

خون

فصلنامه علمی پژوهشی
دوره ۵ شماره ۴ زمستان ۸۷ (۲۴۵-۲۳۷)

ارزیابی جهش JAK2 V617F در بیماران ایرانی مبتلا به نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو CML غیر کلاسیک

دکتر بهزاد پوپک^۱، هاجر میرمنگره^۲، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله^۳، دکتر رمضانعلی شریفیان^۴، دکتر حمید رضوانی^۵، دکتر فاضل الهی^۶، دکتر منوچهر کیهانی^۷، دکتر مجتبی قدیانی^۸، دکتر سعید کاوایانی^۹، کبری فراهانی^{۱۰}، ابوالفضل یوسفیان^{۱۱}، محمدعلی جهانگیرپور^{۱۲}، محمدعلی شمسیان^{۱۳}

چکیده

سابقه و هدف

جهش سوماتیک نقطه‌ای در ژن پروتئین تیروزین کیناز 2 (JAK2 V617F) باعث جابجایی G با T در اگزون ۱۲ JAK2 می‌شود که منجر به فعالیت خودبخودی پروتئین 2 JAK و انتقال پیام غیر وابسته به سیتوکاین می‌گردد و در نتیجه باعث تکثیر کلونال پیش‌سازهای خونساز در MPNs می‌شود. با توجه به این که تاکنون در ایران، هیچ گزارشی از جهش JAK2 V617F و اهمیت آن در تشخیص بیماران مبتلا به نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو ارایه نشده است، مطالعه حاضر به منظور تعیین این جهش انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه جهش 2 JAK با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، در ۱۰۰ بیمار با تشخیص جدید و یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی و را (۴۴ نفر)، بیماران مبتلا به میلوفیروز اولیه (۳۱ نفر) و بیماران مبتلا به ترومبوسیتمی اولیه (۲۵ نفر) بودند. برای تعیین جهش، ابتدا DNA ژنومیک از بافی کوت تهیه شده از خون محیطی استخراج شد و تعیین جهش به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی (Allele Specific PCR) انجام شد. برای تایید نتایج، واکنش هضم آنزیمی (RFLP) به وسیله آنزیم محدود‌الاثر BsaXI صورت گرفت.

یافته‌ها

بیماران مبتلا به نوپلاسم‌های میلوئیدی مورد بررسی، دارای جهش بودند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی و واکنش هضم آنزیمی، جهش 2 JAK در ۸۹٪ (CI: ۷۸-۱۰۰٪) بیماران پلی‌سیتمی و را، ۹۵٪ (CI: ۹۵-۱۰۰٪) بیماران میلوفیروز اولیه و ۵۶٪ (CI: ۱۲-۱۰۰٪) بیماران ترومبوسیتمی اولیه وجود داشت.

نتیجه‌گیری

میزان جهش ژن JAK2 در گروه مطالعه، قابل مقایسه با نتایج گزارش شده قبلی می‌باشد. بنابراین می‌توان بر اساس معیارهای تشخیصی سازمان بهداشت جهانی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی برای شناسایی این جهش در بیماران ایرانی مشکوک به نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو Ber-Abl منفی (MPNs) استفاده نمود.

کلمات کلیدی: جهش 2 JAK، پروتئین تیروزین کیناز، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، موتاسیون، نوپلاسم‌ها

تاریخ دریافت: ۱۷/۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۰/۱۰/۲۴

- ۱- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پژوهشی تهران - صندوق پستی: ۱۴۹۵/۱۴۹۵
- ۲- کارشناس علوم آزمایشگاهی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد پژوهشی تهران
- ۳- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشگاه تربیت مدرس PhD ایمونولوژی - استاد دانشگاه تربیت مدرس
- ۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۶- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۷- کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
- ۸- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه پیوند
- ۹- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه پیوند
- ۱۰- کارشناس علوم آزمایشگاهی - آزمایشگاه پیوند
- ۱۱- کارشناس پرستاری - بیمارستان امام خمینی

۴۵۶

جهش JAK1homology JAK 1 (JH1) و یک دومین سودوکینازی (JH2) می‌باشد. در اثر موتاسیون در ژن JAK2 (Autoinhibitory) خاصیت خود مهارکنندگی (Autoinhibitory) دومین JH2 را کنندگی می‌کند را از دست کنندگی از فسفریلاسیون گیرنده جلوگیری می‌کند را از دست داده و باعث فعال شدن خودبخودی این تیروزین کیناز می‌شود که این تغییر با نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو همراه خواهد بود(۸-۱۰). مشاهده شده است جهش در ژن JAK2 منجر به افزایش حساسیت به سیتوکاین و ایجاد اریتروسیتوز در مدل موشی می‌گردد(۱۱).

