مقایسه دو روش ARMS-PCR و AS-PCR در ارزیابی جهش JAK2V617F در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو کلاسیک غیر CML

فاطمه نادعلی،[۱] شیرین‌فردوسی،[۲] پریسا کریم‌زاده،[۳] بهرام چهاردولی،[۳] ناهید عین‌الهی،[۴] اسداله موسوی،[۳] بابک بهار،[۳] حسین درگاهی،[۴] غلامرضا توگه،[۵] کامران علی‌مقدم،[۳] اردشیر قوام‌زاده،[۳] سیدحمیداله غفاری[۳*]

۱- گروه‌پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر

۳- مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان دکتر شریعتی

۴- دانشکده پیراپزشکی

۵- مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان، بیمارستان امام‌خمینی

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

تلفن: ۸۴۹۰۲۶۶۵

email: shghaffari@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۳/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: JAK2 یک تیروزین کیناز غیر رسپتوری است که نقش مهمی در اختلالات میلوئیدی ایفا می‌کند. اخیرا جهش اکتسابی JAK2 V617F در تعداد زیادی از بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPNs) شناسایی شده است. این جهش ناشی از تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ از ژن JAK2 واقع بر روی کروموزوم ۹ است که منجر به جایگزینی اسیدآمینه فنیل آلانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتیین JAK2 می‌گردد. در مطالعه حاضر دو روش سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها (ARMS-PCR) بر روی DNA و آلل اختصاصی (AS-PCR) بر روی RNA در ارزیابی این جهش مقایسه شده‌اند. ***روش بررسی:*** مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه جهش JAK2 V617F با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، در ۵۸ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو با روش ARMS-PCR و AS-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تایید نتایج، سه نمونه از بیماران مورد Sequencing قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** با هر دو روش ARMS-PCR و AS-PCR نتایج مشابهی در بیماران پلی‌سیتمی‌ورا (۸۶/۶٪) و بیماران میلوفیبروز اولیه (۶۱/۵٪) به دست آمد. اما در بیماران ترومبوسیتمی اولیه با روش ARMS-PCR شیوع ۴۶/۶٪(۷/۱۵) و با روش AS-PCR شیوع ۵۳٪(۸/۱۵) به دست آمد. وجود جهش توسط روش Sequencing مورد تایید قرارگرفت. ***نتیجه‌گیری:*** میزان شیوع جهش JAK2 با هر دو روش، قابل مقایسه با نتایج گزارش شده قبلی می‌باشد و تفاوت در نتایج گزارش شده می‌تواند وابسته به تکنیک مورد استفاده باشد.

کلمات کلیدی: جهش JAK2، نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی- آلل، سیستم تکثیر متزلزل جهش‌ها.

مقدمه

پلی‌سیتمی‌ورا (Polycythemia Vera (PV، ترومبوسیتمی اولیه (Essential Thrombocythemia (ET، میلوفیبروز اولیه Primary Myelofibrosis (PMF) و لوسمی میلوئیدی مزمن Chronic Myeloid Leukemia (CML) مجموعاً تحت عنوان نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن Myeloproliferative Neoplasms (MPN) طبقه‌بندی می‌شوند، زیرا تکثیر ریشه‌ی یک سلول پیش‌ساز چند ظرفیتی و تولید بیش از حد یک یا چند رده سلول خونی، به عنوان پاتوفیزیولوژی آنها مطرح است.[۱] در سال ۲۰۰۵، جهش JAK2 V617F در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPNs) با استفاده از چندین روش شناسایی شد.[۲-۵] JAK2 یک تیروزین کیناز غیر رسپتوری است که نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ سایتوکاین‌های مختلف نظیر اینترلوکین ۳، ۵ و فاکتور محرک کلونی- گرانولوسیت، مونوسیت (GM-CSF) ایفا می‌کند.[۶] Janus Kinase 2 (JAK2) یک تیروزین کیناز سیتوپلاسمی است که یک دومین تیروزین کیناز فعال JAK Homology 1 (JH1)، یک دومین سودوکیناز غیر فعال از نظر کاتالیتیک JAK Homology 2 (JH2)، یک دومین SRC Hmology 2 (SH2) و یک دومین همولوژی N-ترمینال 4-point-1, Erzin, Radixin, Moesin (FERM) دارد و جهش JAK2 V617F در دومین سودوکیناز واقع شده است. این جهش از طریق تغییر G به T در نوکلئوتید ۱۸۴۹ در اگزون ۱۲ از ژن JAK2 واقع بر روی کروموزوم ۹ مشخص می‌شود که منجر به جایگزینی اسیدآمینه فنیل‌آلانین به جای والین در موقعیت ۶۱۷ از پروتئین JAK2 می‌گردد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]

