ویژگی های جهش ژن کالرتیکولین (CALR) در نئوپلاسم‌های مایلوپرولیفراتیو

• دکتر حبیب اله گل افشان
دکترای علوم آزمایشگاهی، هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
golafshanh@sums.ac.ir

• سعیده حاجی زمانی
کارشناس ارشد هماتولوژی

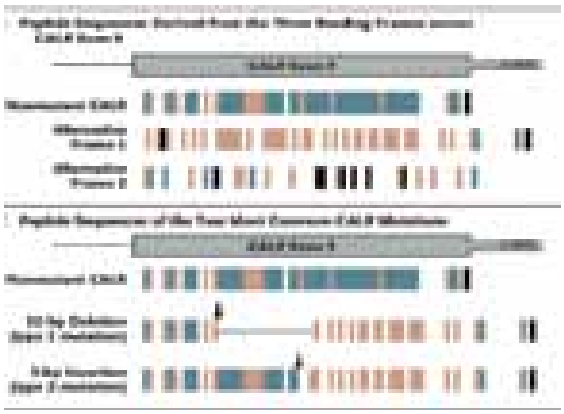
• محمد اسماعیل خدمتی
کارشناس ارشد بیوشیمی

چکیده

ترومبوسیتمی اولیه، مایلوفیبروز و پلی سایتمی ورا از خانواده نئوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو بوده که از نظر کروموزوم فیلادلفیا منفی هستند. آزمایش کروموزوم فیلادلفیا با ۱۰۰٪ اختصاصیت برای تشخیص لوسمی مزمن مایلوسیتیک راه را برای تشخیص لوسمی هموار کرده است. جهش های ژن Jak2 در بیش از ۹۵ درصد موارد پلی سایتمی ورا و حدود ۵۰ درصد موارد مایلوفیبروز و ترومبوسیتمی اولیه مشاهده می گردد. گمان می‌رود که با پیدایش جهش کالرتیکولین (CALR) شکاف تشخیص مولکولی آن دسته از نئوپلاسم های مایلوفیبروز و ترومبوسیتمی اولیه که از نظر جهش ژن Jak2 منفی هستند پر شده باشد و علاوه بر این الگوی جهش ها در پیش آگهی، خطر ترومبوز و یافته های هماتولوژیک برجسته‌تر گردد.

کلمات کلیدی: نئوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو، جهش کالرتیکولین (CALR)، مایلوفیبروز و ترومبوسیتمی اولیه

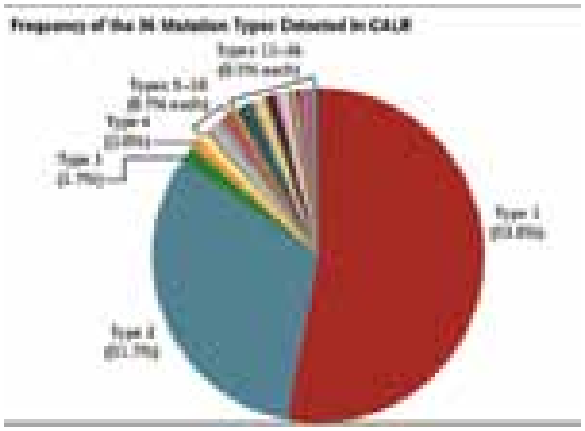
کالرتیکولین (CALR) برای بار نخست به عنوان پروتئینی که در شبکه اندوپلاسمیک با کلسیم پیوند می‌دهد و در کنترل کیفی سنتز پروتئین ها و تا خوردن دقیق آن‌ها نقش دارد مورد شناسایی قرار گرفت. در خارج از شبکه اندوپلاسمیک، کالرتیکولین در قسمت های مختلف سلول با نقش های گوناگون از قبیل پاکسازی سلول های آپوپتوز شده، چسبندگی و مهاجرت سلول ها، ذخیره کلسیم، سیگنال دهی در رابطه با کلسیم، تنظیم بیان ژن‌های حساس به هورمون‌های استروئیدی و پاسخ های خود ایمنی مشاهده شده است. جهش سوماتیک در اگزون شماره ۹ ژن کالرتیکولین به عنوان شایع ترین اختلال کروموزومی در ترومبوسیتمی اولیه (ET) و مایلوفیبروز اولیه (PMF) در مواردی که جهش JAK2 منفی است در دسامبر ۲۰۱۳ گزارش گردید. با همراه کردن جهش های JAK2 (ژانوس کیناز ۲) و MPL (گیرنده ترومبوپویتین) و CALR (کالرتیکولین) می توان بخش بزرگی از این دو نئوپلاسم خانواده مایلوپرولیفراتیو را به روش مولکولی مورد شناسایی قرار داد. تمام جهش‌های CALR به صورت اضافه شدن (insertion) و یا حذف نوکلئوتیدی در آخرین اگزون (اگزون ۹) روی می دهد که منجر به تغییر الگوی قرائت ژنتیکی (frameshift) می‌گردد. با وجودی که تاکنون بیش از ۵۰ جهش گوناگون در ژن CALR مشاهده شده است ولی دو جهش اختصاصی با حذف ۵۲ جفت باز (52bp) یا جهش تایپ یک و دیگری با اضافه شدن ۵ جفت باز یا جهش تایپ دو بیشتر از ۸۰٪ جهش های CALR را شکل می دهند. (۱)