ژن JAK2 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ قرار داشته و شامل ۲۵ اگزون است که جهش مذکور در اگزون ۱۲ اتفاق می‌افتد. در اثر این جهش، نوکلئوتید گوانین در جایگاه نوکلئوتیدی شماره ۱۸۴۹ به تیمین تغییر یافته و در نتیجه اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه شماره ۶۱۷ جایگزین والین می‌شود و از این رو جهش حاصل را V617F می‌گویند(۱۲). در حال حاضر اعتقاد بر این است که تمامی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، حاصل تغییر در سلول بنیادی بوده و اختلاف فنتوتبی آن‌ها به تفاوت در انتقال پیام که ناشی از جهش‌های ایجاد شده در تیروزین کینازها یا مولکول‌های مرتبط است، مربوط می‌باشد(۱۳). ارتباط موتاسیون V617F با نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو از جمله PV، ET و PMF اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط پنج گروه تحقیقاتی گزارش شد(۱۴-۱۸). به دنبال این گزارش گروه‌های دیگر در کشورهای مختلف این جهش را در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو و نئوپلاسم‌های خونی دیگر مورد ارزیابی قرار دادند. با توجه به عدم وجود گزارش در مورد فراوانی جهش ژن JAK2 در کشورمان، مطالعه حاضر بر روی بیماران ایرانی مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو انجام شد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این پژوهش با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، تعداد ۱۰۰ بیمار مبتلا به پلی سیتمی ورا، میلوفیبروز اولیه و ترمبوسیتمی اولیه با تشخیص جدید و یا در حال درمان مراجعت کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان امام خمینی و مطب برخی

در طبقه‌بندی جدیدی که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ برای بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (CMPDs) گزارش نموده است، واژه «نئوپلاسم» به جای «بیماری» به کار رفته و «نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPNs)» جایگزین بیماری‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (CMPDs) شده است. در این طبقه‌بندی، نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو شامل لوسمی میلوژنوس مزمن (CML)، پلی سیتمی ورا (PV)، میلوفیبروز اولیه (PMF)، لوسمی نوتروفیلی مزمن، لوسمی اثرزینوفیلی مزمن، سندروم هایپر اثرزینوفیلی، بیماری ماست سل و بدخیمی‌های طبقه‌بندی نشده وجود دارند(۱).

MPNs بدخیمی‌های کلونال خونی هستند که در اثر اختلال در سلول استم سل خونساز ایجاد می‌گردند. این با افزایش تولید سلول‌های خونی همراه است که عموماً یک رده به صورت غالب افزایش می‌یابد. هنوز پاتوزن مولکولی این بدخیمی‌ها به طور کامل مشخص نشده است(۲،۳).

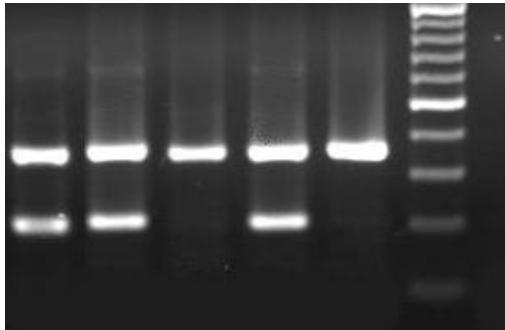
در بررسی‌های انجام شده بر روی بیماران پلی سیتمی ورا، گزارش شده که سلول‌های پیش‌ساز اریتروؤیدی در عدم حضور اریتروپوئیتین در محیط کشت، کلینی تشکیل می‌دهند. بعد از آن نیز محققان مشاهده نمودند که پیش‌سازهای اریتروؤیدی و میلوؤیدی در بیماران PV، ET و PMF، به تعدادی از فاکتورهای رشد خونی حساسیت بالایی را نشان می‌دهند(۴،۳). با توجه به مشاهدات فوق به نظر می‌رسد ناهنجاری اولیه ناشی از اختلال در انتقال پیام توسط گیرنده‌های فاکتورهای رشد باشد(۵،۶).

یک تیروزین کیناز Janus Kinase 2 (JAK2) سیتوپلاسمی است که نقش مهمی در انتقال پیام فاکتورهای رشد حاصل از چندین گیرنده خونساز از جمله اریتروپوئیتین، ترمبوپوئیتین، فاکتور رشد کلینی گرانولوسیتی - گرانولوسیتی (G-CSF) و فاکتور رشد کلینی گرانولوسیتی - مونوسیتی (GM-CSF) را به عهده دارد(۷،۸). این تیروزین کیناز دارای یک دومین تیروزین کینازی فعال