در نتیجه این جهش، فعال‌سازی مداوم JAK2 در غیاب سایتوکاین رخ می‌دهد.[۷و۸] بنابراین جهش JAK2V617F یک فاکتور مستعدکننده برای پیشرفت MPN محسوب می‌شود.[۹] از اینرو کشف این جهش در تشخیص، پیش‌آگهی و پیش‌بینی پاسخ درمان مفید است.[۷و۸و۱۰] تاکنون چندین تکنیک برای شناسایی این جهش به‌کار برده شده است، مانند: Genomic DNA-PCR-Sequencing، RT-PCR، ARMS-PCR، Allele – Specific PCR، PCR-Restriction Analysis و Real-Time PCR. در جدول ۱ انواع تکنیک‌های به کار رفته توسط گروه‌های مختلف و میزان حساسیت این تست‌ها ذکر شده است. در مطالعه حاضر میزان شیوع جهش JAK2 V617F در بیماران PV، ET و PMF با استفاده از دو روش ARMS-PCR و AS-PCR مقایسه شده‌اند.

روش بررسی

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، پس از اخذ رضایت، نمونه‌های خون محیطی ۵۸ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو و ۵۰ نمونه کنترل طبیعی مراجعه‌کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان‌های دکتر شریعتی و امام‌خمینی تهران در فاصله زمانی اردیبهشت تا آبان سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری و سپس با دو روش ARMS-PCR و AS-PCR از نظر وجود جهش JAK2V617F مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی این بیماران به عنوان بیمار MPN بر اساس پرونده پزشکی و یافته‌های آزمایشگاهی انجام گرفته است.

ARMS-PCR جهت شناسایی جهش JAK2 V617F: از فرد مبتلا مقدار ۵ml خون وریدی در لوله‌حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته و DNA توسط روش پروتییناز K از خون تام استخراج شد. برای ارزیابی جهش JAK2 V617F از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد. در این تکنیک از چهار پرایمر استفاده می‌شود: یک پرایمر Forward Outer (FO)، یک پرایمر Reverse Outer (RO)، یک پرایمر Forward Wild-Type specific (FWT) و یک پرایمر Reverse mutant-specific (RMT). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl و در ۴۰ چرخه انجام شد. برای هر واکنش، مقدار DNA ژنومیک، ۲۵ng و غلظت نهایی پرایمر-های FO، RO و FWT هر سه ۰/۵µl و غلظت RMT برابر با ۱µl بود (جدول ۲). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز و سپس توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و از نظر وجود یا عدم وجود جهش مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای FO و RO از ژن JAK2 یک باند ۴۶۳ bp می‌دهند. پرایمرهای FWT و RO یک آلل Wild-type را تکثیر و باعث تولید یک باند ۲۲۹ bp می‌شوند و پرایمرهای F0 و RMT یک باند ۲۷۹ bp از آلل موتانت ایجاد می‌کنند (شکل ۱).

