بررسی اپیدیمولوژی جهش های شایع اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در بیماران مبتلا به اریتروسیتوز با علت نامشخص

حسین آیت اللهی[۱]، محی الدین برزگر[۲]، دکتر حسین رحیمی[۳]، مریم شیخی[۴]، علی‌رضا خیابانی[۴*]

۱. فلوشیپ پاتولوژی مولکولی- استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲. کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون-مربی آموزشی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۳. فوق تخصص هماتولوژی-دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴. کارشناس ارشد - مرکز تحقیقات مولکولی سرطان دانشگاه علوم پزشکی مشهد

***نویسنده مسئول:** علی رضا خیابانی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز پاتولوژی مولکولی سرطان، گروه آموزشی خون‌شناسی و بانک خون

شماره تماس: ۰۹۱۵۸۳۳۵۱۱۹

تاریخ دریافت مقاله۱۳۹۴/۳/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه اریتروسیتوز اولیه به دلیل نقص در سلول‌های مادر خون‌ساز اتفاق می‌افتد و این سلول‌ها به اریتروپویتین حساس می‌شوند. شناخته شده‌ترین نقص اکتسابی جهش JAK2V617F است که در ۹۵ درصد موارد پلی سایتمی ورا دیده می‌شود. این جهش در اگزون ۱۴ پروتئین JAK2 اتفاق می‌افتد. جهش های دیگری که با اریتروسیتوز همراه است جهش در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 است که تعداد این جهش‌ها نسبتاً زیاد است. ما در این مطالعه شیوع چهار جهش شایع اگزون ۱۲ را در بیماران مبتلابه اریتروسیتوز شهر مشهد می‌سنجیم.

مواد و روش‌ها: ۱۴۶ بیمار مبتلابه اریتروسیتوز در یک بررسی مقطعی مورد مطالعه قرار گرفتند. DNA بیماران ازنظر جهش‌های H538-QK539L،F537K539delinsL ، K539L و N542-E543del با استفاده از روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. برای آشکاری سازی محصولات PCR از ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران ۱۹.۷۹±۳۶ سال و میانگین سنی بیماران بدون جهش ۱۸.۸۸±۴۴.۶۲سال بود. بر اساس نتایج این مطالعه از بین چهار جهش مورد بررسی اگزون ۱۲ پروتئین JAK2، تنها جهش N542-E543del در ۲ بیمار (یک مرد و یک زن) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده از این مطالعه مشخص شد که جهش در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در بیماران مبتلا به اریتروسیتوز بدون علت شایع نیست. با توجه به شیوع کم این جهش در مطالعه‌ی ما، جهت ارائه گزارش جامع تر از شیوع این جهش در بیماران اریتروسیتوز بدون علت پیشنهاد می شود که مطالعاتی با حجم نمونه بیشتر انجام و یا از روش توالی یابی DNA به جای ARMS-PCR استفاده شود.

کلمات کلیدي: اریتروسیتوز بدون علت، جهش های اگزون۱۲ JAK2، ARMS-PCR

مقدمه

اریتروسیتوز نامشخص یک اختلال نادر با افزایش هموگلوبین و هماتوکریت مشخص می‌شود(۱). برخلاف پلی سایتمی ورا در این بیماری تعداد گلبول سفید و پلاکت‌ها افزایش نمی‌یابد(۲). سطح اریتروپویتین سرم در بیماران مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص متغیر است(۳). بیماران مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص به دو گروه اریتروسیتوز اولیه و ثانویه تقسیم‌بندی می‌شوند: در اریتروسیتوز اولیه سطح اریتروپویتین سرم نرمال بوده اما در اریتروسیتوز ثانویه سطح اریتروپویتین سرم نرمال یا افزایش نشان می دهد(۳). نقص در سلول‌های خون‌ساز مادر موجب اریتروسیتوز اولیه می‌شود. جهش JAK2V617F، جهش در پروتئین LNK و جهش در گیرنده اریتروپویتین نمونه هایی از اریتروسیتوز اولیه می باشند(۴). در اریتروسیتوز ثانویه، نقص در حسگر های اکسیژن دیده می شود(۵, ۶).