جهش های شایع ژن کالرتیکولین در اختلالات مایلوپرولیفراتیو

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

حدود ۹۰٪ بیماران مبتلا به نئوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو در گروه ET و PMF دارای جهش هستند که در این میان ۵۰ تـا ٦۰ درصـد دارای جهش JAK2 V617F و ۲۰ تا ۳۰ درصد دارای جهش در اگزون ۹ ژن CALR و ۵ تا ۱۰ درصـد جهش در ژن گیرنده ترومبوپوئتین یا اگزون ۱۰ ژن MPL می باشند. (۱)



جهش های گوناگون ژن کالرتیکولین

بـا توجه بـه اینکه جهش هـای فوق در سـرطان های لنفوئیدی و بافت توپر (solid) مشـاهده نگردیده می توان از آن ها به عنوان نشانه ایده آل تشخیصی در ET و PMF اسـتفاده کرد. برای مثال در افتراق ترومبوسیتوز واکنشی که گاهی شـمارش پلاکت بالغ بر یک میلیـون می گردد و یا در افتراق فیبروز مغز اسـتخوان ناشی از متاستاز سرطان‌ها اسـتفاده تشـخیصی از مارکر های فوق بسـیار سـودمند است. گفتنی اسـت که امکان دارد ترومبوسیتوز واکنشی با ترومبوسـیتمی اساسی و فیبروز ناشی از متاستاز سرطان ها با مایلوفیبروز اولیه اشتباه گردد.

