR* обнаруживают, как правило, при эссенциальной тромбоцитемии и миелофиброзе и не выявляют при истинной полицитемии (ИП) [3, 4]. Однако в литературе встречаются единичные сообщения о случаях выявления мутаций в гене *CALR* при отсутствии мутаций в гене *JAK2* на момент постановки диагноза у пациентов с ИП, а также с идиопатическим эритроцитозом [5, 6]. Вследствие этого обсуждается вопрос о проведении анализа мутаций *CALR* таким пациентам.

Ген *CALR* кодирует кальцийсвязывающий белок, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и выполняет различные функции, связанные с шаперонной активностью и гомеостазом кальция. Мутации в гене *CALR* сосредоточены в экзоне 9 и представляют собой разнообразные делеции и вставки, а также их комбинации, которые приводят к сдвигу рамки считывания. Сдвиг рамки считывания изменяет С-конец белка, который становится основным, в то время как в «диком» типе он кислый. На сегодняшний день идентифицировано и классифицировано более 50 различных мутаций в гене *CALR*, ассоциированных с Ph-негативными МПН [7]. Все мутации делят на 2 типа: к 1-му относятся делеции, ко 2-му — вставки. Мутации 1-го типа чаще встречаются при миелофиброзе, тогда как при эссенциальной тромбоцитемии мутации 1-го и 2-го типов встречаются с одинаковой частотой [8]. Как было отмечено ранее, случаи наличия мутаций *CALR* при ИП в литературе имеются, но остаются неясными клиническое значение таких мутаций и их вклад в развитие патогенеза ИП.

Представляем клинический случай из собственной практики. У пациента с диагнозом ИП при *JAK2*-отрицательном мутационном статусе была выявлена мутация в гене *CALR*, в частности c.1154_1155insGTGTC; p.E386fs*46.

Клинический случай

У больного, 36 лет, впервые были зафиксированы изменения в гемограмме в январе 2018 г.: уровень гемоглобина 146 г/л, умеренный тромбоцитоз до 673×10^9 /л, количество эритроцитов $5,18 \times 10^{12}$ /л; количество лейкоцитов в норме ($5,3 \times 10^9$ /л). Спленомегалия не выявлялась. В июне 2018 г. у пациента наблюдались умеренный плеторический синдром (головная боль, периодический кожный зуд), гематологический синдром (уровень гемоглобина до 171 г/л, количество эритроцитов до $5,75 \times 10^{12}$ /л, уровень гематокрита до 49 %, количество лейкоцитов до $8,06 \times 10^9$ /л), а также выявлен значительный тромбоцитоз (1722×10^9 /л). Селезенка не пальпировалась. Уровень сывороточного эритропоэтина не определялся.

Больному была выполнена диагностическая трепанобиопсия костного мозга подвздошной кости с гистохимическими окрасками образца гематоксилином и эозином, по А.А. Максимуму в модификации Ю.А. Криволапова, импрегнацией солями серебра по Гордону—Свитсу (рис. 1). При микроскопическом исследовании клеточность костного мозга составила 80 %, что несколько выше возрастной нормы (60–70 %). Определялись все ростки кроветворения. Эритроидный росток расширен, умеренно гиперплазирован за счет промежуточных форм, нормобластического типа с формированием островков и тенденцией к диссоциации, распространению к костным балкам. Гранулоцитарный росток определялся на всех стадиях созревания, превалировали зрелые формы. Количество мегакариоцитов увеличено; наблюдались атипичные формы с широким спектром размеров — от крупных мегакариоцитов с гиперсегментированным ядром до средних и мелких с гипосегментированным ядром. Встречались единичные «безъядерные» формы, а также паратрабекулярно расположенные мегакариоциты. Формирования рыхлых и плотных кластеров не прослеживалось. При импрегнации солями серебра определялись единичные аргирофильные волокна: MF-0. По результату патоморфологического исследования было высказано мнение, что с учетом клинико-лабораторных данных наблюдаемая картина соответствует миелопролиферативной неоплазии — ИП, MF-0.