خانواده جانوس کیناز دارای چهار عضو (JAK1، JAK2، Jak3 و TYk) است(۷-۹). پروتئین‌های جانوس کیناز جزء تیروزین کیناز های بدون گیرنده ای هستند که به همراه پروتئین انتقال دهنده پیام درون سلولی STAT1 نقش مهمی را در پیام رسانی درون سلولی برعهده دارند(۱۰). پروتئین JAK2 محکم به دنباله ی سیتوپلاسمی گیرنده های مختلف سایتوکاینی مانند فاکتور رشد، لپتین و اریتروپویتین متصل است(۱۱). JAK2V617F یک جهش نقطه‌ای است که موجب جایگزینی والین با فنیل آلالین در رمز ۶۱۷ اگزون ۱۴ پروتئین JAK2 می‌شود(۱۱). این جهش در دومین غیر عملکردی JAK2 اتفاق می‌افتد؛ و با حساسیت زیاد سلول‌های خون‌ساز به اریتروپویتین همراه است(۵). پروتئین های SOSC2 و CBL3 با روش یوبی کوئیتینه شدن پروتئین JAK2 را تجزیه نموده و از ادامه پیام‌رسانی جلوگیری می‌کنند(۵). جهش JAK2V617F پروتئین JAK2 را نسبت به تجزیه شدن با پروتئین های SOSC و CBL مقاوم می‌کند(۱۲). جهش JAK2V617F در ۹۷ درصد بیماران مبتلابه پلی سایتمی ورا(۱۳)، ۳۰ تا ۶۰ درصد بیماران مبتلابه ترومبو سایتمی اساسی(۱۴) و ۳۵ تا ۵۷ درصد بیماران مبتلابه میلو فیبروز نامشخص دیده می‌شود(۱۵). این جهش در بیماران مبتلابه لنفوم هوچکین (۳۳٪)، لنفوم مدیاستن (۳۳٪)(۱۶)، لوسمی لنفوبلاستیک (۱۰٪)، لوسمی حاد همراه با سندروم داون (۱۵٪)(۱۷)، لوسمی ائوزینوفیلی مزمن، لوسمی نوتروفیلی مزمن و اختلالات میلوپرولیفراتیو/میلودیس پلاستیک نیز دیده می‌شود(۱۸).

باوجود اینکه در اریتروسیتوز اولیه جهش JAK2V617F مشاهده می گردد، اما اکثر بیماران فاقد این جهش هستند(۲). این جهش در ۵ درصد بیماران مبتلابه پلی سایتمی ورا مشاهده نمی‌شود(۱۹, ۲۰). به این سبب اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در مرکز توجهات قرار گرفت. تا به امروز ۱۰ جهش مختلف در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 گزارش شده که با اریتروسیتوز و پلی سایتمی ورا همراه است(۲۱-۲۳). هدف از این مطالعه بررسی شیوع چهار جهش شایع اگزون ۱۲ در بیماران مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص در شهرستان مشهد است. شناخت علل بیماری در یافتن راهکار درمانی مناسب کمک کننده خواهد بود.

مواد و روش

در این بررسی مقطعی، تعداد ۱۴۶ بیمار مبتلابه اریتروسیتوز با علت نامشخص که بر اساس تشخیص پزشکان فوق تخصص خون و انکولوژی بر اساس یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی مبتلا به اریتروسیتوز بودند و به مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی بیمارستان قائم (عج) مراجعه نموده اند، ازنظر جهش‌های F537K539delinsL، H538-QK539L، K539L و N542-E543del در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 با استفاده از روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی همه ی بیماران ۱۸.۰۱±۴۴.۵۱ با حداقل سن ۵ و حداکثر سن ۸۶ بود. از این بین تعداد ۱۱۳ بیمار مرد و ۳۳ بیمار زن بودند. مراحل آزمایش توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد تائید قرار گرفت.

استخراج DNA

حدود ۲ میلی‌لیتر نمونه خون بیمار همراه با ضد انعقاد نیم مولار K2- EDTA در لوله‌های استریل جمع‌آوری گردید. DNA طبق پروتکل استخراج DNA از شرکت کیا ژن (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از اسپکتروفوتومتر نانو دراپ ۲۰۰۰ و ژل آگارز استفاده شد.

سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها

برای تکثیر اگزون ۱۲ ژن JAK2 از روش تکثیر متزلزل جهش‌ها با پرایمر های اختصاصی به روش چندتایی استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر و در ۳۵ چرخه و با دمای اتصال ۶۴ درجه انجام شد. پرایمر های اختصاصی جهش در

۱. Signal Transducers and Activators of Transcription
۲. Suppressors Of Cytokine Signaling
۳. Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogenes

جدول ۱ نشان داده‌شده است. هر واکنش شامل ۱ میکرو لیتر پرایمر اختصاصی K539L، ۱ میکرو لیتر پرایمر F537K539de-linsL ، یک میکرو لیتر پرایمر H538-QK539L، ۱ میکرو لیتر پرایمر N542-E543del، یک میکرو لیتر پرایمر جلوبرنده به‌عنوان کنترل داخلی و ۱ میکرو لیتر پرایمر عقب برنده برای حالت جهش نیافته (wild type) به همراه ۱۲ میکرو لیتر مستر میکس مالتی پلکس پی سی آر، ۶ میکرو لیتر آب مقطر ۲ بار استریل و ۱ میکرو لیتر DNA بیمار بود. بعد از انجام PCR، محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد (محصول شرکت سیگما، آلمان) و به همراه بافر TAE منتقل گردیده و وجود یا عدم وجود جهش به واسطه ی باندهای آشکارشده مشخص می‌شود. در شکل ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نشان داده شده است. باند های ۵۰۰bp مربوط به آلل جهش نیافته و باند ۶۰۰bp مربوط به آلل N542-E543del است. به دلیل هتروزیگوت بودن جهش N542-E543del دو باند مشاهده می‌شود (چاهک شماره ی ۸). برای تحلیل داده‌های دارای توزیع نرمال از آزمون Independent sample test و داده‌های دارای توزیع غیر نرمال از آزمون Mann-Whitney Test و نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد.

نتایج

۳۳ زن (۲۲.۶۰٪) و ۱۱۴ مرد (۸۷.۴۰٪) ازنظر وجود یا عدم وجود جهش‌های F537K539delinsL، H538-QK539L، K539L، N542-E543del اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 موردبررسی قرار گرفتند. میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه ۱۸.۰۱±۴۴.۵۱ بود. از بین چهار جهش موردبررسی تنها جهش N542-E543el در یک بیمار زن و یک بیمار مرد مشاهده شد. میانگین سنی بیماران دارای جهش ۱۹.۷۹±۳۶ سال و میانگین سنی بیماران فاقد جهش ۱۸.۸۸±۴۴.۶۲ سال بود. رابطه معناداری بین سن، جنس و اندکس ها و شیوع جهشN542-E543del مشاهده نشد (P>0.05).

بحث و نتیجه

تا به امروز چندین نقص مولکولی شناخته‌شده است که با اریتروسیتوز همراه بودند(۲). به‌عنوان‌نمونه جهش در ژن های PDH2، VHL،Epor و پروتئین JAK2. جهش در ژن VHL بیش‌ترین شیوع را در بین بیماران مبتلابه اریتروسیتوز دارد(۲). جهش در ژن های VHL و PDH2 با افزایش سطح اریتروپویتین سرم همراه است(۲۴). دلیل این امر اختلال در مسیر تولید اریتروپویتین و حسگرهای اکسیژن در کلیه است که موجب افزایش تولید اریتروپوئیتین و بروز اریتروسیتوز ثانویه می شود(۲۴). اریتروسیتوز اولیه ناشی از جهش در سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز است(۲۵). به‌عنوان‌نمونه می توان جهش در ژن پروتئین LNK و پروتئین JAK2 را نام برد(۴). در این بیماران مسیر تولید اریتروپویتین سالم بوده و میزان اریتروپویتین سرم نرمال یا کاهش‌یافته است(۲).

