

# MUTATION ANALYSIS OF *JAK2* EXON 12 AND *MPL* EXON 10 IN MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

CAT-presentatie Jolien De Bie

18-02-2020

# OVERZICHT

Inleiding

Probleemstelling

Onderzoeksvragen:

1. Bestaan er guidelines gericht op moleculaire diagnostiek voor MPN en welke aanbevelingen doen zij voor *JAK2* exon 12 en *MPL* exon 10 evaluatie?
2. Hoe verloopt de *JAK2* exon 12 en *MPL* exon 10 analyse momenteel in UZ Leuven en hoe verhoudt onze workflow zich met de literatuur en met andere ziekenhuizen?
3. Is allel-specifieke PCR een mogelijke optie voor *JAK* exon 12 en/of *MPL* exon 10 mutatie analyse?

Conclusie

To do's

# INLEIDING

Myeloproliferatieve aandoeningen:

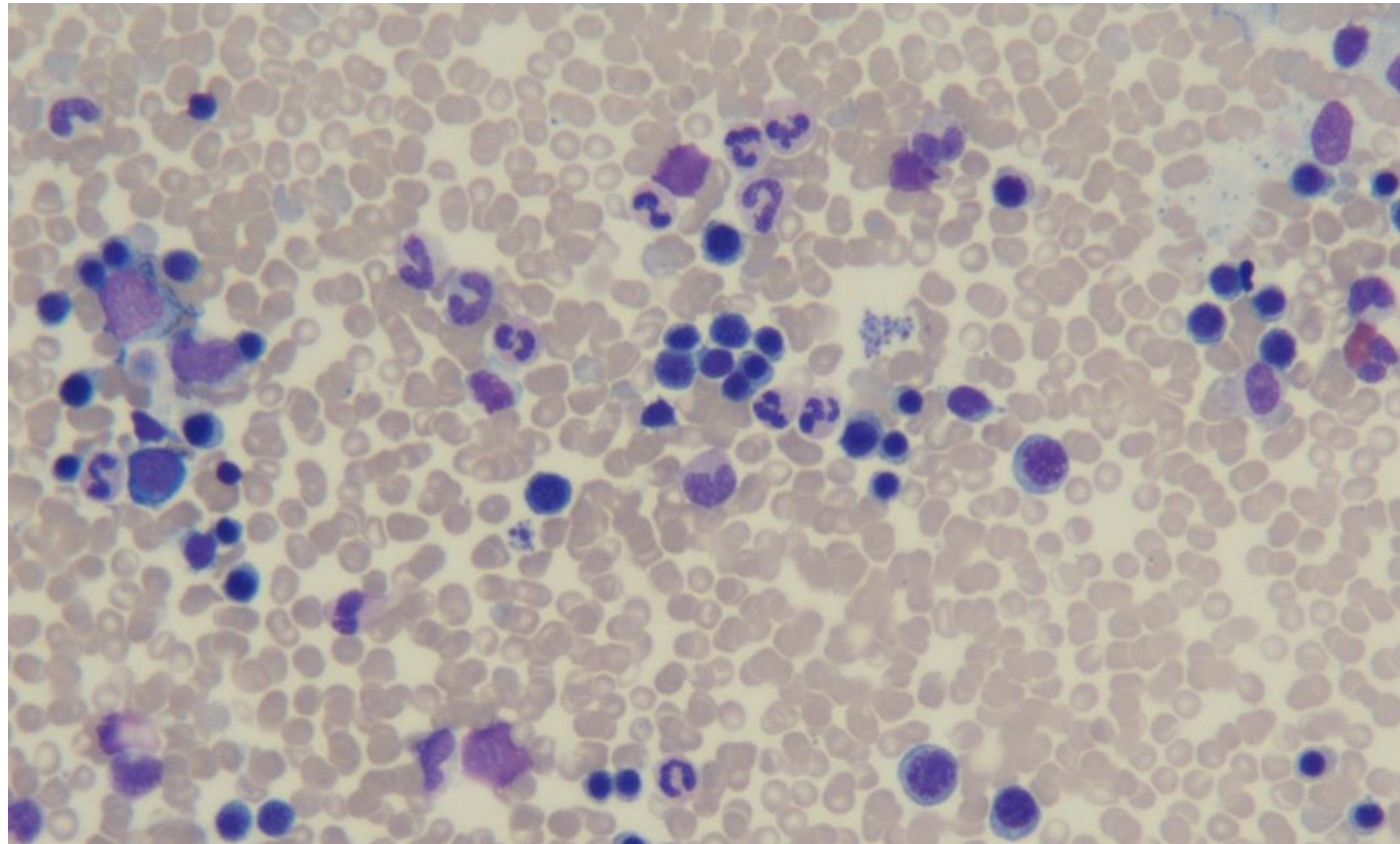
- CML
- CNL
- PV
- PMF
- ET
- CEL, NOS
- MPN, unclassifiable