برخـی از گـزارش های اخیـر حاکی از جهـش همراه JAK2 و CALR نه تنها در بیماران مبتلا به ET و PMF بلکه در برخی از مبتلایان به پلی سـیتمی ورا است. گرچه جهش JAK2 V617F در اگزون ١٤ و جهش در اگزون ۱۲ ژن JAK2 در بیشـتر از ۹۵٪ بیماران مبتلا به پرخونی ورا مشاهده شده است، ولی جهش CALR هم در تعدادی از بیماران پرخون که از نظر JAK2 منفی بوده اند گزارش گردیـده اسـت و از ایـن رو شـاید بتـوان از جهش های CALR به عنوان یکی از شـایع ترین جهش های خانواده مایلوپرولیفراتیو که از نظر کروموزوم فیلادلفیا منفی هستند بعـد از جهش های JAK2 نـام برد. جهش های اگزون ۹ در ژن CALR در پیـش آگهـی ET و PMF نقش دارد. جهش CALR در ET با شـروع زودتر بیماری، شمارش بالاتر پلاکت، شـمارش کمتر گلبول های سـفید و سـطح پایین تر هموگلوبین نسـبت به بیمارانـی که دارای جهش JAK2 V617F می باشند همراه است و این یافته ها بیانگر این است که جهش CALR بیشـتر روی مگاکاریوپوئز و جهش JAK2 بیشتر روی اریتروپوئز اثر گذار است. جنس مذکر آسـیب پذیری بیشـتری برای جهش های CALR دارد. گـزارش های گسـترده از کاهش شـیوع ترومبوز در مـوارد جهش دار CALR یا منفی بودن بیمار از نظر سـه جهـش JAK2/MPL/CALR(triple negative) نسبت به مثبت شدن جهش JAK2 V617F در دسترس اسـت. گرچه نمی توان از جهـش CALR به عنوان یک فاکتور مسـتقل در کاهش خطر ترومبوز در نظر گرفت ولی می‌توان بیماران را در گروه با خطر کم یا متوسـط قرار داد. به هرحال طول دوره بیماری بدون حادثه ترومبوز در موارد جهش دار CALR یا بیماران با سـه نشـانه منفی بیشتر از بیماران با جهش JAK2 و MPL بوده است. (۲)

Table 1. Initial study population including 1282 patients diagnosed with essential thrombocythemia or primary myelofibrosis at Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Italy, between 1982 and 2014

Myeloproliferative neoplasm	*JAK2 (V617F) mutated (%)*	*MPL exon 10 mutated (%)*	*CALR exon 9 mutated (%)*	*Nonmutated JAK2/MPL/CALR (%)*	*All genotypes*
Essential thrombocythemia	567 (62%)	36 (4%)	216 (24%)	89 (10%)	908
Primary myelofibrosis	232 (62%)	20 (5%)	95 (26%)	27 (7%)	374
All patients	799 (62%)	56 (5%)	311 (24%)	116 (9%)	1282

شیوع جهش های JAK2/MPL/CALR در نئوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو که از نظر کروموزوم فیلادلفیا منفی می باشند. (۱)

جهش اگزون ۹ ژن CALR در مایلوفیبروز با شـمارش بالاتر پلاکت و هموگلوبین بیشـتر نسـبت به بیماران مبتلا بـا جهش JAK2 یا با الگوی منفی سـه گانه دارند. گفتنی است که مایلوفیبروز با الگوی سه گانه منفی بدترین حالت بیمـاری را در بـردارد. عـلاوه بر جهش هـای JAK2 و CALR جهـش های اپی ژنتیـک در ژن های ASXL1

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

و SRSF2 و EZH2 و IDH1 و IDH2 بـا پیشـرفت بیمـاری و تبدیل به لوسـمی حاد مشـاهده شـده اسـت. گزارش‌ها از همراهی جهش های CALR و ASXL1 در پیش آگهی مایلوفیبروز با تاکید از طول عمر بهتر بیماران با الگوی CALR+/ASXL- حکایت دارد. (۱)

Table 2. Main clinical and hematological features of patients with essential thrombocythemia stratified according to their driver mutation

	JAK2 (V617F)	Type 1-like CALR mutation	Type 2-like CALR mutation	Comparisons (P-value)		
				JAK2 vs. type 1-like CALR mut	JAK2 vs. type 2-like CALR mut	Type 1-like vs type 2-like CALR mut
Patient no.	567	124	84			
Age at onset, years, median (range)	50 (15–92)	45 (15–88)	40 (19–91)	0.094	< 0.001	0.049
Hemoglobin, g/dl, median (range)	14.3 (10–17.7)	13.8 (13.7–17.6)	13.8 (9.2–16.5)	0.002	< 0.001	0.411
WBC count, $x10^3$/l, median (range)	9.2 (3.8–62.2)	7.9 (4–17.5)	8.1 (4.3–17.9)	< 0.001	< 0.001	0.943
PLT count, $x10^{9}$/l, median (range)	700 (456–2148)	832 (532–3000)	982 (509–2670)	< 0.001	< 0.001	0.027
Patients with thrombosis at diagnosis, no. (%)	48 (8%)	7 (6%)	0	0.293	0.006	0.027

Abbreviations: PLT, platelet; WBC, white blood cell.