خانواده‌ی پروتئین های آنزیمی JAK، علاوه بر اینکه در ایمنی میزبان و بیماری های اتوایمیون نقش دارند، نقش مهمی در سرطان‌های خونی به عهده دارند(۲۶). شواهد اولیه‌از شناسایی فعال شدن پروتئین های خانواده JAK و STAT در بیماران مبتلابه سرطان، به دست آمد(۲۷, ۲۸). موتاسیون های JAK2 با نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو مرتبط است بطوریکه سرطان‌های کلونال از سلول‌های پیش ساز هماتوپوئتیک شامل پلی سیتمی ورا، تروبوسیتوپنی اساسی و میلوفیبروز اولیه نشات می گیرند(۲۹-۳۲). شایع‌ترین موتاسیون JAK2، V617F است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ شناسایی شد و در بیش از ۹۵٪ بیماران مبتلابه پلی سیتمی ورا (۱۳)، ۳۲ تا ۵۷٪ بیماران مبتلا به ترومبوسیتوپنی اساسی(۱۴) و ۵۰ درصد بیماران میلوفیبروز اولیه(۳۳) مشاهده می‌شود. همانند جهش JAK2V617F که در اگزون ۱۴ اتفاق می‌افتد جهش در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 با افزایش فعالیت پروتئین JAK2 همراه است. با توجه به اینکه جهش JAK2V617F در ۹۵٪ افراد پلی سایتمی ورا دیده می‌شود این احتمال وجود دارد که این جهش و جهش در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در افراد مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص نیز دیده شود(۳۴). بر همین اساس این مطالعه طراحی گردید تا شیوع این دو جهش در بیماران مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص در شهر مشهد مشخص شود.

در مطالعه حاضر از بین چهار جهشی که در اگزون ۱۲ مورد بررسی قرار گرفتند تنها جهش N542-E543del در دو بیمار (۱.۳٪) مشاهده شد. درمطالعه Melanie J. Percy که برروی ۱۸۱ بیمار مبتلا به اریتروسیتوز نامشخص انجام شد مشخص گردید که در ۵۸ بیمار سطح اریتروپوئیتین نرمال بوده یا کاهش پیدا کرده است. جهش در اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در (۸ مورد) ۲۷٪ افراد مشاهده شد. جهش N542-E543del ۵ مورد جهش‌ها را به خود اختصاص داده بود. در مطالعه ما تنها دو بیمار جهش N542-E543del داشتند. اما سایر جهش‌های اگزون ۱۲ که موردبررسی قرار گرفتند مشاهده نشدند. بین اطلاعات آزمایشگاهی بیماران دارای جهش N542-E543del با بیماران فاقد جهش اختلاف معنا داری مشاهده نگردید. مطالعات مشابهی در ارتباطه با شیوع جهش JAK2V617F در بیماران مبتلابه پلی سایتمی ورا در ایران انجام‌شده است که شیوع

این جهش را چیزی بین ۵۰.۴تا۸۶ درصد گزارش کرده‌اند که نسبت به مطالعات مشابه خارجی کمتر است(۳۶،۳۵). می‌توان حساسیت روش‌های تشخیصی را در مجاورت دلایل محیطی و نژادی درنظر گرفت که می توانند از عوامل این اختلاف ها باشند.

در بیماری اریتروسیتوز نامشخص هایپرپلارزی تنها در رده سلولی اریتروئید دیده می‌شود و رده‌های سلولی مگاکاریوسیت و سلولهای سفید چندهسته‌ای هایپرپلارزی را نشان نمی‌دهد. Scott .M Linda و همکاران(۳۳) طی مطالعه ای گزارش دادند که: جهش در اگزون ۱۲ در مقایسه با جهش JAK2V617F در سن پایین‌تری رخ می دهد. در مطالعه ما میانگین سنی افراد دارای جهش N542-E543del، ۱۹.۷۹±۳۶ سال بود که نسبت به بیماران فاقد جهش تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=0.648).

در مطالعه‌ای دیگر Passamonti F و همکاران(۲۲) به بررسی شیوع جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در بیماران مبتلابه اریتروسیتوز که ازنظر JAK2V617F منفی بودند پرداختند که مشخص شد جهش N542-E543del همانند مطالعه ی ما بیش‌ترین شیوع را نسبت به سایر جهش‌ها داشت.