شامل می شد(جدول ۱). آغازگرهای J1 و J3 محصول ۳۶۴ bp (آل های موتان و wild-type) و آغازگرهای J2 و J3 محصول ۲۰۳ bp را، زمانی که بیمار دارای جهش JAK2-V617F بود تکثیر می کردند. دمای این محصولات مورد استفاده جهت تکثیر ژن JAK2 در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده جهت شناسایی جهش JAK2 V617F

Reverse (J1):
5-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTCA-3
Forward (Specific) (J2):
5-AGCATTGGTTAAATTATGGAGTATATT-3
Forward (Internal control) (J3):
5-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3



شکل ۱: نتایج شناسایی جهش JAK2 V617F به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آل انتخابی:

باند ۳۶۴ bp مربوط به آل wild-type و جهش دار و باند ۲۰۳ bp مربوط به آل موتان است. به دلیل هتروزیگوت بودن تمام موارد جهش دار، دو باند مشاهده می‌گردد، که یکی مربوط به آل جهش دار و دیگری آل wild type است. فرد فاقد جهش هموزیگوت و فقط یک باند ۳۶۴ bp مشاهده می‌شود.

ستون ۱ و ۲: بیماران دارای جهش، ستون ۳: بیمار فاقد جهش، ستون ۴: کنترل مثبت، ستون ۵: کنترل منفی (نمونه فرد سالم، SM)، سایز مارکر، MM ۱۰۰ bp: کنترل منفی (فاقد DNA).

بعد از انجام PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد(سیگما، آلمان) با بافر TBE (Tris Borate EDTA) (Buffer) انجام شد و وجود یا عدم وجود جهش بر اساس باندهای مشاهده شده تعیین گردید. وجود یک باند ۳۶۴ bp نمایانگر عدم وجود جهش(wild type) و وجود باند ۳۶۴ و باند ۲۰۳ bp نمایانگر وجود جهش(mutant) از

پژوهشکان فوق تخصص خون و انکولوژی تهران از نظر جهش JAK2 بررسی شدند. تشخیص بیماری بر اساس یافته‌های بالینی، آسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان، رنگ‌آمیزی سیتوشیمی و معیارهای تشخیصی استاندارد این بیماری‌ها انجام شده بود. بیماران شامل ۴۴ بیمار پلی‌سیتیمی ورا، ۳۱ بیمار میلووفیروز اولیه و ۲۵ بیمار ترومبوسیتیمی اولیه بودند. ۶۰ بیمار (۶۰٪) مونث و ۴۰ بیمار (۴۰٪) مذکر بودند. میانگین سنی کل بیماران ۴۴ ± ۱۷ سال با حداقل سنی ۲۷ سال و حداکثر ۸۹ سال بود.

استخراج DNA:

مقدار ۲ میلی لیتر خون محیطی بیماران با ضد انعقاد ۰/۵ مولار جمع‌آوری گردید. لایه مربوط به گلوبول‌های سفید(بافی کوت) از نمونه‌های جمع‌آوری شده جدا و آن‌ها با استفاده از کیت استخراج (High pure DNA) با استخراج شده، مراحل کنترل کیفی که از کیفیت DNA استخراج شده، مراحل کنترل کیفی که شامل تعیین غلظت DNA، درجه خلوص (OD ۲۶۰/۲۸۰)، الکتروفورز ژل آگاروز و انجام PCR با آغازگرهای ژن β گلوبین بود انجام شد.

آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آل انتخابی (*Allele Specific PCR*):

برای تکثیر ژن JAK2 از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای انتخابی آل (–) و (+) (PCR) و به روش چند تایی (Multiplex) استفاده شد(۱۴). واکنش PCR بعد از بهینه‌سازی، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در ۳۵ چرخه انجام شد. برای هر واکنش از dNTP به غلظت ۲۰۰ میکرومول، کلرور منیزیم به غلظت ۱/۵ میلی مول، آغازگر J1 به غلظت ۱۰-۲۰ پیکومول و آغازگرهای J2 و J3 هر کدام به غلظت ۱۰-۱۵ پیکومول به همراه ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA استفاده گردید.

آغازگرهای استفاده شده برای هر واکنش PCR انجام شده، ۲ عدد آغازگر جلوبرنده که یکی انتخابی موتان(J2)، دیگری به عنوان کنترل داخلی(J3) و یک عدد آغازگر عقب برنده که انتخابی wild type (J1) را

واکنش هضم آنزیمی به وسیله آنزیم محدودالاثر (RFLP): جهت تایید نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی، آزمایش RFLP بر روی محصول PCR انجام شد. برای انجام آزمایش RFLP ابتدا یک واکنش مشابه واکنش قبلی انجام شد با این تفاوت که آغازگرهای J1 و J3 و دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به کار گرفته شد. محصول واکنش PCR یک قطعه ۳۶۴ bp بود که با اثر آنزیم محدودالاژر BsaXI (بیولب، انگلستان) هضم آنزیمی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. سپس محصول واکنش بر روی ژل آکاروز ۱/۵ درصد با بافر TBE الکتروفورز شد. آلل wild-type دارای ناحیه برش برای آنزیم BsaXI می‌باشد و دو قطعه ۲۰۳ و ۱۶۱ در اثر برش ایجاد می‌شود، اما آلل موتان که دارای جایگایی باز آلى G با T نبود جایگاه برش آنزیمی نداشت و به صورت هضم نشده باقی ماند (شکل ۲).