Table 3. Main clinical and hematological features of patients with primary myelofibrosis stratified according to their driver mutation

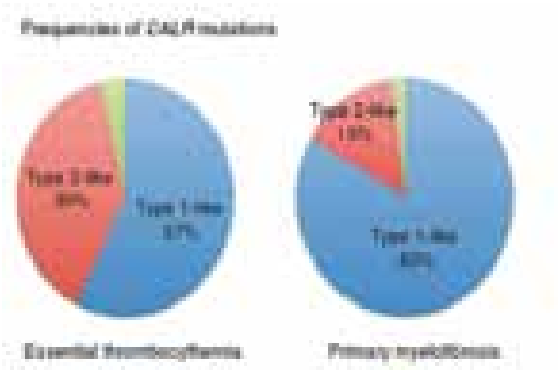
	JAK2 (V617F)	Type 1-like CALR mutation	Type 2-like CALR mutation	Comparisons (P-value)		
				JAK2 vs type 1-like CALR mut	JAK2 vs type 2-like CALR mut	Type 1-like vs type 2-like CALR mut
Patient no.	232	79	14			
Age at onset, years, median (range)	60 (18–86)	47 (27–75)	54 (24–76)	< 0.001	0.139	0.422
Hemoglobin, g/dl, median (range)	12.2 (5.5–17.9)	11.8 (7.1–15.7)	12.3 (7.1–15.9)	0.316	0.952	0.375
WBC count, $x10^9$/l, median (range)	9.7 (1.6–54)	7.6 (2.2–27)	8.6 (5.4–13.5)	0.008	0.444	0.257
PLT count, $x10^9$/l, median (range)	350 (38–1963)	492 (89–1679)	745 (46–1463)	< 0.001	0.012	0.288
Circulating CD34+ cells, $x10^9$/l, median (range)[a]	16.1 (0.8–1190.2)	34.1 (0.2–1902)	25.2 (1.7–974.7)	0.030	0.496	0.924
IPSS risk group, no. (%)				0.115	0.558	0.647
Low	87 (43.5%)	42 (60%)	7 (53.8%)			
Intermediate 1	58 (29%)	13 (18.6%)	3 (23.1%)			
Intermediate 2	34 (17%)	10 (14.3%)	3 (23.1%)			
High	21 (10.5%)	5 (7.1%)	0			

Abbreviations: IPSS, International Prognostic Score System; PLT, platelet; WBC, white blood cell. [a]Data were available for 114 patients carrying JAK2 (V617F), 41 with type 1-like CALR mutation, and 6 with type 2-like CALR mutation.

یافته های آزمایشگاهی در ترومبوسیتمی و مایلوفیبروز با توجه به ویژگی جهش های شایع (۱)

جهش سوماتیک در اگزون ۹ ژن CALR بطور انحصاری در نئوپلاسم های میلوئیدی با ترومبوسیتوز رخ می دهد که در این میان می توان به ET و PMF و کم‌خونی رفراکتوری با سیدروبلاست حلقوی و ترومبوسیتوز را نام برد.

جهش تایـپ یک کالرتیکولین با سـیگنال‌دهی غیر طبیعی مسیرهای وابسته به کلسیم در سیتوپلاسم همراه است جهش‌های شـبه تایـپ یـک CALR del 52 (TYPE 1 LIKE MUTATION) بطـور عمده بـا فنوتایـپ مایلوفیبـروز و در ET با خطر بالای تبدیل به مایلوفیبروز همراه اسـت. جهش های تایپ دو (CALR ins 5) اغلـب همراهـی بـا ET بـا خطر کم ترومبـوز علیرغم شـمارش بالای پلاکت و سـیر تدریجی بیماری است. (۳)



جهـش در اگـزون ۱۴ ژن ژانوس کیناز کـه فنیل آلانین جایگزین والین می شـود در حدود ۹۵ درصد بیماران مبتلا به پرخونی ورا (PV) و ۵۰ تا ۶۰ درصد ET و مایلوفیبروز مشـاهده می شـود. ژانوس کیناز جهش یافته با فسفوریله کردن سوبسترای خود سیستم سیگنال دهی JAK-STAT را پیوسته فعال نگه می دارد.