Schnittger S و همکاران(۳۷) به بررسی جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 با استفاده از Melting curve در ۴۰۹ بیمار مبتلابه اریتروسیتوز نامشخص پرداختند.جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در ۱۵ بیمار مثبت بود. نتایج این مطالعه شبیه به مطالعه ما بود با این تفاوت که حجم نمونه‌ی ما کمتر بوده و ما با استفاده از AS-PCR تنها چهار جهش را موردبررسی قراردادیم. این در حالی است که در مطالعه‌ی Schnittger S از روش Melting curve استفاده شد و ۹ جهش شناسایی شد. اگر در این مطالعه از روش Melting curve به‌جای AS-PCR استفاده می‌شد این امکان وجود داشت شیوع جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 در بیماران ما بیشتر باشد.

نتیجه گیری

نهایتا در مطالعه ما مشخص گردید که از ۱۴۶ بیمار ۲ (۱.۳٪) بیمار جهش N542-E543del داشتند؛ که نسبت به اکثر مطالعات شیوع کمتری داشت. هیچ رابطه معناداری بین افراد دارای جهش و افراد فاقد جهش در رابطه با یافته‌های CBC و سن و جنس مشاهده نشد. شاید بتوان عدم وجود رابطه معنادار بین سن و جنس و شیوع جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 به کم بودن حجم نمونه ها مرتبط دانست.

از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به بررسی محدود موتاسیون ها اشاره نمود. یک آزمون جامع از موتاسیون های تمامی اگزون های کد کننده‌ی JAK2 می‌تواند کمک بیشتری در زمینه‌ی مشخص شدن نقش و تأثیر موتاسیون های JAK2 در روند بیماری اریتروسیتوز نامشخص داشته باشد.

برای دست‌یابی به نتایج قابل‌اعتماد تر پیشنهاد می‌شود که مطالعات بعدی با حجم نمونه بیشتری صورت بگیرد. همچنین با اینکه استفاده از AS-PCR برای اسکرین کردن جهش‌های پروتئین JAK2 حساسیت بیشتری نسبت به توالی یابی ژنی دارا است و به سبب اینکه تعداد جهش‌های اگزون ۱۲ پروتئین JAK2 به بیش از ۱۰ عدد می‌رسد پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از روش توالی یابی ژنی استفاده شود.

تقدیر و تشکر

در پایان از کارکنان محترم آزمایشگاه هماتولوژی بیمارستان قائم که ما را در هرچه بهتر به انجام رساندن این طرح یاری نمودند، کمال قدردانی و سپاسگزاری را داریم.