Таким образом, с учетом плеторического синдрома, трехросткового панцитоза и заключения патолога

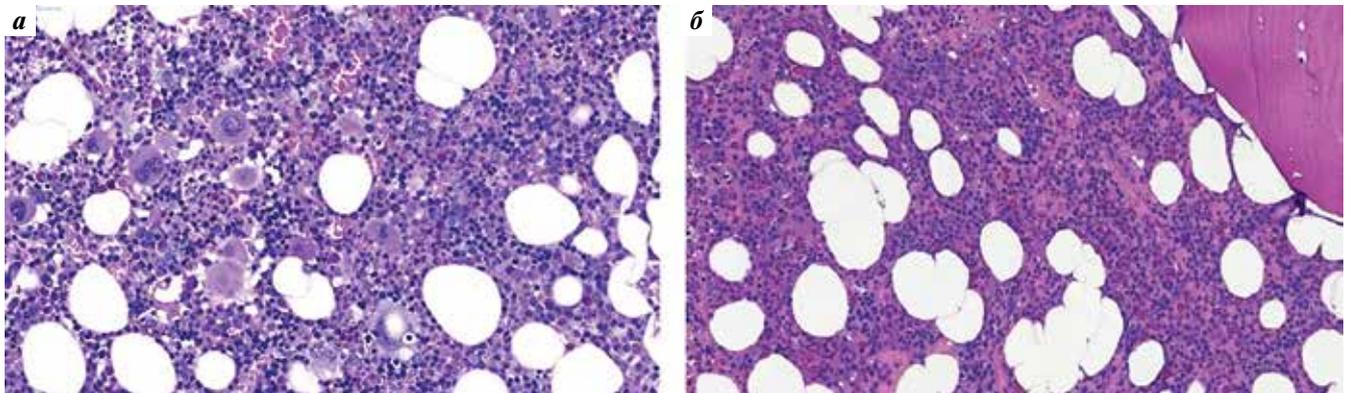


Рис. 1. Микроскопическая картина костного мозга подздошной кости пациента: а – гиперплазия мегакариоцитарного ростка, широкий спектр атипичных мегакариоцитов (окраска азуром 2 и эозином по А.А. Максимова в модификации Ю.А. Криволапова, шкала 50 мкм); б – гиперплазия и расширение эритроидного ростка (окраска гематоксилином и эозином, шкала 50 мкм)

Fig. 1. Microscopic image of the patient's bone marrow: а – megakaryocyte lineage hyperplasia, a wide range of abnormal megakaryocytes (A.A. Maksimov's azur-2 and eosin staining in Yu.A. Krivolapov modification, 50 micrometers scale); б – erythroid lineage hyperplasia and extension (hematoxylin and eosin staining, 50 micrometers scale)