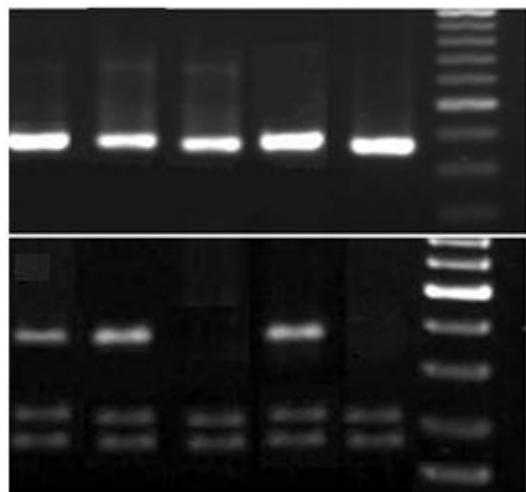
یافته‌ها

بیماران مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو در این مطالعه از نظر وجود جهش JAK2 V617F مورد بررسی قرار گرفتند. ۷۲٪ (۶۱–۸۳٪) (CI:٪ ۹۵ = ۶۱–۸۳٪) بیماران مبتلا به نوپلاسم‌های میلوئیدی مورد بررسی، دارای جهش بودند. از این میان، ۸۹٪ (٪ ۹۵ = ٪ ۸۸–۱۰۰٪) (CI:٪ ۹۵ = ٪ ۸۸–۱۰۰٪) بیماران پلی‌سیتیمی اولیه (٪ ۴۴ = ٪ ۶۱–۱۰۰٪) (CI:٪ ۹۵ = ٪ ۶۱–۱۰۰٪) میلوفیبروز ایدیوباتیک (٪ ۳۱ = ٪ ۳۱–۱۰۰٪) (CI:٪ ۹۵ = ٪ ۳۱–۱۰۰٪) ترمبوسیتیمی اولیه (٪ ۲۵ = ٪ ۱۴–۲۵٪) (CI:٪ ۹۵ = ٪ ۱۴–۲۵٪) بودند.

جدول ۳: درصد فراوانی جهش JAK2 V617F در بیماران مبتلا به نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو و به تفکیک نوع بیماری

جهش منفی	جهش مثبت	نوع بیماری
۱۱(۵/۴۴)	۸۹(۳۹/۴۴)	پلی‌سیتیمی و را
۳۹(۱۲/۳۱)	۶۱(۱۹/۳۱)	میلوفیبروز ایدیوباتیک
۴۴(۱۱/۲۵)	۵۶(۱۴/۲۵)	ترومبوسیتیمی اولیه
۲۸(۲۸/۱۰۰)	۷۲(۷۲/۱۰۰)	مجموع بیماران
۸/۲۰	۳۲/۴۰	مرد به زن
۵۲ ± ۱۷	۵۸ ± ۱۵	سن(سال)، میانگین ± انحراف معیار

نوع هتروزیگوت بود (شکل ۱).



شکل ۲: نتایج شناسایی جهش JAK2 V617F به روش واکنش هضم آنزیمی بوسیله آنزیم BsaXI

الف: نتایج PCR با استفاده از دو آغازگر J1 و J3 است. در همه نمونه‌های باند ۳۶۴ bp محصول دو آغازگر J1 و J3 است. در همه نمونه‌های دارای جهش و فاقد جهش یک باند ۳۶۴ bp تکیه شد.

ب: نتایج واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالاژر BsaXI است. آلل wild-type دارای ناحیه برش برای این آنزیم است و دو قطعه ۱۶۱ و ۲۰۳ bp ایجاد می‌شود اما آلل موتان محل برش ندارد. نمونه‌های جهش دار چون هتروزیگوت هستند، قطعه ۳۶۴ bp که مربوط به آلل موتان است به صورت هضم نشده باقی می‌ماند و قطعه مربوط به آلل wild type برش می‌خورد. درنتیجه ۳ باند ۳۶۴، ۱۶۱ و ۲۰۳ bp در این افراد دیده می‌شود. اما در فرد فاقد جهش هر دو آلل برش می‌خورد و تمام محصول چهار هضم آنزیمی می‌شود.