# INLEIDING

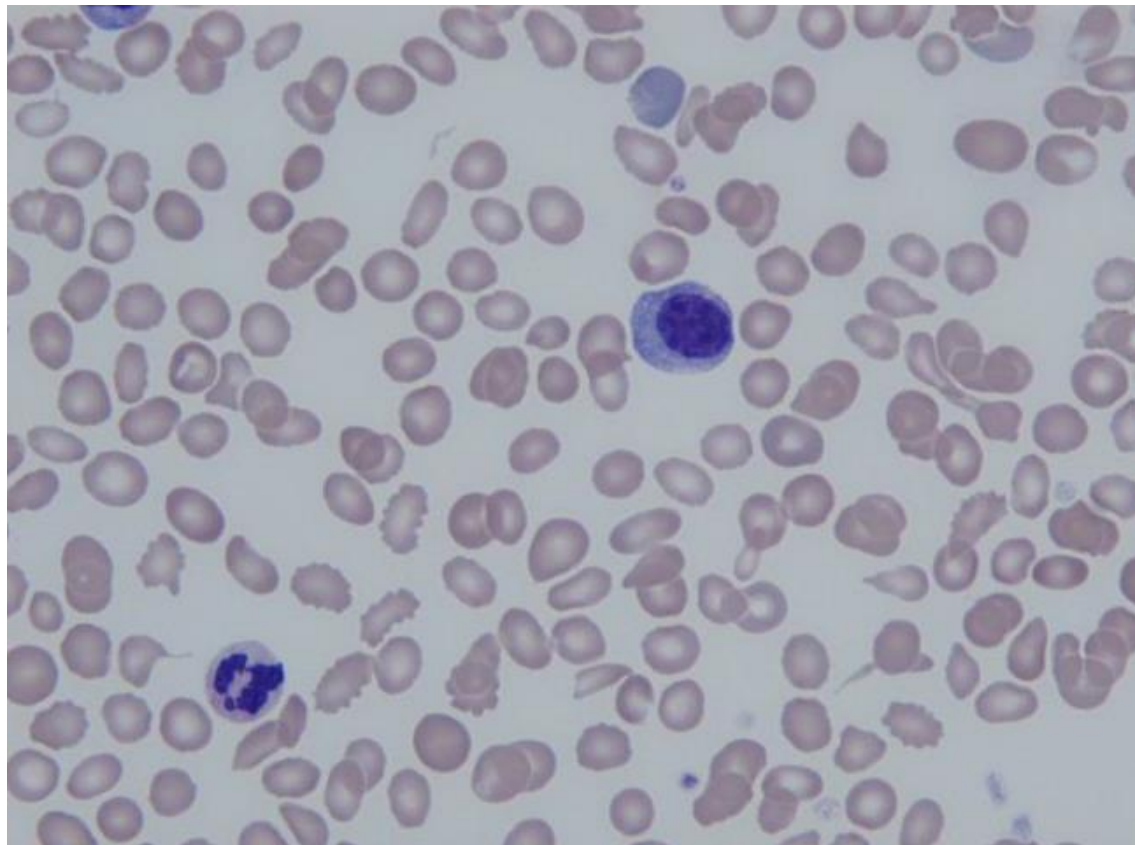
Myeloproliferatieve aandoeningen:

- ~~CML~~
- ~~CNL~~
- PV
- PMF
- ET
- ~~CEL, NOS~~
- ~~MPN, unclassifiable~~

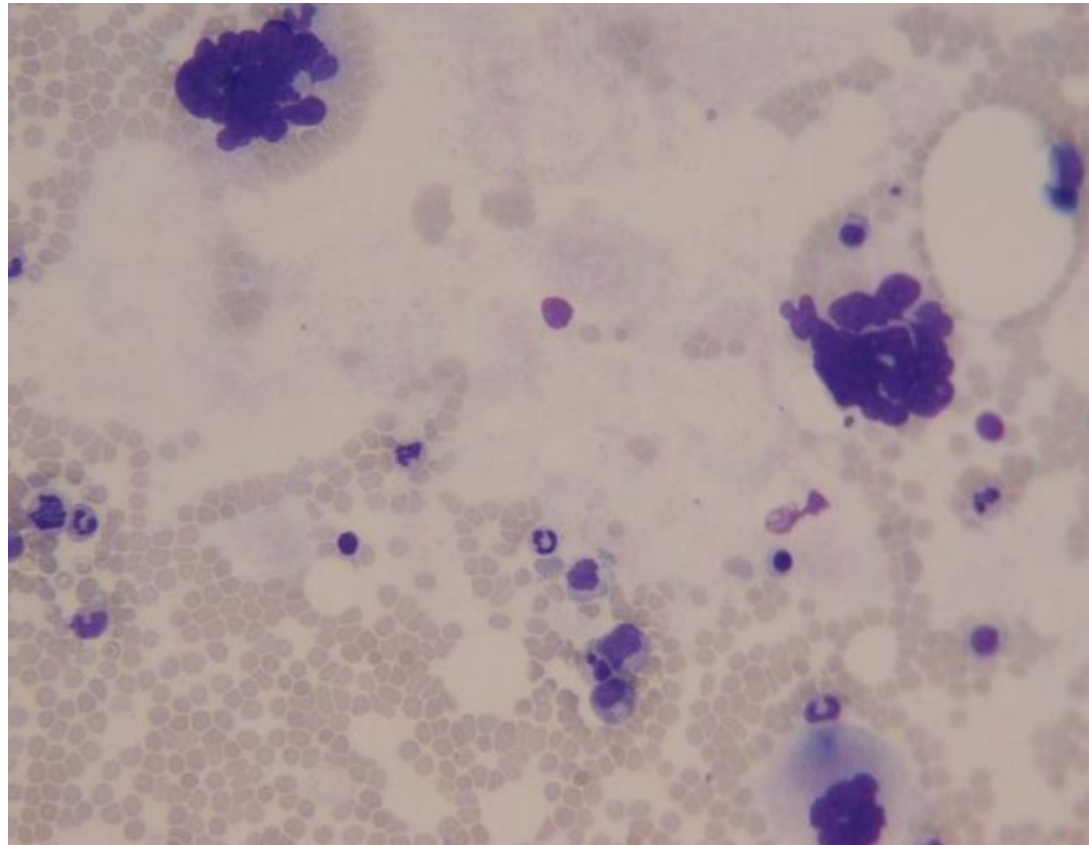
# POLYCYTHEMIA VERA



# PRIMAIRE MYELOFIBROSE



# ESSENTIËLE TROMBOCYTOSE



# *JAK2, CALR, MPL*

PV:

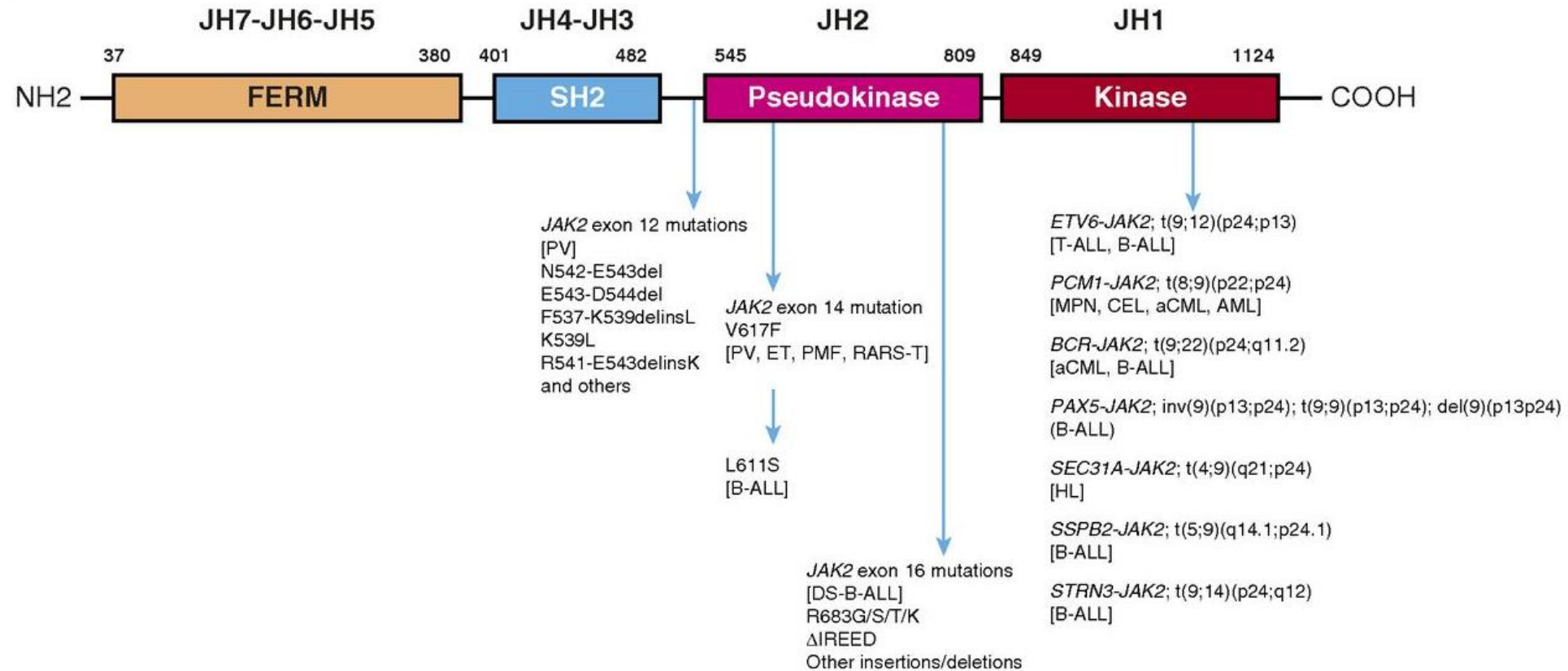
- 95% *JAK2* V617F
- 3% *JAK2* exon 12

ET en PMF:

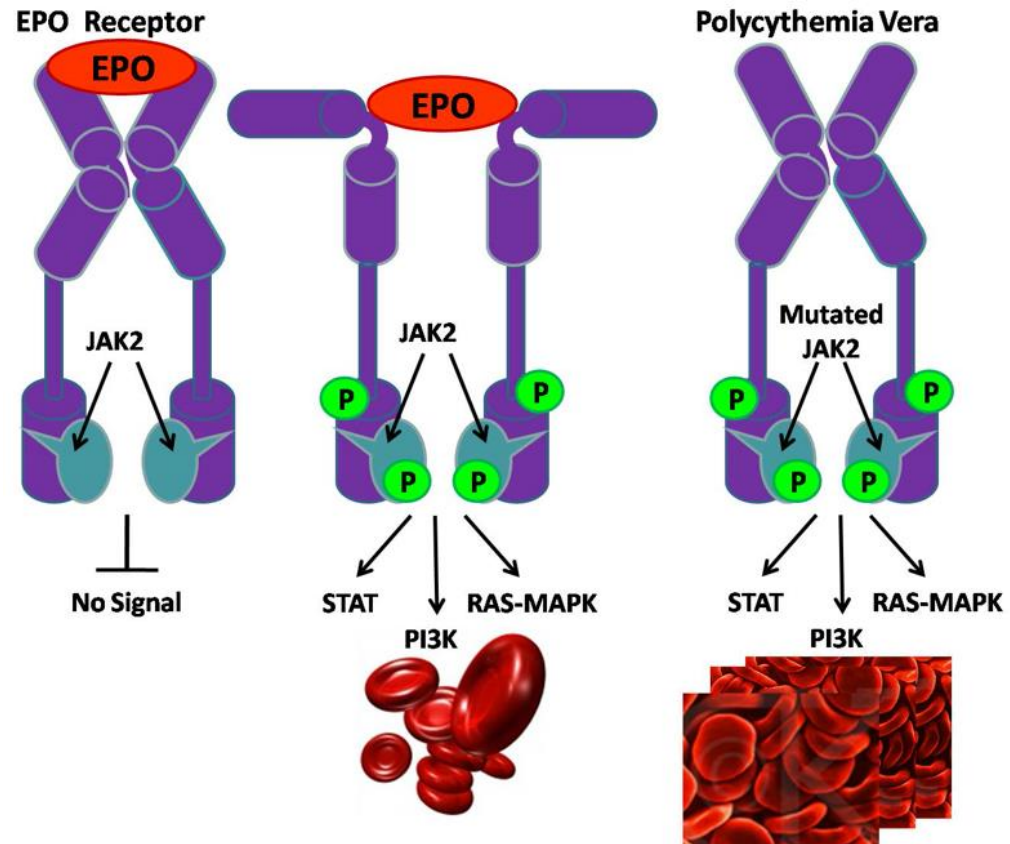
- 50% *JAK2* V617F
- 30% *CALR* indels/mutaties
- 3-8% *MPL* exon 10
- 12% 'triple-negative'