PCR– ASO جهت شناسایی جهش JAK2 V617F: جداسازی و تخلیص RNA از کل گلبول‌های سفیدخون با استفاده از TRIZOL (Sigma, USA) انجام شد. در استخراج RNA تام نسبت تعداد سلول به ۱ml از محلول Trizol، ۰/۲ml کلروفرم، ۰/۵ml ایزوپروپانول و ۱ml اتانل ۷۵٪ رعایت گردد. مقدار RNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در طول موج ۲۶۰nm اندازه‌گیری شد و مقدار RNA از رابطه زیر به‌دست آمد. RNA استخراج شده به نسبت ۱/۵۰ یا ۱/۱۰۰ رقیق شد و پس از set کردن دستگاه با آب مجاور شده با DEPC مقدار جذب نوری (OD260) نمونه خوانده شد. اگر جذب نوری (OD260) نمونه یک شود بدین معنی است که غلظت RNA برابر با ۴۰µg/ml است.

فاکتور رقت× ۴۰µg/ml× (جذب‌نوری)A۲۶۰=(µg/ml) غلظت RNA

تک رشته‌ای ASO-PCR یک روش PCR معمول است که برای اولین‌بار به‌عنوان روش تشخیصی برای گزارش جهش JAK2 V617F توسط Baxter با حساسیت آلل جهش یافته ۳٪ انجام شد (شکل ۲). در این روش از هر دو نوع آلل طبیعی (Wt) و جهش‌یافته (M) یک‌باند ۴۸۸bp ایجاد می‌شود، در حالی‌که یک‌باند ۲۹۵bp حاصل تکثیر آلل جهش یافته (M) است و نشان‌دهنده حضور جهش می‌باشد (جدول ۳).[۴] البته باید خاطر نشان کرد که روش AS- PCR برای تشخیص زیگوسیتی طراحی نشده است، زیگوسیتی با روش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-PAGE) بر پایه تفسیر نمونه تعیین می‌شود.[۱۱]

یافته‌ها

در مطالعه حاضر جهش JAK2 V617F با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، در ۵۸ بیمار با تشخیص جدید یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو با استفاده از دو روش ARMS-PCR و AS-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. جهت محاسبه میانگین و درصد فراوانی در هر روش از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ استفاده شد. بیماران شامل ۳۰ بیمار پلی‌سیتمی‌ورا، ۱۳ بیمار میلوفیبروز اولیه و ۱۵

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]

بیمار ترومبوسیتمی اولیه بودند. ۲۹ بیمار (۵۰٪) مونث و ۲۹ بیمار (۵۰٪) مذکر بودند. میانگین سنی کل بیماران ۵۳ سال با حداقل سنی ۱۸ سال و حداکثر ۷۶ سال بود. به علاوه ۵۰ نمونه سالم نیز به عنوان کنترل بررسی شدند که از نظر وجود جهش منفی بودند. با روش ARMS-PCR و AS-PCR نتایج مشابهی در بیماران پلی‌سیتمی‌ورا و میلوفیبروز اولیه به دست آمد و از ۳۰ بیمار پلی‌سیتمی‌ورا ۲۶ نفر (۸۶/۶٪) و از ۱۳ بیمار میلوفیبروز اولیه هشت نفر (۶۱/۵٪) دارای جهش بودند. اما در بیماران ترومبوسیتمی اولیه با روش ARMS-PCR شیوع ۴۶/۶٪ (۷/۱۵) و با روش AS-PCR شیوع ۵۳٪ (۸/۱۵) به دست آمد. وجود جهش با روش Sequencing تایید شد.

جدول- ۱: روش‌های به‌کار رفته جهت تشخیص جهش JAK2V617F

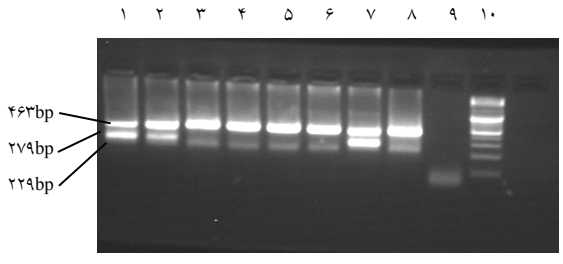
	تکنیک مورد استفاده	حساسیت (٪)
James, et al[۲]	Sequencing	۱۰
Levin, et al[۴]	Sequencing, MALD1- TOF	NR (not reported)
Baxter, et al[۵]	Sequencing, ASO- PCR	۴۰
Kralovics, et al[۷]	Sequencing	NR (not reported)
Jones, et al[۱۲]	ARMS- PCR, Pyrosequencing	۱-۲
McClure, et al[۱۳]	ASO- PCR capillary electrophoresis	۰/۰۱-۰/۱
Jelink, et al[۱۴]	Pyrosequencing	۵-۱۰
Murugesan, et al[۱۵]	Melting curve analysis	۵-۱۰