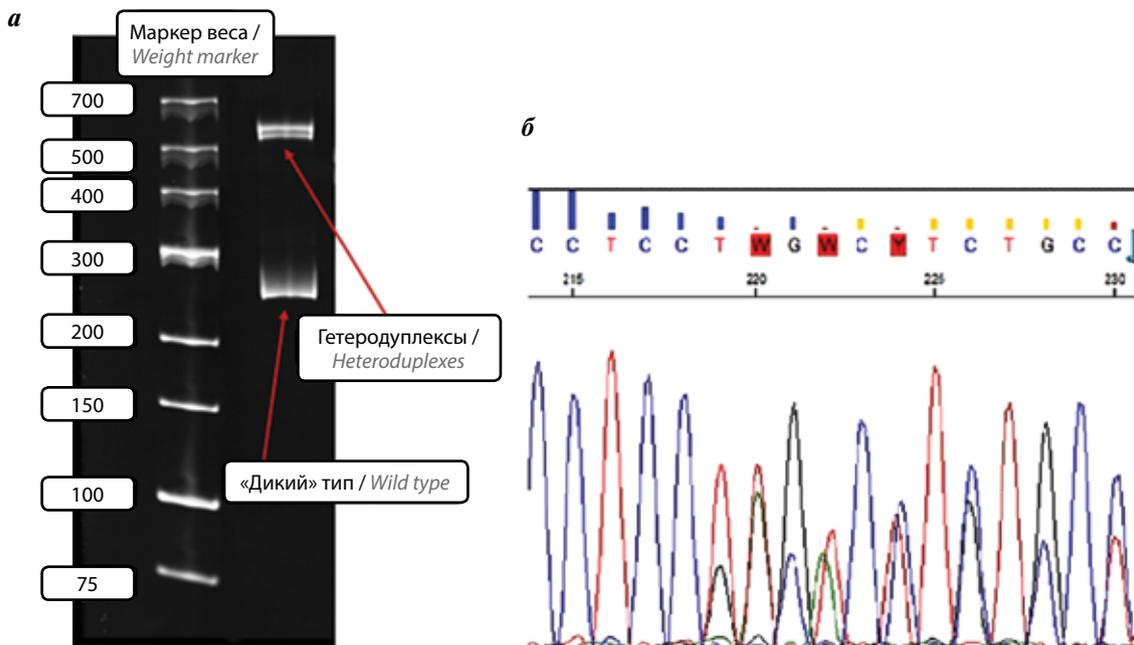


Рис. 2. Результаты анализа соматической мутации с.1154_1155insGTGTC в гене CALR: а – гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле; б – секвенирование по Сэнгеру

Fig. 2. Results of somatic CALR mutation с.1154_1155insGTGTC analysis: а – heteroduplex analysis with the following electrophoresis in polyacrylamide gel; б – Sanger's DNA sequencing

согласно клиническим рекомендациям 2016 г. установлен окончательный клинический диагноз – миелопролиферативная неоплазия: ИП, MF-0.

По результатам обследования пациенту с июня 2018 г. была назначена цитостатическая и дезагрегантная терапия (гидроксикарбамид и ацетилсалициловая кислота соответственно).

На момент последнего осмотра (сентябрь 2021 г.) пациент чувствовал себя удовлетворительно, вел привычный образ жизни, получал ранее назначенное лечение. В гемограмме уровень гемоглобина 158 г/л, тромбоцитоз до 670×10^9 /л, количество эритроцитов $4,7 \times 10^{12}$ /л, количество лейкоцитов $6,4 \times 10^9$ /л. Спленомегалия не выявлена (размер селезенки $11,7 \times 5,4$ см).

Молекулярно-генетическое исследование ДНК пациента включало анализ всех драйверных мутаций, ассоциированных с Ph-негативными МПН согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. Анализ мутаций в экзоне 14 гена JAK2 и в гене MPL проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (SNP-скрин, Синтол, Россия). Поиск мутаций в экзоне 12 гена JAK2 выполняли методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле [9]. Искомых мутаций не выявлено. Мутация в гене CALR у обследуемого пациента изначально была обнаружена также при скрининговом исследовании методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 2). Несмотря

на то что на электрофореграмме отсутствовала четкая полоса, соответствующая мутантному аллелю, все же наличие гетеродуплексов дало основание предполагать присутствие мутации в исследуемой области. Далее мутация была подтверждена и идентифицирована методом Сэнгера как инсерция с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46 (см. рис. 2).

Для определения уровня аллельной нагрузки выявленной мутации с.1154_1155insGTGTC использовали метод пиросеквенирования. Результаты количественного анализа 2 образцов ДНК пациента по сравнению с образцом ДНК «дикого» типа приведены на рис. 3. Уровень аллельной нагрузки в образце от июня 2018 г. составил 20 %, в образце от ноября 2018 г. — 28 %.

Обсуждение

Информация о выявленной нами мутации присутствует в базе COSMIC [10], она встречалась у пациентов как с эссенциальной тромбоцитемией, так и с миелофиброзом [11, 12], но в целом описаны лишь несколько Ph-негативных МПН у пациентов с такой мутацией. Важно отметить, что обнаруженная мутация с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46 очень схожа с наи-

более часто встречающейся мутацией CALR 2-го типа с.1154_1155insTTGTC; р.К385fs*47 с той лишь разницей, что вместо первого нуклеотида Т находится нуклеотид G. В целом это также приводит к синтезу более длинного белка CALR с измененным С-концевым участком, который становится основным. В отличие от белковой последовательности CALR при мутации с.1154_1155insTTGTC у нашего и других пациентов с мутацией с.1154_1155insGTGTC изменение аминокислотной последовательности белка начинается не с лизина 385, а с аспарагина 386.

Интересно отметить, что описанные в работе J. Vroeseus и соавт. оба пациента с JAK2-негативным статусом с диагнозом ИП имели наиболее распространенную в гене CALR мутацию 1-го типа (делецию 52 нуклеотидов) [5].