ستون ۱ و ۲: بیماران دارای جهش، ستون ۳: بیمار فاقد جهش،

ستون ۴: کنترل مثبت، ستون ۵: نمونه کنترل منفی (فرد سالم)، SM: سایز مارکر ۱۰۰ bp، MM: کنترل منفی (فاقد DNA)

جدول ۲: دمایهای مورد استفاده در واکنش زنجیره پلی‌مراز جهش شناسایی جهش JAK2 V617F

مراحل	زمان	دما (°C)
واسرشه‌سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۴
واسرشه‌سازی	۳۰ ثانیه	۹۴
اتصال	۴۵ ثانیه	۵۸
توسعه	۳۰ دقیقه	۷۲
توسعه نهایی	۵ دقیقه	۷۲

میزان جهش در بیماران PV، ۶۵ درصد، در بیماران ET، ۲۳ درصد و در بیماران PMF، ۵۷ درصد گزارش شد(۱۶). جیمز و همکاران، میزان موتاسیون در بیماران PV را ۸۸ درصد و در بیماران ET و ۴۳ PMF درصد گزارش نمودند(۱۵).

پاسامونتی و همکاران با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی، میزان جهش را در ۹۲ درصد بیماران PV، ۷۲ درصد بیماران PMF و ۵۳ درصد بیماران ET گزارش نمودند(۱۹).

به طور کلی در مطالعاتی که در کشورهای مختلف انجام شده است، میزان جهش V617F در بیماران PV بین ۶۵ تا ۹۷ درصد، ۳۵ PMF تا ۵۷ درصد و ۲۳ ET تا ۵۷ درصد گزارش شده است(۱۹، ۱۸، ۱۴).

اختلاف در میزان گزارش‌ها، احتمالاً به دلیل اختلاف در معیارهای تشخیص نئوپلاسم‌های ذکر شده از یک طرف و نوع روش به کار گرفته شده و حساسیت روش از طرف دیگر می‌باشد. هم چنین در مقایسه روش کمی با روش کیفی، شناسایی موتاسیون مشاهده می‌شود که ممکن است درمان بر روی میزان آلل موتان(Mutation allele burden) تاثیر بگذارد و باعث نتایج منفی کاذب گردد(۲۰، ۲۱). لوبن و همکاران گزارش کردند، زمانی که از یک روش PCR کمی حساس استفاده می‌شود، میزان جهش در بیماران PV تا ۹۹ درصد افزایش می‌یابد. از طرفی برخی بیماران ET نیز که با روش تعیین توالی جهش را نشان ندادند، بعد از انجام PCR با روش کمی مثبت شدند و درصد جهش در این بیماران به ۷۲ درصد رسید، که این موضوع با مطالعه‌های دیگر نیز تایید شد(۲۲، ۱۷).

گروه‌های تحقیقاتی مختلف این جهش را در بیماری‌های خونی دیگر از جمله ۲۰ درصد مجموع نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو از قبیل بیماری ماست سل، سندروم هایپرائوزینوفیلی، لوسمی نوتروفیلیک مزمون، لوسمی میلومنوسیتی مزمون و لوسمی میلومنوسیتی جوانان و ۳ درصد موارد لوسمی میلوئیدی حاد و سندروم میلودیسپلاستیک گزارش نموده‌اند. اما در هیچ کدام از بدخیمی‌های غیر خونی و بدخیمی‌های خونی غیر میلوئیدی مانند لوسمی لنفوئیدی حاد و مزمون، لنفوم

میانگین سنی ± انحراف معیار بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های مورد مطالعه که دارای این جهش بودند، ۱۵ ± ۵۸ سال و میانگین سنی ± انحراف معیار بیماران فاقد جهش ۱۷ ± ۵۲ سال بود.

با وجودی که سن بیماران دارای جهش در مجموع بیماری‌ها و به تفکیک نوع بیماری بیشتر از بیماران فاقد جهش بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. ضمناً میزان بروز جهش در مجموع بیماران زن بیشتر از مرد بود، اما این تفاوت نیز معنی‌دار نبود(جدول ۳).

جهت تحلیل نتایج از آزمون کایدو و محاسبه درصد فراوانی، میانگین و انحراف معیار از نرم‌افزار SPSS ۱۵ استفاده شد.

بحث

در این مطالعه با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آلل اختصاصی، موتاسیون V617F JAK2 بررسی شد و با روش RFLP نتایج حاصل از PCR تایید گردید. نتایجی که از این مطالعه به دست آمد نشان داد که موتاسیون V617F JAK2 را می‌توان در ۸۹ درصد بیماران مبتلا به PV، ۶۱ درصد بیماران MF و ۶۵ درصد بیماران ET مشاهده نمود.