جدول- ۲: پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی جهش JAK2 با روش ARMS-PCR

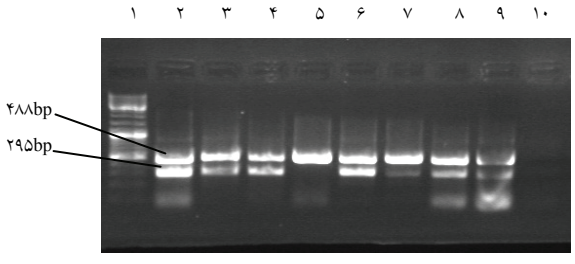
Forward outer (FO)	5'- TCC TCA GAA CGT TGA TGG CAG-3'
Reverse outer (RO)	5'- ATT GCT TTCCTT TTT CAC AAG AT-3'
Forward wild- type specific (FWt)	5'- GCATTTGGT TTTAAATTATGGAGTATATG -3'
Reverse mutant- specific (RMt)	5'- GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA AAA-3'

جدول- ۳: پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی جهش JAK2 با روش AS-PCR

Forward- 5´-GAA GAT TTG ATA TTT AAT GAA AGC CTT-3´
Reverse-5´-GTA ATA CTA ATG CCA GGA TCA CTA AGT T-3´
Mutant-5´-AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT-3´



شکل- ۱: ARMS-PCR جهت غربالگری جهش JAK2V617F. ستون ۱ و ۲ کنترل مثبت و ستون ۷ بیمار JAK2 مثبت، ستون‌های ۳، ۴، ۵،۶ و ۸ بیماران JAK2 منفی و ستون ۹ کنترل منفی و ستون۱۰ سایز مارکر را نشان می‌دهد.



شکل- ۲: ASO- PCR جهت غربالگری جهش JAK2V617F ستون ۲، ۳ و ۴ کنترل مثبت و ستون ۶ بیمار JAK2 مثبت، ستون ۵ بیماران JAK2 منفی و ستون ۱۰ کنترل منفی و ستون ۱ سایز مارکر را نشان می‌دهد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]