В литературе неоднократно сообщалось о случаях сочетания мутации JAK2V617F и какой-либо мутации в гене CALR у пациентов с Ph-негативными МПН [13, 14], в частности с ИП [15]. Таким образом, в представленном случае мы не можем исключить возможность развития у пациента биклонального заболевания, обусловленного дополнительной неизвестной мутацией,

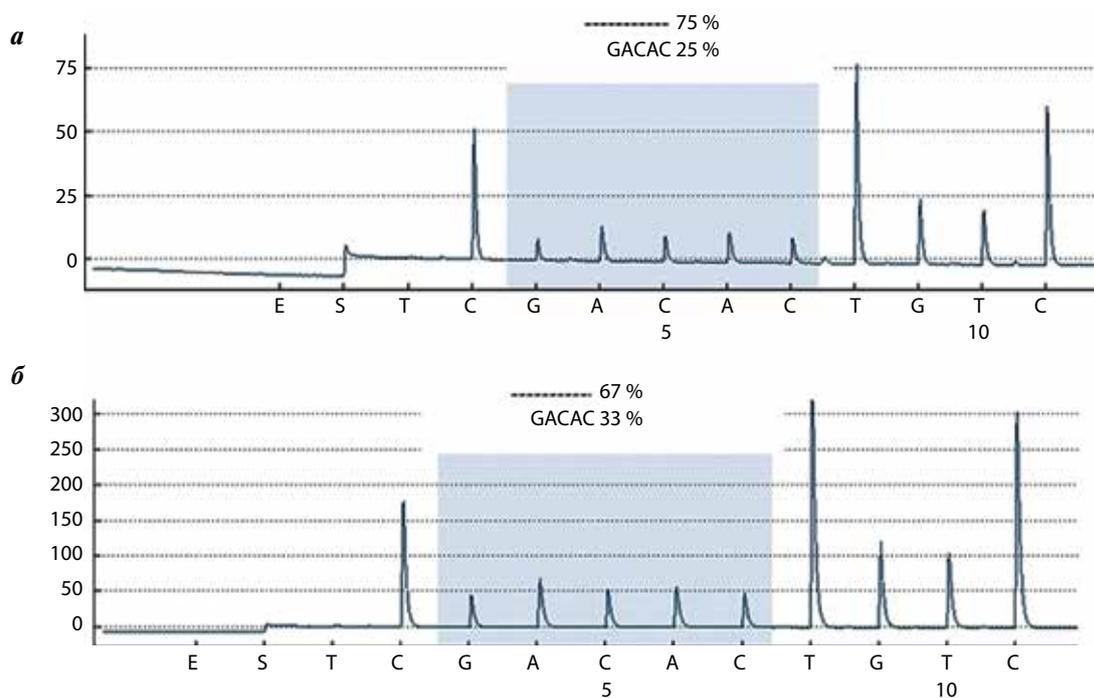


Рис. 3. Результаты анализа соматической мутации с.1154_1155insGTGTC в гене CALR методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 с использованием software version 2.0.6: а — результат от июня 2018 г.; б — результат от ноября 2018 г. Каждый раз в постановке параллельно с исследуемым образцом проводилось секвенирование образца без мутации для определения фоновых значений, которые составили 5 %, что совпадает с данными литературы о чувствительности методики пиросеквенирования. Количественный расчет соотношения интактных и мутантных молекул ДНК в образце из венозной крови (аллельная нагрузка) выполняли с помощью программного обеспечения прибора. Для определения истинного уровня аллельной нагрузки из полученного значения значения уровня аллельной нагрузки в исследуемом образце вычитали соответствующее значение, полученное при анализе образца без мутации (5 %)

Fig. 3. Results of CALR somatic mutation c.1154_1155insGTGTC analysis by pyrosequencing method at PyroMark Q24 using software version 2.0.6: a — result of the DNA sample analysis as of June 2018; б — result of the DNA sample analysis as of November 2018. Each time when the patient's sample was sequenced, a blank sample with no mutation was sequenced to determine the PSQ methodology baseline values. The baseline values were 5 %, which is consistent with the literature data about the pyrosequencing method sensitivity. The quantitative ratio between intact and mutant DNA molecules (allele burden) was calculated by the device software. To identify the true mutant allele burden the following formula was used: the allele burden level = % of sample containing mutant burden measured — % of blank sample (5 %)

произшедшей до или параллельно с мутацией *CALR*. Однако мы можем предполагать, что при отсутствии мутаций в гене *JAK2* мутации в гене *CALR* могут быть связаны с фенотипом ИП.