به طور کلی این موتاسیون در ۷۲ درصد کل مبتلایان به این سه نوع MPNs وجود دارد که فراوانی این جهش تقریباً مشابه موارد گزارش شده از دیگر کشورهای است. با وجود این که میزان جهش در زنان بیمار بیشتر از مردان بود، اما این ارتباط معنی‌دار نبود، هم چنین میانه سنی افراد دارای جهش مشت بیشتر از افراد جهش منفی بود اما این اختلاف نیز معنی‌دار نبود.

در تحقیقی که توسط باکستر و همکاران اولین بار در سال ۲۰۰۵ انجام شد، میزان جهش در بیماران با استفاده از مقایسه دو روش PCR اختصاصی آلل (Allele-specific PCR) و تعیین توالی(Sequencings)، در پلی‌سیتی‌ورا بین ۹۳ تا ۱۰۰ درصد(به طور متوسط ۹۷ درصد)، در بیماران IMF بین ۲۶ تا ۷۴ درصد(به طور متوسط ۵۰ درصد) و در بیماران ET ۴۳ تا ۷۰ درصد(به طور متوسط ۵۷ درصد) به دست آمد(۱۴).

در پژوهش دیگری که توسط کرالودیک انجام شد،

تشخیصی، به تشخیص قطعی و تعیین کلونال بودن آن کمک می‌نماید (۲۴، ۲۵). لازم است در مواردی که بیمار دارای برخی علایم مانند ترومبوسیتوز، گرانولوسیتوز، فیبروز مغز استخوان، اسپلنومگالی بدون دلیل مشخص می‌باشد و مشکوک به یکی از بیماری‌های میلوپرولیفراتیو است، جهش V617F JAK2 مورد بررسی قرار گیرد. باید توجه داشت که مثبت بودن جهش JAK2 وجود یک نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو را نشان می‌دهد اما منفی شدن آن وجود بیماری را رد نمی‌کند. علاوه بر تشخیص، مطالعه‌های انجام شده بیانگر ارتباط این موتاسیون با پیش آگهی بیماری است و بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده است بیمارانی که دارای این موتاسیون هستند دارای هموگلوبین، هماتوکریت، شمارش پلاکت بالاتر هستند و اسپلنومگالی نیز در آن‌ها بیشتر است. هم چنین احتمال ترمبوز و همورازی در آن‌ها شایع‌تر بوده، اگر چه در این مورد نظریه‌های مختلفی وجود دارد (۹، ۲۶).

شناسایی جهش در ژن JAK2 در ایجاد طبقه‌بندی جدید برای بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو نقش داشته است. در طبقه‌بندی جدید سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ تعیین جهش V617F JAK2 به عنوان یک معیار اساسی به همراه ارزیابی ژن Bcr-Abl برای تشخیص نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مطرح گردیده است و با توجه به فراوانی بالای آن در نئوپلاسم‌های ذکر شده، کمک می‌کند از دیگر لوسومی‌های میلوژنیک مزمن مانند لوسومی میلومنوسیتیک مزمن، لوسومی میلومنوسیتیک جوانان و لوسومی میلوئیدی آتیبیک و هم چنین از سندروم میلودیسپلاستیک (MDS) جدا گردد (۱، ۳۶).

برخی محققین معتقدند می‌توان برای درمان نئوپلاسم‌های ذکر شده مهار کننده‌های پروتئین کینازی تهیه نمود تا با مهار جهش JAK2، بیماری را درمان نمود و برای رسیدن به این هدف نیاز به مطالعه بیشتر برای درک بهتر مکانیسم نئوپلاسم وجود دارد تا بتوان به درمان اختصاصی‌تری برای آن‌ها دست یافت (۱۹، ۳۷).

با توجه به این که جهش ژن JAK2 تنها در حدود ۵۰ درصد موارد PMF و ET وجود دارد و نیز نبود روش استاندارد شده برای شناسایی آن در دنیا و همچنین

هوچکین و غیر هوچکین و همین طور موارد تکثیر، واکنشی گزارش نشده است (۲۳-۳۳).

جهش در ژن JAK2 می‌تواند به صورت هتروزیگوت و هموزیگوت باشد اما به منظور جداسازی این دو از هم، توصیه بر این است که ابتدا گرانولوسیت‌ها از خون محیطی جدا شوند و تعیین جهش بر روی DNA جدا شده از گرانولوسیت انجام گیرد. با توجه به این که در مطالعه حاضر صرفاً از بافی کوت استفاده شد، به دلیل همراه شدن لغفوسیت‌ها که قادر جهش می‌باشند افتراق هتروزیگوت و هموزیگوت امکان‌پذیر نبود. مطالعه‌ها نشان داده است هموزیگوسیتی در این بیماران به نوترکیبی میتوتیک کروموزوم $LOH = 9$ (Loss Of Heterozygosity) مربوط می‌شود. با مطالعه بر روی گرانولوسیت‌های جدا شده از بیماران MPNs، هموزیگوسیتی در PV بیشتر از بقیه نئوپلاسم‌ها مشاهده شده و تا ۳۰ درصد موارد PV جهش مثبت را در برمی‌گیرد (۳۴، ۳۵).