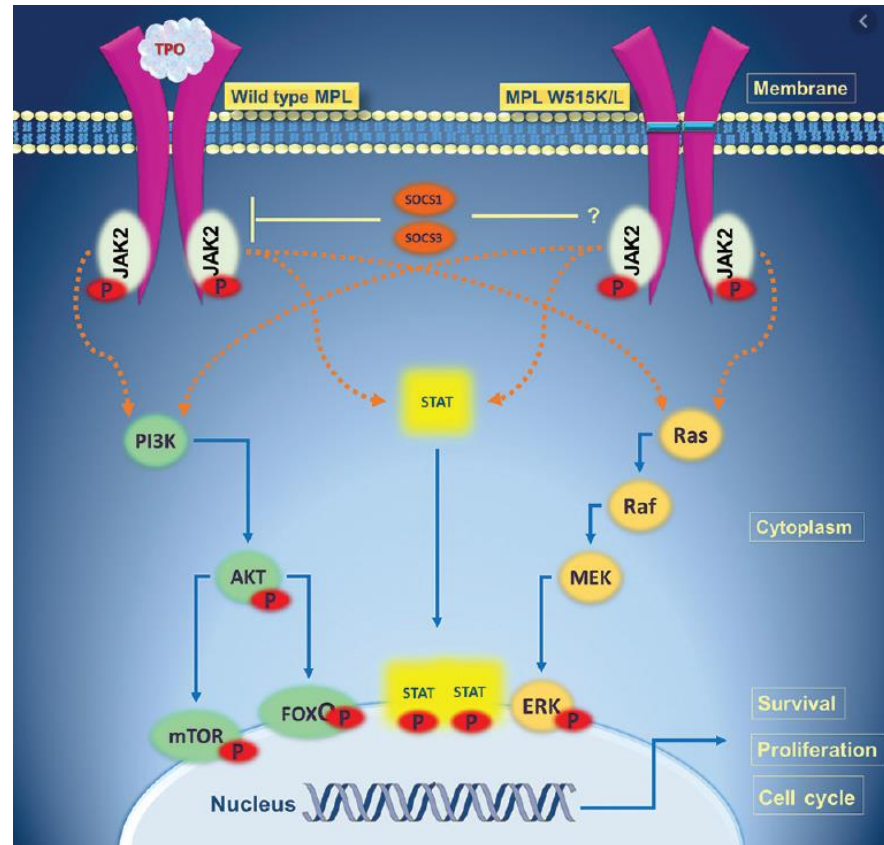
# JANUS KINASE 2



# JAK2 EN DE JAK-STAT PATHWAY



# MYELOPROLIFERATIVE LEUKEMIA VIRUS ONCOGENE



# PROBLEEMSTELLING

PV

JAK2 V617F

V617F negatief

JAK2 exon 12 PCR

PMF

TruSight Myeloid Panel (JAK2,  
CALR, MPL)

ET

JAK2 V617F + CALR PCR

beide negatief

MPL exon 10 (NGS)

# PROBLEEMSTELLING

PV

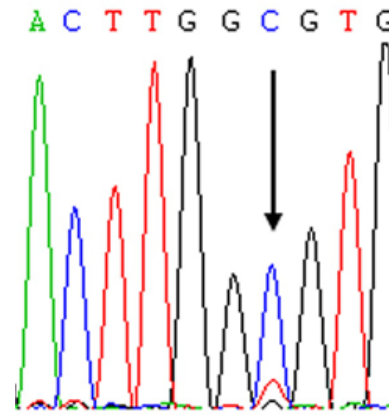
JAK2 V617F

V617F negatief

JAK2 exon 12 PCR

Sanger sequencing:

< 15-20% VAF niet detecteerbaar



# PROBLEEMSTELLING

NGS:

geen terugbetaling voorzien bij vermoeden ET

**ET**

*JAK2 V617F + CALR PCR*

↓ beide negatief

**MPL exon 10 (NGS)**

# ONDERZOEKSVRAGEN

1. Bestaan er guidelines gericht op moleculaire diagnostiek voor MPN en welke aanbevelingen doen zij voor *JAK2* exon 12 en *MPL* exon 10 evaluatie?

# GUIDELINES

- McMullin MF, et al. A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology Guideline. *Br J Haematol.* 2019;184:176-191.
- Barbui T, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia.* 2018;32:1057–1069.
- Gong JZ, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2013;15:733-744.
- Bench AJ, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol.* 2013;160:25-34.



# GUIDELINES

## Conclusies:

### PV

- test V617F hotspot
- zo negatief en klinisch sterk vermoeden: test *JAK2* exon 12
- sensitieve methode nodig

### ET

- 2 strekkingen: *JAK2* > *CALR* > *MPL* versus direct NGS
- sensitieve methode nodig

**=> Wanneer is techniek gevoelig genoeg?**

# LITERATUURSTUDIE

Method	Benefits	Critical points	Sensitivity (%)
qPCR (AS, LNA)	High sensitivity; quantitative	Detects only target <u>mutations</u>	0.1–0.01
PCR (AS)	High sensitivity; simple to perform	Detects only target mutations; not quantitative	0.1–1
<u>Melting curve analysis</u>	Simple to perform; <u>semiquantitative</u> ; low cost	Detects target mutation only; moderate to low sensitivity; poor reproducibility in low+ samples	5–10
<u>Pyrosequencing</u>	Simple to perform; quantitative; low cost	Detects target mutation only; <u>relatively low sensitivity</u>	5–10
RFLP	Low <u>cost</u>	Relatively low sensitivity; requires post-PCR manipulation; unreliable in low+ samples; not quantitative.	1–10
<u>Sanger sequencing</u>	Detects known and unknown mutations; bidirectional confirmation; validated methods	Low sensitivity; time-consuming; not quantitative; high input of DNA/RNA	10-20
Real time PCR	Detection of known mutations; validated methods	High input of DNA/RNA; no simultaneous screening of multiple genes in multiple samples	1
Digital PCR	Low input of DNA/RNA; detection of known mutations; cost-effective for rapid genotyping and monitoring	No simultaneous screening of multiple genes in multiple samples	0.1–1
NGS	Low input of DNA/RNA; massively parallel sequencing; decreased sequencing cost/gene; detection of known and unknown mutations; simultaneous screening of multiple genes in multiple samples	Validation studies required; high-complexity workflow and analyzing results; genome data analysis is time-consuming	1

PCR, polymerase chain reaction; AS, allele specific; LNA, locked nucleic acid; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SS, Sanger sequencing; NGS, next generation sequencing

# ONDERZOEKSVRAGEN

2. Hoe verloopt de *JAK2* exon 12 en *MPL* exon 10 analyse momenteel in UZ Leuven en hoe verhoudt onze workflow zich met de literatuur en met andere ziekenhuizen?