جهش سوماتیک در اگزون ۱۲ ژن JAK2 نیز در مواردی از PV یافت شده است که در غالب موارد برخلاف جهش اگـزون ۱۴ که با پان مایلوز همراه اسـت، با اریتروسـیتوز خالص همراه می شود. پان مایلوز به مفهوم افزایش همزمان هموگلوبیـن، شـمارش گلبول سـفید و شـمارش پلاکت می‌باشد. در ۵ تا ۱۰ درصد موارد مبتلایان به ET و PMF کـه فاقد جهش JAK2 می باشـد دارای جهش در اگزون ۱۰ گیرنده ترومبوپوئتین MPL بـوده که با ازدیاد فعالیت گیرنده همراه می گردد.

جهش CALR همراهی بسـیار قوی بـا ET و PMF غیرموتانـت از نظـر جهش هـای JAK2 (اگـزون ۱۲ و ۱۴) و جهـش اگزون ۱۰ ژن MPL دارد. بنظر می رسـد کـه جهـش CALR بتواند شـکاف تشـخیصی مواردی از ET و PMF کـه از نظـر JAK2 و MPL منفـی هسـتند را پـر کند. در یک مطالعه جهـش های تایپ یک (حـذف 52bp;1092-1143) و جهـش تایـپ 2 (C.1154- 1155in;5bp ins TTGTC) بـه ترتیـب دارای فراوانـی ۵۳ و ۳۱/۷ بوده اسـت. حاصل جهش های فوق تغییر الگوی قرائت و تولید پروتئین CALR با اسـید آمینه های شارژ دار مثبت بجای شارژدار منفی در نوع طبیعی

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

اســت. جهش تایپ یک با از دست دادن تقریبی تمام شارژ منفی همراه بوده در حالی که در جهش تایپ ۲ حدود نیمی از شــارژهای منفی حفظ می شــود. جهش تایپ یک بطور چشم گیر در مایلوفیبروز نسبت به ترومبوسیتوپنی اولیه رخ مــی دهد. جایگاه کروموزومی ژن CALR کروموزوم 19P می باشد. تداوم پیوسته مسیر سیگنال دهی JAK/STAT در جهش های CALR ممکن اســت استفاده از بازدارنده های JAK2 را در درمان مایلوفیبروز مطرح کند. جهش CALR مســیر ســیگنال دهــی JAK/STAT را از طریــق گیرنده ترومبوپوئتین (MPL) فعال کرده (MPL-JAK/STAT) و از اینرو با شمارش پلاکت بیشتری تظاهر می کند. (٤)

کالرتیکولیــن طبیعــی بــا پیوند به یون کلســیم در شــبکه اندوپلاســمیک کلســیم یونیزه را غیر فعال نگه می دارد. ولی کالرتیکولیــن جهش یافته با شــارژ مثبتی که پیدا می کند میلی برای پیوند با کلســیم نداشــته و موجب افزایش کلسیم یونیزه در سیتوپلاســم می گردد. گفتنی است که سطح کلسیم یونیزه در تنظیم تولید مگاکاریوســیت و پلاکت نقش دارد و از اینرو CALR موتانت ممکن اســت از طریق بهم زدن تعادل کلسیم یونیزه نقش در ایجاد اختلالات مایلوپرولیفراتیو داشته باشد.