با توجه به این که با معاینه‌های بالینی و تعیین برخی پارامترهای آزمایشگاهی مانند هموگلوبین، هماتوکریت، شمارش پلاکت، توده گلوبول قرمز (Red Cell Mass) و غیره و برخی روش‌های دیگر مانند هیستولوژی مغز استخوان که به طور روتین صورت می‌گیرد، نمی‌توان تمام موارد پلی‌سیتیمی (اولیه، ثانویه و فامیلی) و نیز انواع ترمبوزیتی را از هم افتراق داد، لذا استفاده از شناسایی جهش V617F ژن JAK2 به منظور افتراق پلی‌سیتیمی اولیه از سایر موارد پلی‌سیتیمی و نیز ET از موارد واکنشی بسیار سودمند است. گاهی ممکن است در این بیماران به دلیل بزرگ شدن طحال، میزان پلاکت‌های به دام افتاده در آن باعث کاهش پلاکت خون به طور کاذب و از طرفی افزایش نسبی میزان پلاسمای خون و کاهش هماتوکریت به صورت کاذب شود و در نتیجه باعث ایجاد خطأ در تشخیص گردد که در این گونه موارد بررسی جهش ژن JAK2 بسیار کمک کننده است (۱).

به دلیل درصد فراوانی بالای این جهش به خصوص در PV، شناسایی جهش JAK2 راه ساده و دقیقی است که وجود یک بیماری کلونال را اثبات می‌کند و در یک بیمار مشکوک به این نئوپلاسم‌ها در کنار سایر پارامترهای

برای بیماران پالی سیتیمی و را، ترموبوسیتیمی اولیه و میلوفیروز اولیه با دیگر کشورهای جهان، استفاده از این آزمایش در تشخیص نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو امری ضروری بوده و قابلیت شناسایی موارد کلونال از خوش‌خیم را فراهم می‌سازد. در ضمن با توجه به اهمیت این جهش در پیش‌آگهی و انتخاب روش درمانی، ضرورت امر باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

در خاتمه لازم می‌دانیم از آقایان دکتر صفائی و امیری، کارکنان بخش خون و انکولوژی بیمارستان امام خمینی و کارکنان محترم آزمایشگاه پیوند تشکر نماییم.

References :

- 1- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia Research 2008; 22:14-22.
- 2- Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2V617F: When to order the test and how to interpret the results. Leukemia Research 2006; 30: 739-744.
- 3- Li Y, Hetet G, Maurer AM, Chait Y, Dhermy D, Briere J. Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. Br J Haematol 1994; 87:471-76.
- 4- Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. Blood 2000; 96:3310-21.
- 5- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. Blood 2006; 108:1377-1380.
- 6- Hinselwood S, Bench AJ, Green AR. Pathogenesis of polycythaemia vera. Blood Rev 1997; 11:224-32.
- 7- Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MGJ. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. Mol Cell Biol 2004; 24:4968-4978.
- 8- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. Blood 2005; 106:3374-3376.
- 9- McLornan D, Percy M, McMullin M. JAK2V617F : A single Mutation in the myeloproliferative group of disorderss. Ulser Med 2006; 75:112-119.
- 10- Tefferi A. JAK2 Mutations in Polycythemia Vera, Molecular Mechanisms and Clinical Applications. New England J of Medicine 2005; 356:444-445.
- 11- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Moreau Gachelin F, Vainchenker W, Villeval JL, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 2006; 108:1652-1660.
- 12- Berger R. A recurrent mutation of the JAK2 gene in chronic myeloproliferative disorders. Pathologie Biologie 2006; 54:182-184.
- 13- Pivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. Semin Hematol 2004; 41: Suppl 3.
- 14- Baxter E.J, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases. Lancet 2005; 365:1054-1061.
- 15- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005; 352:1779-1790.
- 16- James C, Ugo V, Le Couedic JP. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434:1144-1148.
- 17- Levine R, Wadleigh M, Cools J, Ebert B.J, Werning G, HuntlyB.J.P., et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005; 7:387-397.
- 18- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia vera. J Biol Chem 2005; 280:22788-22792.
- 19- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34- positive cells into

شناسایی جهش‌های جدید در اگزون ۱۲ ، این ژن در بیماران PV و جهش‌های دیگری علاوه بر جهش ژن JAK در این نوپلاسم‌ها، باعث شده شناسایی این جهش به عنوان تنها آزمون تشخیص این نوپلاسم‌ها نباشد و تعیین جهش JAK2 V617F در کنار سایر آزمایش‌ها از جمله اریتروپوئیتین، معزز استخوان و تعیین وجود بیان فیوژن ژن Bcr-Abl جهت تشخیص نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو به کار رود(۳۸، ۳۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به فراهم شدن آزمایش مولکولی جهت شناسایی جهش JAK2 و آمار قابل مقایسه جهش این ژن

- peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:3377–9.
- 20- Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K. Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood* 2006; 107:3339–3341.
- 21- Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 108:2037–2040.
- 22- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108:1865–7.
- 23- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2162–8.
- 24- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S. JAK2 mutation 1849G > T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005; 106:3370–3.
- 25- Johan MF, Goodeve AC, Bowen DT, Frew ME, Reilly JT. JAK2 V617F mutation is uncommon in chronic myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 130:968.
- 26- Tono C, Xu G, Toki T, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, et al. Jak2 Val617Phe activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19:1843–4.
- 27- Steensma DP, McClure RF, Karp JE, Tefferi A, Lasho TL, Powell HL, et al. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006; 20:971–978.
- 28- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both ‘atypical’ myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207–1209.
- 29- Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2920–1.
- 30- Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 130:964–72.
- 31- McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006; 20:168–71.
- 32- Melzner J, Weniger MA, Menz CK, Moller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 2006; 20:157–8.
- 33- Tefferi A, Vardiman JW. The diagnostic interface between histology and molecular tests in myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:115–122.
- 34- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2(V617F) in polycythemia vera. *Cancer* 2006; 106:631–5.
- 35- Stauffer Larsen T, Hasselbalch H.C, Pallisgaard N Kerndrup G.B. A der (18)(9;18)(p13;p11) and a der(9;18)(p10;q10) in polycythemia vera associated with a hyperproliferative phenotype in transformation to postpolycythemic myelofibrosis *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007; 172:107–112.
- 36- Prchal JT. The amount of JAK2 617V>F matters. *Blood* 2007; 110:796–797.
- 37- Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105:22–30.
- 38- Scott L.M, Tong W, Levine RL, Scott M.A, Beer P.A, Stratton M.R, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356:459–68.
- 39- Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87:1–10

Evaluation of JAK2 V617F mutation in Iranian patients with non-CML myeloproliferative neoplasms

Poopak B.¹(PhD), Mirmongereh H.²(MS), Pourfathollah A.A.²(PhD), Sharifian R.A.³(MD), Rezvani H.⁴(MD), Elahi F.³(MD), Keyhani M.³(MD), Ghedyani M.⁴(MD), Kaviani S.²(PhD), Farahani K.¹(BS), Yousefian A.⁷(MS), Jahangir pour M.A.⁵(BS), Shamsian M.A.⁶(BS)

¹Tehran Medical Unit, Islamic Azad University, Iran

²Hematology and Blood Banking Department , Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

³Blood and Oncology Department, Tehran University of Medical Sciences, Iran

⁴Blood and Oncology Department, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Payvand Laboratory, Tehran, Iran

⁶Blood and Oncology Unit, Imam Khomeini Hospital,Tehran, Iran

⁷Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Somatic point mutation in JAK2 gene is characterized by G to T transversion at nucleotide 1849 in exon 12 in the JAK2 gene and results in autonomous activation of JAK2 protein. JAK2 mutation leads to independent cytokine signaling and clonal proliferation of hematopoietic cells in MPNs. Due to absence of any reports for JAK2 V617F mutation in Iranian MPNs patients and its important role in diagnosis, we decided to carry out this study.

Materials and Methods

In this experimental study, we evaluated JAK2 mutation in 100 MPNs patients with diagnosis of PV (n=44), PMF (n=31) and ET(n=25) by simple randomized sampling. After extraction of genomic DNA from whole blood buffy coat, detection of mutation was done using allele specific PCR. Agarose gel electrophoresis was used for observation of PCR products. For confirmation of results, PCR-RFLP using BsaXI was applied.

Results

Using allele specific PCR and PCR-RFLP, frequency of JAK2 V617F mutation was evaluated to be 89%, 61%, and 56% in PV, PMF and ET, respectively.

Conclusions

Frequency of JAK2 mutation in our study is compatible with previous reports. According to WHO criteria, allele specific PCR can be applied for detection of JAK2 mutation in Iranian patients with diagnosis of MPNs.

Key words: JAK2, Protein Tyrosine Kinase, Polymerase Chain Reaction, Mutation, Neoplasms
SJIBTO 2009; 5(4): 237-245

Received: 16 June 2008

Accepted: 14 Jan 2009

Correspondence: Poopak B., PhD of Hematology. Assistant Professor of Tehran Medical Unit, Islamic Azad University.
P.O.Box: 15101816413, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22257438; Fax : (+9821) 22257438
E-mail: bpoopak@yahoo.com