# PERFORMANTIE HUIDIGE WORKFLOW

2 queries voor *JAK2* exon 12 en voor *MPL* exon 10 afzonderlijk:

- over gans 2018
- van start test tot oktober 2019

Aanvraagfrequentie?

Voorkomen van positieve stalen?

# JAK2 EXON 12

## aanvraagfrequentie

January 2018 – December 2018: JAK2 exon 12 requests

Method	Number of patients tested	JAK2 positive (%)
PCR + Sanger sequencing	160	4 (2.5%)

January 2013 - October 2019: JAK2 exon 12 requests

Method	Number of patients tested	JAK2 positive (%)
PCR + Sanger sequencing	755	13 (1.7%)
NGS	1	1

# JAK2 EXON 12

Weinig positieve stalen...

January 2018 – December 2018: JAK2 exon 12 requests

Method	Number of patients tested	JAK2 positive (%)
PCR + Sanger sequencing	160	4 (2.5%)

January 2013 - October 2019: JAK2 exon 12 requests

Method	Number of patients tested	JAK2 positive (%)
PCR + Sanger sequencing	755	13 (1.7%)
NGS	1	1

... versus 3% van PV-patiënten\*?

\*Scott LM, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007;356:459-468.

# JAK2 EXON 12

Invloed type staal?

January 2013 - October 2019: type of samples received

Sample type	Number of samples (% of total)	JAK2 positive (% of total)
Bone marrow or DNA derived from bone marrow	110 (14.4)	3 (21.4)
Peripheral blood or DNA derived from peripheral blood	409 (53.5)	7 (50.0)
DNA not otherwise specified	245 (32.0)	4 (28.6)
other	1 (0.1)	0 (0.0)
total	765	14

+ Scott LM, et al. N Engl J Med. 2007.

- Kjær L, et al. PLoS One. 2012.

- Pardanani A, et al. Leukemia. 2007.

# *JAK2* EXON 12

Andere mogelijke verklaringen:

- Gevoeligere detectiemethode dan Sanger sequencing
- Stalen van perifere ziekenhuizen waar *JAK2* V617F analyse nog dmv PCR and Sanger sequencing gebeurt
- Zelzame mutaties buiten exon 12
- Schnittger et al: aberrante *JAK2* exon 12 in 15.9% van V617F-negative PV patiënten, maar slechts bij 1.5% van de patiënten met onduidelijke erythrocytose



# MPL EXON 10

aanvraagfrequentie 2018

January 2018 – December 2018: TruSight myeloid panel requests

Indication	Number of panels (% of total)	MPL positive (%)
ET	16 (2.8)	2 (12.5)
PMF	1 (0.2)	0 (0.0)
MPN	70 (12.2)	4 (5.7)
Other	486 (84.8)	1 (0.2)
total	573	7

# MPL EXON 10

positieve stalen sinds start test

January 2013 - October 2019: TruSight myeloid panel requests

Indication	Number of panels (% of total)	MPL positive (%)
ET	24 (0.8)	2 (8.3)
PMF	45 (1.5)	2 (4.4)
MPN	420 (14.2)	20 (4.8)
MDS/MPN-RS	31 (1.0)	0 (0.0)
MDS/MPN	11 (0.4)	0 (0.0)
other	2426 (82.0)	5 (0.2)
total	2957	29

January 2013 - October 2019: standard PCR and Sanger sequencing for MPL exon 10

	Number	MPL positive (%)
Samples	362	33 (9.1)
Patients	348	31 (8.9)

# *MPL* EXON 10

*MPL* + sinds start TruSight Myeloid panel: ~5%

*versus*

*MPL* + met PCR en Sangersequencing: ~9%

Nochtans heeft 1 op 3 patiënten VAF <15%

Betere patiëntenselectie in het verleden?

# ANDERE ZIEKENHUIZEN?

## *JAK2* exon 12 analyse:

- PCR en Sanger sequencing (CHU Liège)
- NGS (AZ Sint-Lucas Gent, UCL Saint-Luc)

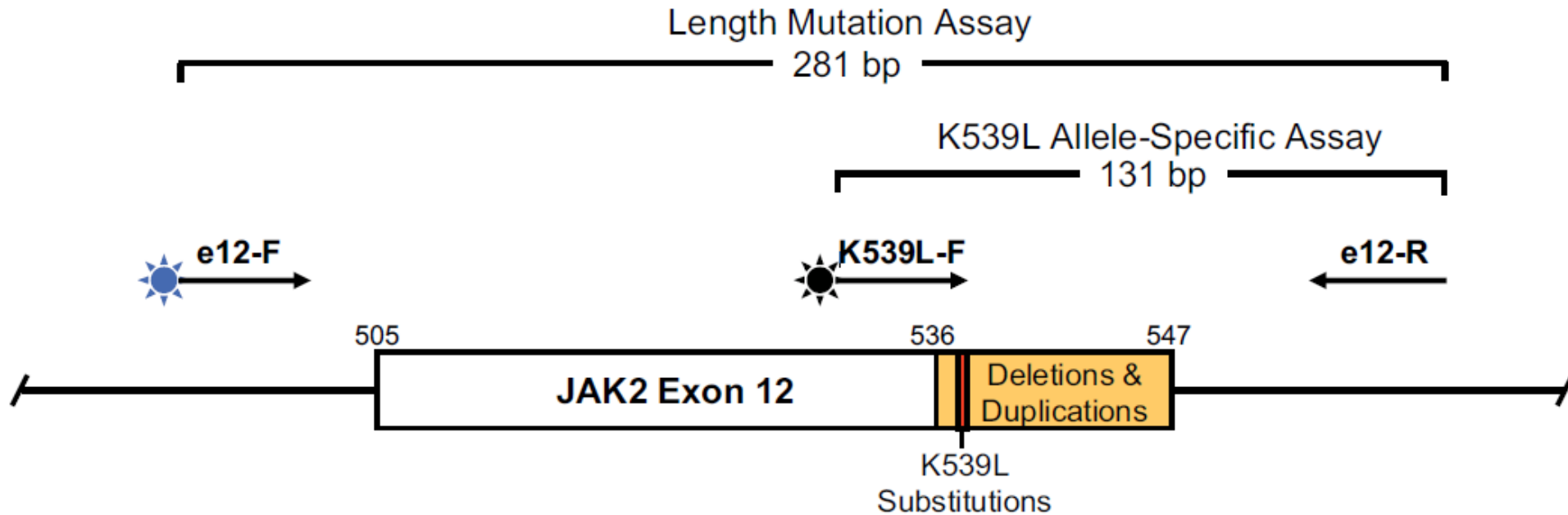
## *MPL* exon 10 analyse:

- PCR en Sanger sequencing (AZ Sint-Jan Brugge)
- NGS (CHU Liège, AZ Sint-Lucas Gent, UCL Saint-Luc)

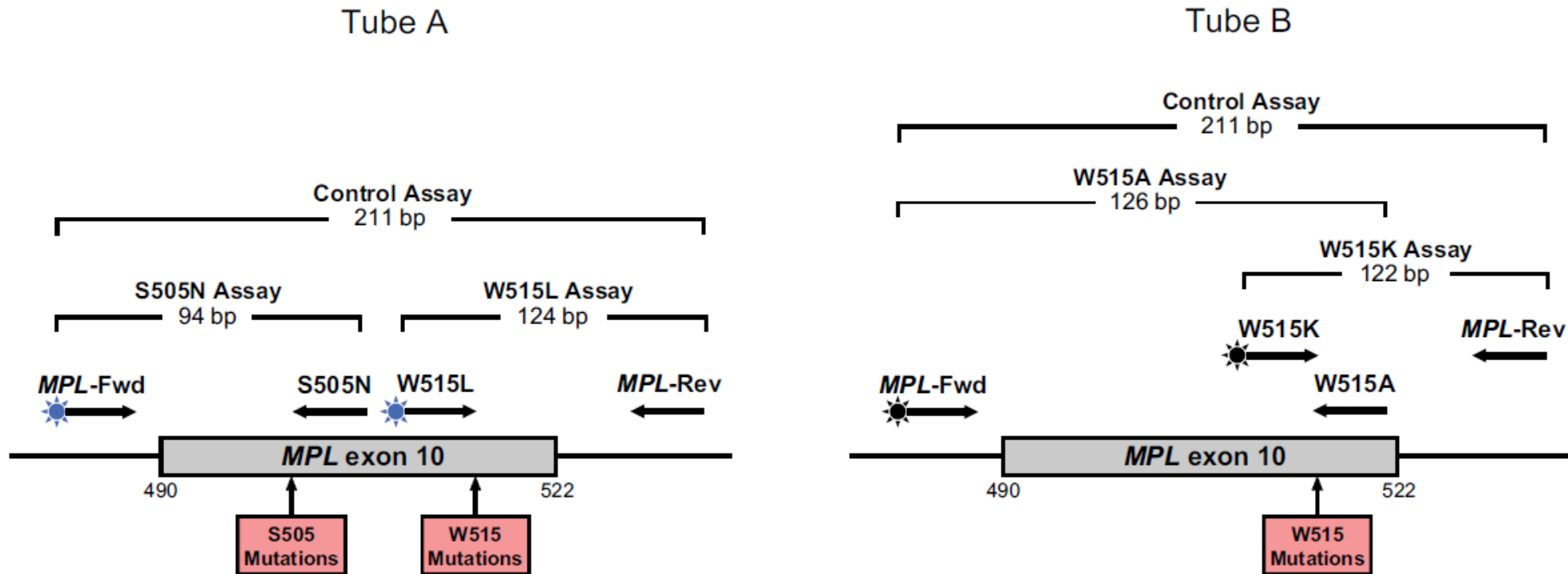
# ONDERZOEKSVRAGEN

3. Is allel-specifieke PCR een mogelijke optie voor *JAK* exon 12 en/of *MPL* exon 10 mutatie analyse?

# AS-PCR VOOR *JAK2* EXON 12



# AS-PCR VOOR *MPL* EXON 10



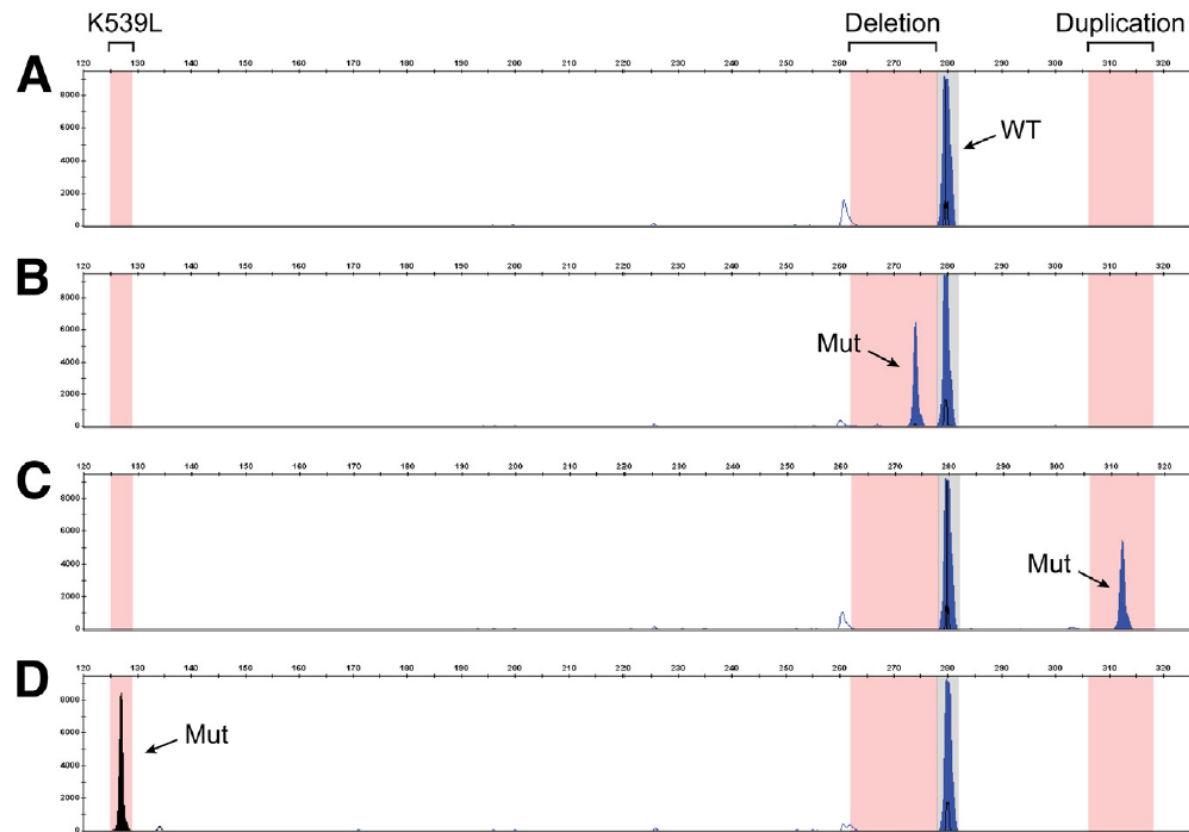
# AS-PCR PRIMERS EN PROGRAMMA

Primer	Sequence
JAK2-E12-forward	5'-/56-FAM/CTCCTCTTTGGAGCAATTCA-3'
JAK2-E12-reverse	5'-TCCAATGTCACATGAATGTAAATC-3'