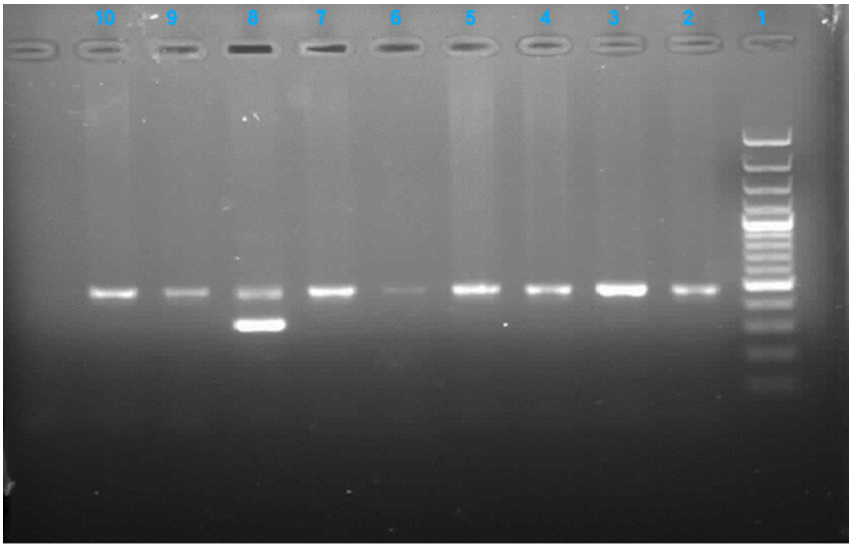
منابع

1. Percy MLJ. Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis. Hematology. 2007;12(2):131-9.
2. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, et al. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. Haematologica. 2007;92(12):1607-14.
3. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation–negative erythrocytosis. New England Journal of Medicine. 2010;363(12):1189-90.
4. Cario H, Frances McMullin M, Bento C, Pospisilova D, Percy MJ, Hussein K, et al. Erythrocytosis in children and adolescents—classification, characterization, and consensus recommendations for the diagnostic approach. Pediatric blood & cancer. 2013;60(11):1734-8.
5. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006 Jan 17;103(3):654-9.
6. Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K, et al. Mutations in the VHL gene in sporadic apparently congenital polycythemia. Blood. 2003;101(4):1591-5.
7. G Gäbler K, Behrmann I, Haan C. JAK2 mutants (eg, JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. JAK-STAT. 2013 Jul 15;2(3):e25025.
8. Reuther GW. JAK2 activation in myeloproliferative neoplasms. Cell Cycle. 2008;7(6):714-9.
9. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on< i> JAK2</i> V617F mutation status: a prospective study. The Lancet. 2005;366(9501):1945-53.
10. Neet K, Hunter T. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. Genes to Cells. 1996;1(2):147-69.
11. Orr DW, Patel R, Lea N, Westbrook R, O'GRADY J, Heaton N, et al. The prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation in chronic porto-splenomesenteric venous thrombosis. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2010;31(12):1330-6.
12. Williams JJ, Munro K, Palmer TM. Role of Ubiquitylation in Controlling Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3) Function and Expression. Cells. 2014;(2):546-62.
13. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood. 2006;108(6):1865-7.
14. Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, Patel N, Hu Y, Li S, Van Etten RA. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. PloS one. 2006 Dec 20;1(1):e18.
15. Sazawal S, Bajaj J, Chikkara S, Jain S, Bhargava R, Mahapatra M, et al. Prevalence of JAK2 V617F mutation in Indian patients with chronic myeloproliferative disorders. Indian Journal of Medical Research. 2010;132(4):423.
16. Meier C, Hoeller S, Bourgau C, Hirschmann P, Schwaller J, Went P, et al. Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. Modern Pathology. 2009;22(3):476-87.
17. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. The Lancet. 2008;372(9648):1484-92.
18. Alshemmari SH, Rajaan R, Ameen R, Al-Drees MA, Almosailleakh MR. JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. Annals of hematology. 2013:1-6.
19. Pieri L, Pancrazzi A, Pacilli A, Rabuzzi C, Rotunno G, Fanelli T, et al. JAK2V617F complete molecular remission in polycythemia vera/essential thrombocythemia patients treated with ruxolitinib. Blood. 2015;125(21):3352.
20. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet. 2005;365(9464):1054-61. 21. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. American journal of hematology. 2011;86(8):668-76.

22. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. Blood. 2011;117(10):2813-6.
23. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. Haematologica. 2007;92(12):1585-9.
24. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. Blood. 2009;114(10):2015-9.
25. Rives S, Pahl HL, Florensa L, Bellosillo B, Neusuess A, Estella J, et al. Molecular genetic analyses in familial and sporadic congenital primary erythrocytosis. haematologica. 2007;92(5):674-7.
26. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W> L/K mutation in essential thrombocythemia. Blood. 2008;112(3):844-7.
27. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science. 2009;324(5929):930-5.
28. Lorsbach R, Moore J, Mathew S, Raimondi S, Mukatira S, Downing J. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t (10; 11)(q22; q23). Leukemia. 2003;17(3):637-41.
29. Tefferi A, Pardanani A, Lim K, Abdel-Wahab O, Lasho T, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. Leukemia. 2009;23(5):905-11.
30. Tefferi A, Lim K-H, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009;361(11):1117.
31. Tefferi A, Levine R, Lim K, Abdel-Wahab O, Lasho T, Patel J, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRA correlates. Leukemia. 2009;23(5):900-4.
32. Viguie F, Aboura A, Bouscary D, Ramond S, Delmer A, Tachdjian G, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? Leukemia. 2005;19(8):1411-5.
33. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. Haematologica. 2007;92(12):1717-8.
34. Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, Bardy PG, D'Andrea RJ. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. Leukemia. 2008 Apr 1;22(4):870-3.
35. Poopak B, HAGH MF, Saki N, Elahi F, Rezvani H, Khosravipour G, Jahangirpour MA, Bolouri S, Golkar T, Falah P. JAK2 V617F mutation in Iranian patients with myeloproliferative neoplasms: clinical and laboratory findings. Turkish Journal of Medical Sciences. 2013 Jun 24;43(3):347-53.
36. Karimzadeh P, Ghaffari S, Chahardouli B, Zaghal A, Einollahi N, Mousavi S, et al. Evaluation of JAK2V617F mutation prevalence in myeloproliferative neoplasm by AS-RT-PCR. Iranian journal of Pediatric Hematology Oncology. 2011;1(2):38-42.
37. Schnittger S, Bacher U, Kern W, Schröder M, Haferlach T, Schoch C. Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. Leukemia. 2006;20(12):2195-7.