بحث

در مطالعه حاضر میزان شیوع جهش JAK2 V617F در ۵۸ بیمار مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مراجعه‌کننده به بخش خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی و امام‌خمینی با دو روش ARMS-PCR و AS-PCR مقایسه شدند. در مطالعه مشابهی که توسط Jones با روش ARMS-PCR در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت، میزان شیوع جهش در بیماران پلی‌سیتمی‌ورا ۸۱٪ (۵۸/۷۲)، در ترومبوسیتمی اولیه ۴۱٪ (۲۴/۵۹) و در میلوفیبروز اولیه ۴۳٪ (۱۵/۳۵) گزارش شده است[۱۲] از طرفی در مطالعه مشابهی که توسط Baxter با روش AS-PCR انجام گرفت[۵] جهش JAK2 در ۷۱ نفر از ۷۳ بیمار پلی‌سیتمی‌ورا (۹۷٪) و ۲۹ نفر از ۵۱ (۵۷٪) بیمار ترومبوسیتمی اولیه، و هشت نفر از ۱۶ (۵۰٪) بیمار میلوفیبروز ایدیوپاتیک گزارش شده است. گروه Baxter در مقاله خود بیان کرده که تکنیک AS-PCR می‌تواند جهش V617F را حتی در سطح ۳٪ از سلول‌ها شناسایی کند، در حالی که گروه Jones اعلام کرده‌اند که آنها می‌توانند سطوح یک تا ۲٪ از موتاسیون را تشخیص دهند.[۱۲] به علاوه گروه McClure حساسیت تشخیصی ۱٪ را با روش ARMS گزارش کرد.[۱۳] در این مطالعه میزان شیوع جهش در بیماران PV، ۸۶٪ به دست آمد که قابل مقایسه با یافته‌های James (۸۶٪)،[۲] Jelinek (۸۶٪)[۱۴] و Jones (۸۱٪)[۱۲] است. بالاترین میزان شیوع توسط گروه Lippert (۹۷٪) با روش allele- reaction (qPCR) specific quantitative polymerase chain[۱۶] و کمترین ۶۵٪ توسط گروه Kralovics[۷] با روش Microsatellite mapping و DNA sequencing به دست آمد. بالاترین میزان شیوع گزارش شده در بیماران PMF مربوط به مطالعه Jelink با روش Pyrosequencing با شیوع ۹۵٪ است[۱۴] که از ۱۹ بیمار، ۱۸ مورد جهش را نشان دادند و کمترین میزان مربوط به مطالعه Levine با شیوع ۳۵٪ است[۴] که از ۴۶ بیمار، ۱۶ مورد مثبت بودند. در مطالعه Campbell بر روی ۸۰۶ بیمار مبتلا به ET، با روش allele-specific PCR، ۴۱۴ نفر (۵۳/۴٪) مثبت و ۳۶۲ نفر (۴۶/۶٪) منفی بودند.[۱۷] طی مقایسه حساسیت چند روش برای تشخیص جهش JAK2V617F، نشان داده شده است که روش AS-PCR در مقایسه با دیگر روش‌ها مثل RFLP، پیروسیکوئنسینگ و ARMS-PCR دارای حساسیت بیشتری است.[۱۱] نتایج حاصل از این مطالعه با روش AS-PCR در تمام بیماران به‌جز یک بیمار ET در مقایسه با روش ARMS-PCR یکسان بود که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر در این روش می‌باشد. عامل اختلاف در نسبت‌های منتشر شده از موارد مثبت در بین زیر گروه‌های MPN می‌تواند به سه دلیل عمده باشد: ۱) معیارهای تشخیص بیماری، ۲) حساسیت روش تشخیصی جهش JAK2، ۳) منبع DNA. آنالیز جهش به طور ویژه روی DNA نوتروفیل‌ها انجام می‌گیرد و ممکن است در تعدادی از بیماران جهش در پلاکت یا گلبول‌های قرمز وجود داشته باشد. به علاوه ممکن است تعدادی از بیماران واقعا جهش منفی باشند و جهش‌های سوماتیک دیگر در ایجاد بیماری موثر باشند. زمینه ژنتیکی افراد را نیز نمی‌توان نادیده گرفت.[۱۸] تشخیص جهش JAK2 V617F اهمیت کلینیکال و تشخیصی زیادی دارد. ما پیشنهاد می‌کنیم که همه موارد MPN مشکوک برای حضور این جهش جهت کمک به طبقه‌بندی بیماری و ایجاد یک مارکر برای اهداف درمانی غربالگری شوند. شناسایی این جهش می‌تواند باعث تشخیص افتراقی نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو از حالت‌های واکنشی نظیر ترومبوسیتوز و اریتروسیتوز شود. شناسایی V617F در بیماران PV می‌تواند نیاز برای بررسی‌های بیشتر همچون توده گلبول قرمز (Red Cell Mass) و بیوپسی مغز استخوان را کاهش دهد. به علاوه، در بیماران دارای ترومبوسیتوز، استفاده از آنالیز جهش JAK2V617F ممکن است در تشخیص بیماران با یک اختلال سلول بنیادی کمک‌کننده باشد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که AS-PCR و ARMS-PCR تکنیک‌هایی هستند که می‌توانند به صورت روتین در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با حساسیت نسبتا بالا جهت شناسایی این جهش به کار روند. این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد که از مسئولین و کارشناسان آن مرکز تشکر می‌شود.