Заключение

Представлен клинический случай наличия соматической мутации *CALR* (с.1154_1155insGTGTC; р.Е386fs*46)

у пациента с *JAK2*-отрицательным статусом с диагнозом ИП. Мутация очень схожа с наиболее часто встречающейся мутацией *CALR* 2-го типа с.1154_1155insTTGTC; р.К385fs*47 и также приводит к изменению С-концевого участка белка, который становится основным. Нельзя исключать биклональное заболевание у пациента, но также можно предполагать связь мутации в гене *CALR* с фенотипом ИП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Tefferi A., Thiele J., Vannucchi A.M., Barbui T. An overview on *CALR* and *CSF3R* mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28(7):1407–13. DOI: 10.1038/leu.2014.35.
- Luo W., Yu Z. Calreticulin (*CALR*) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Invest* 2015;2:16. DOI: 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.08.01.
- Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.
- Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
- Broseus J., Park J.H., Carillo S. et al. Presence of calreticulin mutations in *JAK2*-negative polycythemia vera. *Blood* 2014;124(26):3964–6. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583161.
- Chauveau A., Nibourel O., Tondeur S. et al. Absence of *CALR* mutations in *JAK2*-negative polycythemia. *Haematologica* 2017;102(1):e15–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.154799.
- Spivak J.L. Myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2017;376(22):2168–81. DOI: 10.1056/NEJMra1406186.
- Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена *JAK2*. *Лабораторная служба* 2017;6(1):29–33. [Subbotina T.N., Kharsekina A.E., Dunaeva E.A. et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service* 2017;6(1):29–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/labs20176129-33.
- Catalog of somatic mutations in cancer. Available at: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>.
- Li N., Yao Q.M., Gale R.P. et al. Frequency and allele burden of *CALR* mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without *JAK2*(V617F) or *MPL* mutations. *Leuk Res* 2015;39(5):510–4. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.02.006.
- Panovska-Stavridis I., Eftimov A., Ivanovski M. et al. Diversities of calreticulin gene mutations in macedonian patients with essential thrombocythemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016;16(8):477–81. DOI: 10.1016/j.clml.2016.04.019.
- Tefferi A., Lasho T.L., Finke C.M. et al. *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472–7. DOI: 10.1038/leu.2014.3.
- Xu N., Ding L., Yin C. et al. A report on the co-occurrence of *JAK2V617F* and *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasm patients. *Ann Hematol* 2015;94(5):865–7. DOI: 10.1007/s00277-014-2248-0.
- Thompson E.R., Nguyen T., Kankanige Y. et al. Clonal independence of *JAK2* and *CALR* or *MPL* mutations in comutated myeloproliferative neoplasms demonstrated by single cell DNA sequencing. *Haematologica* 2021;106(1):313–5. DOI: 10.3324/haematol.2020.260448.

Вклад авторов

Т.Н. Субботина: разработка дизайна исследования, научное редактирование, утверждение статьи; И.Е. Маслокова, Д.В. Курочкин, М.А. Михалёв, М.Г. Осадчая, Т.А. Гаркуша, Е.А. Дунаева: получение данных, анализ полученных данных; В.А. Хоржевский, К.О. Миронов: научное редактирование, утверждение статьи.

Authors' contributions

T.N. Subbotina: research design development, article editing, article approval; I.E. Maslyukova, D.V. Kurochkin, M.A. Mikhalev, M.G. Osadchaya, T.A. Garkusha, E.A. Dunaeva: obtaining data, analysis of the obtained data; V.A. Khorzhevskiy, K.O. Mironov: article editing, article approval.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Субботина / T.N. Subbotina: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>
 И.Е. Маслокова / I.E. Maslyukova: <https://orcid.org/0000-0003-1323-2612>
 Д.В. Курочкин / D.V. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0003-1063-7702>
 М.А. Михалёв / M.A. Mikhalev: <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>
 М.Г. Осадчая / M.G. Osadchaya: <https://orcid.org/0000-0002-4942-4299>
 В.А. Хоржевский / V.A. Khorzhevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-9196-7246>
 Т.А. Гаркуша / T.A. Garkusha: <https://orcid.org/0000-0002-3343-6973>
 Е.А. Дунаева / E.A. Dunaeva: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>
 К.О. Миронов / K.O. Mironov: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов. Пациент подписал информированное согласие на публикацию своих данных.
Compliance with patient rights. The patient gave written informed consent to the publication of his data.