جدول ۱: توالی پرایمر های جهش‌های اگزون ۱۲

نام جهش	توالی پرایمر
F537K539delinsL	5-CATATGAACCAAATGGTGTTAATC-3
H538-QK539L	5-CATATGAACCAAATGGTGTTTTCAATT-3
K539L	5-CATATGAACCAAATGGTGTTTTCACTT-3
N542-E543del	5-CAAATGGTGTTTCACAAAATCAGAGATT-3
JAK2 exon 12 Forward	5-CTCCTCTTTGGAGCAATTCA-3
JAK2 exon 12 Reverse	5-GAGAACTTGGGAGTTGCGATA-3



شکل ۱: نتایج حاصل جهش N542-E543del به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با آلل اختصاصی: باندهای ۵۰۰bp مربوط به آلل wild type و باند ۶۰۰bp مربوط به آللN542-E543del است. وجود دو باند جداگانه در چاهک شماره ی ۸ نشانه هتروزیگوت بودن جهش N542-E543del است.

Epidemiology evaluation of common mutations in JAK2 exon 12 protein in patients with Idiopathic Erythrocythosis

Hossein Ayatollahi[1] , Mohyedin Barzegar[2], Hossein Rahimi[3], Maryam Sheikhi [4], Alireza Khiabani[4*]

1. MD, Associate Professor of Pathology, Department of Hematology and Blood Bank, Cancer Molecular Pathology Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2. MSC, Instructor of hematology, Paramedical of Kermanshah University, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. MD, Associate Professor of hematology, Department of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4. Msc, Cancer Molecular Pathology Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding author :**Alireza Khiabani ,Department of Hematology and Blood Bank ,Cancer Molecular Pathology Research Center ,Mashhad University of Medical Sciences ,Mashhad ,Iran.

Tel989158335119+ :. E-mail: Alirezakhiabani88@gmail.com

Abstract:

Introduction: Primary erythrocytosis caused defect in progenitor stem cells and this cells became too sensitive to erythropoietin. The most of acquisitive defect is JAK2V617F mutation that observed in 95% of Polycythemia Vera. This mutation was occurred in exon 14 of JAK2 protein. Other mutations accompany with erythrocytosis is JAK2 exon 12 mutations. The number of this mutations is high. In this study we were survey incident four common mutations in exon 12 of JAK2 protein in Mashhad city.

Materials and Methods: 146 patients with Idiopathic Erythrocytosis practiced in cross section study. Patients DNA was screen for F537-K539delinsL, K539L, H538QK539L and N542-E543del mutations by using ARMS-PCR. To detect PCR production has used 2% agarose gel.

Results: Among four mutations of JAK2 exon 12, just observed N542-E543del in two patients (on male, one female). The mean age of patients with N542E543del mutation was 36±19.79 years and patients with N542E543del negative was 44.62±18.88 years.

Conclusion: The result of this study demonstrated that JAK2 exon 12 mutations isn't a common abnormality in IE patients. To provide more comprehensive report in IE patients, recommended to investigate JAK2 exon12 mutations in large sample size of IE patients or it is suggested DNA sequencing instead of ARMS-PCR.

Key words: Idiopathic erythrocytosis, JAK2 exon 12 mutations, ARMS-PCR