JAK2-E12-K539L-forward	5'-/5HEX/GAACCAAATGGTGTTTCACTT-3'
MPL-forward	5'-/56-FAM/TGGGCCGAAGTCTGACCCTTT-3'
MPL-reverse	5'-CAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT-3'
MPL-W515L-forward	5'-/56-FAM/GGCCTGCTGCTGCTGAGATT-3'
MPL-W515K-forward	5'-/56-FAM/GCCTGCTGCTGCTGAGGAA-3'
MPL-W515A-reverse	5'-GTAGTGTGCAGGAAACTGCGC-3'
MPL-S505N-reverse	5'-CAGGCCAGGACGGCGT-3'

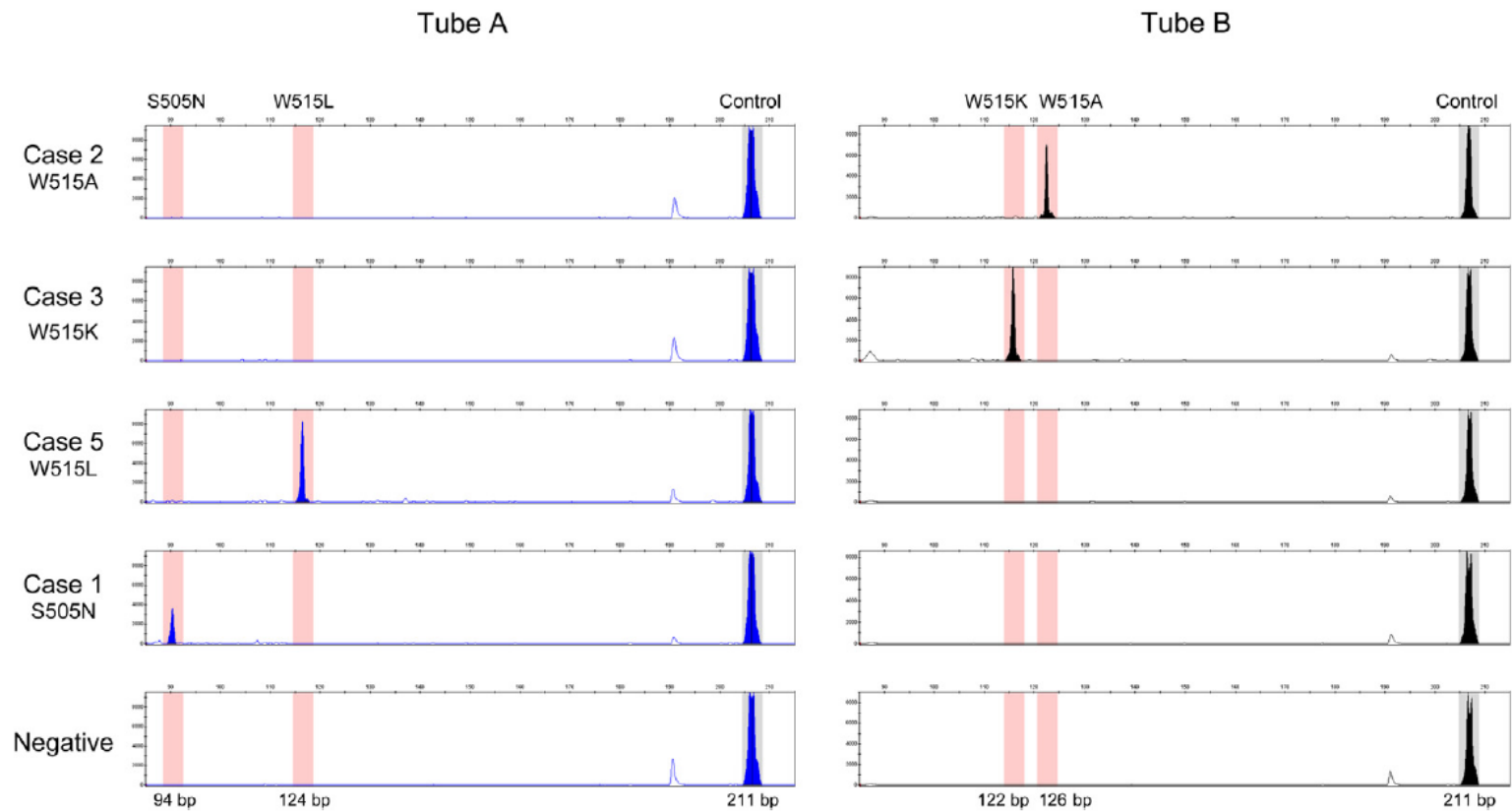
Temperature	Duration	Cycles
95°C	15 min	1
95°C	40 sec	35
60°C	60 sec	
72°C	60 sec	
72°C	7 min	1
4°C	∞	1