References

1. Pingali SR, Mathiason MA, Lovrich SD, Go RS. Emergence of chronic myelogenous leukemia from a background of myeloproliferative disorder: JAK2V617F as a potential risk factor for BCR-ABL translocation. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(5):E25-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]

2. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
5. 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. *Lancet* 2005;365(9464):1054-61.
6. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Platanias LC. Jak family of kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(4):423-34.
7. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005;106(10):3374-6.
8. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Guglielmelli P. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia* 2006;20(6):1055-60.
9. Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9(2):272-6.
10. Levine RL, Wernig G. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:233-9, 510.
11. Frantz C, Sekora DM, Henley DC, Huang CK, Pan Q, Quigley NB, et al. Comparative evaluation of three JAK2V617F mutation detection methods. *Am J Clin Pathol* 2007;128(5):865-74.
12. 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(6):2162-8.
13. 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(1):168-71.
14. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, et al. 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(10):3370-73.
15. Murugesan G, Aboudola S, Szpurka H, Verbic MA, Maciejewski JP, Tubbs RR, Hsi ED et al. Identification of the JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *Am J Clin Pathol* 2006;125(4):625-33.
16. 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
17. 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 JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366(9501):1945-53.
18. McLornan D, Percy M, McMullin MF. JAK2 V617F: a single mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulster Med J* 2006;75(2):112-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 4, July 2010: 207-212

ARMS-PCR Versus AS-PCR to evaluate JAK2V617F mutation in patients with non-CML myeloproliferative neoplasms

Fatemeh Nadali PhD.[1]
Shirin Ferdowsi MSc.[2]
Parisa Karimzadeh MSc.[3]
Bahram Chahardouli MSc.[3]
Nahid Einollahi PhD.[3]
Asadollah Mousavi MD.[3]
Babak Bahar MD.[3]
Hosein Dargahi PhD.[4]
Gholam Reza Toogeh MD.[5]
Kamran Alimoghaddam MD.[3]
Ardeshir Ghavamzadeh MD.[3]
Seyed Hamid Ghaffari PhD.[3*]

1- Department of Pathology Department, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

2- Department of Hematology, Molecular Genetics, Cancer Research Center, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital.
3- Department of Hematology-Oncology and BMT Research Center, Shariati Hospital.
4- School of Allied Health Sciences.
5- Department of Hematology-Oncology and BMT Research Center, Imam Khomeini Hospital.

Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Shariati Hospital, Karegar Street, 11411 Tehran, Iran.
Tel: +98-21-84902665
email: shghaffari@tums.ac.ir

Received: March 10, 2010 Accepted: Jun 14, 2010

Abstract

***Background*:** JAK2 is a nonreceptor tyrosine kinase that plays a major role in myeloid disorders. This mutation is characterized by a G to T transverse at nucleotide 1849 in exon 12 of the JAK2 gene, located on the chromosome 9p, leading to a substitution of valine to phenylalanine at amino acid position 617 in the JAK2 protein. In this study we compared the amplification refractory mutation (ARMS) assay and allele- specific (AS-PCR) to evaluate JAK2V617F mutation patients with non-CML myeloproliferative neoplasms (MPNS).

***Methods*:** In this experimental study we evaluated JAK2 mutation in 58 patients with a known or suspected diagnosis of a myeloproliferative neoplasm by simple randomized sampling. The mutation was detected by ARMS-PCR and AS-PCR in patients. In order to verify the methods, amplified products from some patients were sequenced.

***Results*:** The JAK2 V617F mutation was detected in 86.6%(26/30) of patients with polycythemia vera and 61.5%(8/13) of patients with idiopathic myelofibrosis by ARMS-PCR and AS-PCR. 46.6%(7.15) of essential thrombocythemia patients were positive using ARMS- PCR method while 53%(8.15) of then were positive when AS- PCR were used. The mutation was confirmed by sequencing.

Conclusions: The incidence of JAK2 mutation using above PCR methods is similar to previous studies. The different results may depend on the molecular technique used.

Keywords: Mutation, myeloproliferative, neoplasm, PCR.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-02]