یافتن قابل توجه جهش تایپ یک یا شــبه آن در مایلوفیبروز بیانگر این نکته اســت که این جهــش برخلاف جهش تایپ۲ میــل بــه فیبروز مغــز اســتخوان دارد و گفتنی اســت که تنها ۱۵ درصد بیمــاران مبتلا با مایلوفیبــروز دارای جهش تایپ۲ بوده‌اند. بیشــترین انتقال یون کلســیم درون سیتوپلاســمی در رابطه با جهش تایپ یک بوده است که شارژ منفی کالرتیکولین بطور کامل با اســید آمینه های شــارژ مثبت یا خنثی جایگزین گردیده اســت. جهــش تایپ یک با بیشــترین تخمین پلاکتی همراه اســت. اختــلال در پیونــد کالرتیکولین با یون کلســیم با تهی شــدن کلســیم در شــبکه اندوپلاســمیک و اختلال در ذخیــره ســازی آن بطور عمــده در جهش تایپ یک نســبت بــه جهــش تایــپ ۲ و یــا JAK2 رخ می دهد. فعال شــدن SOCE (Store Operated Calcium Entry) یــا پروســه فعال ورود کلســیم از غشــای ســلول به دنبال تخلیه شــبکه اندوپلاسمیک در جهش تایپ یک در مگاکاریوسیت‌ها مشــاهده شــده اســت. بــا توجــه به اینکــه جهــش تایپ ۲ کالرتیکولیــن بــا کمترین شــانس ترومبــوز همراه اســت از اینــرو گمــان مــی رود کــه جهــش JAK2 که بــا ترومبوز همراهــی بیشــتری دارد فاکتور مهم تری نســبت به‌شــمارش پلاکت در پدیده ترومبوز اســت. پیشــرفت فیبروز در جهش CALR del52 شایع تر از CALR ins 5 است. (۲)

References

1- Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms Thorsten Klampfl, Ph.D., Heinz Gisslinger, M.D., Ashot S. Harutyunyan, M.D., Ph.D., Harini Nivarthi, Ph.D., Elisa Rumi, M.D., Jelena D. Milosevic, M.Sc., Nicole C.C. Them, M.Sc., Tiina Berg, B.Sc., Bettina Gisslinger, M.Sc., Daniela Pietra, Ph.D., Doris Chen, Ph.D., Gregory I. Vladimer, Ph.D., Klaudia Bagienski, M.Sc., Chiara Milanesi, M.Sc., Ilaria Carola Casetti, M.D., Emanuela Sant'Antonio, M.D., Virginia Ferretti, Ph.D., Chiara Elena, M.D., Fiorella Schischlik, M.Sc., Ciara Cleary, M.Sc., Melanie Six, B.Sc., Martin Schalling, M.Sc., Andreas Schönegger, M.Sc., Christoph Bock, Ph.D., Luca Malcovati, M.D., Cristiana Pascutto, Ph.D., Giulio Superti-Furga, Ph.D., Mario Cazzola, M.D., and Robert Kralovics, Ph.D. N Engl J Med 2013; 369:2379-2390 December 19, 2013.

2- CALR mutations in patients with essential thrombocythemia diagnosed in childhood and adolescence. Fiorina Giona, Luciana Teofili, Sara Capodimonti, Marica Laurino, Maurizio Martini, Deborah Marzella, Giovanna Palumbo, Daniela Diverio, Robin Foà and Luigi Maria Larocca. Blood 2014 123:3677-3679.

3- Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D.G. Kent, A. Aziz, A.L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A.V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H.P. Harding, J.D. Fitzpatrick, C.T. Goudie, C.A. Ortmann, S.J. Loughran, K. Raine, D.R. Jones, A.P. Butler, J.W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M.-Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B.J.P. Huntly, C.N. Harrison, N.C.P. Cross, D. Ron, A.M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P.J. Campbell, and A.R. Green N Engl J Med 2013; 369:2391-2405 December 19, 2013.

4- Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (McPherson, 23rd ed) 2017

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]