# AS-PCR VOOR *JAK2* EXON 12



# AS-PCR VOOR *MPL* EXON 10



# RESULTATEN AS-PCR VOOR *JAK2*

Case	Gene	Mutation	VAF (dilution minimum)	Result AS-PCR	Discordant
1	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
2	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
3	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
4	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
5	<i>JAK2</i> exon 12	K539L	/	K539L	
6	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543del	12% (2%)	Deletion	
7	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543del	50%	Deletion	
8	<i>JAK2</i> exon 12	H538_K539delinsL	/	Deletion	
9	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543delinsK	/	Deletion	
10	<i>JAK2</i> exon 12	I546_F547insII	/	Insertion	

# RESULTATEN AS-PCR VOOR *JAK2*

Case	Gene	Mutation	VAF (dilution minimum)	Result AS-PCR	Discordant
1	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
2	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
3	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
4	<i>JAK2</i> exon 12	Wild type		Wild type	
5	<i>JAK2</i> exon 12	K539L	/	K539L	
6	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543del	12% (2%)	Deletion	
7	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543del	50%	Deletion	
8	<i>JAK2</i> exon 12	H538_K539delinsL	/	Deletion	
9	<i>JAK2</i> exon 12	N542_E543delinsK	/	Deletion	
10	<i>JAK2</i> exon 12	I546_F547insII	/	Insertion	

# RESULTATEN AS-PCR VOOR *MPL*

11	<i>MPL</i> exon 10	Wild type		Wild type	
12	<i>MPL</i> exon 10	Wild type		Wild type	
13	<i>MPL</i> exon 10	Wild type		Wild type	
14	<i>MPL</i> exon 10	Wild type		Wild type	
15	<i>MPL</i> exon 10	W515R	35%	Wild type	Not included in assay
16	<i>MPL</i> exon 10	W515L	2%	W515L	
17	<i>MPL</i> exon 10	W515L	48%	W515L	
18	<i>MPL</i> exon 10	W515L	34%	W515L	
19	<i>MPL</i> exon 10	W515L	7%	W515L	
20	<i>MPL</i> exon 10	W515L	3%	W515L	
21	<i>MPL</i> exon 10	W515L	2%	W515L	Not called, but small peak visible
22	<i>MPL</i> exon 10	S505N	23% (2%)	S505N	
23	<i>MPL</i> exon 10	S505N	45%	S505N	
24	<i>MPL</i> exon 10	W515K	24% (2%)	W515K	
25	<i>MPL</i> exon 10	W515K	43%	Wild type	<u>Indel</u> leading to W515K instead of point mutation
26	<i>MPL</i> exon 10	W515K	/	W515K	
27	<i>MPL</i> exon 10	W515A	43% (2%)	W515A	
28	<i>MPL</i> exon 10	W515A	17%	W515A	
29	<i>MPL</i> exon 10	W515L & R514K	/	Wild type	No primer annealing due to R514K
30	<i>MPL</i> exon 10	Intron 10	/	Wild type	Not included in assay, no known clinical significance

# RESULTATEN AS-PCR VOOR *MPL*

11	MPL exon 10	Wild type		Wild type	
12	MPL exon 10	Wild type		Wild type	
13	MPL exon 10	Wild type		Wild type	
14	MPL exon 10	Wild type		Wild type	
15	MPL exon 10	W515R	35%	Wild type	Not included in assay
16	MPL exon 10	W515L	2%	W515L	
17	MPL exon 10	W515L	48%	W515L	
18	MPL exon 10	W515L	34%	W515L	
19	MPL exon 10	W515L	7%	W515L	
20	MPL exon 10	W515L	3%	W515L	
21	MPL exon 10	W515L	2%	W515L	Not called, but small peak visible
22	MPL exon 10	S505N	23% (2%)	S505N	
23	MPL exon 10	S505N	45%	S505N	
24	MPL exon 10	W515K	24% (2%)	W515K	
25	MPL exon 10	W515K	43%	Wild type	<u>Indel</u> leading to W515K instead of point mutation
26	MPL exon 10	W515K	/	W515K	
27	MPL exon 10	W515A	43% (2%)	W515A	
28	MPL exon 10	W515A	17%	W515A	
29	MPL exon 10	W515L & R514K	/	Wild type	No primer annealing due to R514K
30	MPL exon 10	Intron 10	/	Wild type	Not included in assay, no known clinical significance

# CONCLUSIE AS-PCR

Geen vals-positieve resultaten in geteste panel

Geen vals-negatieven voor *JAK2* exon 12, wél voor *MPL* exon 10 (3 van 19 stalen)

In retrospect:

- 4 van 55 *MPL*+ patiënten (7% of <1 per jaar) gemist
- 0 van 14 *JAK2*+ patiënten gemist (en mogelijks enkele extra gedetecteerd)

Eerste dilutie-experimenten tonen detectiedrempel 2-5%

# KOSTENANALYSE AS-PCR

Voor *JAK2* exon 12: 'gewone' PCR naar AS-PCR, dus iets duurdere analyse

Voor PMF: geen verandering, standaard NGS

Voor ET en 'vermoeden MPN': 86 TruSight Myeloid panels in 2018 vervangen door AS-PCR



# CONCLUSIE

1. Er bestaan verschillende guidelines voor moleculaire diagnostiek bij vermoeden MPN. Zij raden *JAK2* exon 12 analyse aan bij V617F-negatieve PV-patiënten met sterk klinisch vermoeden en *MPL* exon 10 analyse bij ET en PMF na uitsluiten *JAK2* V617F en *CALR* veranderingen. Gevoelige methoden (NGS, AS-(q)PCR, etc) worden aanbevolen.
2. CME test momenteel bij vermoeden PV eerst V617F, zo negatief en op vraag klinici wordt exon 12 PCR ingezet. Voor ET gebeurt in parallel V617F + *CALR*. Zo beiden negatief zijn , gebeurt NGS voor *MPL*.
3. Hoewel iets duurder dan gewone PCR en Sangersequencing, heeft AS-PCR vermoedelijk een lagere detectielimiet voor *JAK2* exon 12 varianten. Voor ET kan het een goede tussenoplossing zijn (goedkoper, tijdbesparend) tot NGS wordt terugbetaald. Zeldzamere *MPL*-varianten worden gemist.

# TO DO'S

1. bepalen detectielimiet aan de hand van dilutie-experimenten
2. validatie AS-PCR voor routine-implementatie
3. clinici informeren overschakeling naar AS-PCR

**BEDANKT VOOR UW AANDACHT**

