

ویژگی های جهش ژن کالرتیکولین (CALR) در نئوپلاسم های 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

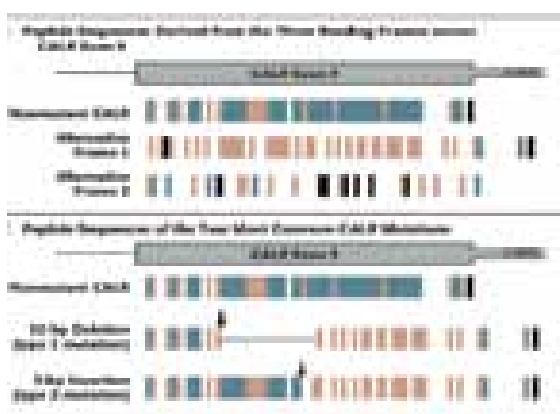
کارشناس ارشد بیوشیمی

چکیده

ترومبوسیتمی اولیه، مایلوفیروز 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 مایلوستیک 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 مایلوفیروز و ترومبوسیتمی اولیه مشاهده می گردد. گمان می رود که با پیدایش جهش کالرتیکولین (*CALR*) شکاف تشخیص مولکولی آن دسته از نئوپلاسم های مایلوفیروز 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 برجسته تر گردد.

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

عنوان شایع ترین اختلال کروموزومی در ترومبوسیتمی اولیه (*ET*) و مایلوفیروز 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 ترومبوپوئیتین) و *CALR* (کالرتیکولین) می توان بخش بزرگی از این دو نئوپلاسم خانواده مایلوپرولیفراتیو را به روش مولکولی مورد شناسایی قرار داد. تمام جهش های *CALR* به صورت اضافه شدن (*insertion*) و یا حذف نوکلئوتیدی در آخرین آگزون (آگزون ۹) روی می دهد که منجر به تغییر الگوی قرائت ژنتیکی (*frameshift*) می گردد. 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

کالرتیکولین (*CALR*) برای بار نخست به عنوان پروتئینی که در شبکه اندوپلاسمیک با کلسیم پیوند می دهد 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 ژن های حساس به هورمون های استروئیدی و پاسخ های خود ایمنی مشاهده شده است. جهش سوماتیک در آگزون شماره ۹ ژن کالرتیکولین به

CALR به عنوان یکی از شایع ترین جهش های خانواده مایلوپرولیفراتیو که از نظر کروموزوم فیلادلفیا منفی هستند بعد از جهش های JAK2 نام برد. جهش های اگزون ۹ در ژن CALR در پیش آگهی ET و PMF نقش دارد. جهش CALR در ET با شروع زودتر بیماری، شمارش بالاتر پلاکت، شمارش کمتر گلبول های سفید و سطح پایین تر هموگلوبین نسبت به بیمارانی که دارای جهش JAK2 V617F می باشند همراه است و این یافته ها بیانگر این است که جهش CALR بیشتر روی مگاکاریوپوئز و جهش JAK2 بیشتر روی اریتروپوئز اثر گذار است. جنس مذکر آسیب پذیری بیشتری برای جهش های CALR دارد. گزارش های گسترده از کاهش شیوع ترومبوز در موارد جهش دار CALR یا منفی بودن بیمار از نظر سه جهش JAK2/MPL/CALR (triple negative) در دسترس است. گرچه نمی توان از جهش CALR به عنوان یک فاکتور مستقل در کاهش خطر ترومبوز در نظر گرفت ولی می توان بیماران را در گروه با خطر کم یا متوسط قرار داد. به هر حال طول دوره بیماری بدون حادثه ترومبوز در موارد جهش دار CALR یا بیماران با سه نشانه منفی بیشتر از بیماران با جهش JAK2 و MPL بوده است. (۲)

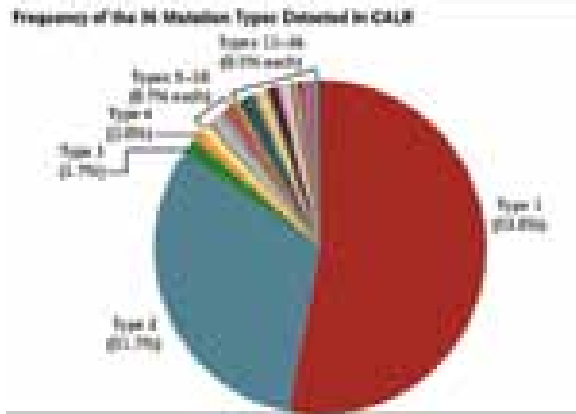
Table 1. Initial study population including 1282 patients diagnosed with essential thrombocythemia or primary myelofibrosis at Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Italy, between 1982 and 2014

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 نتوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو که از نظر کروموزوم فیلادلفیا منفی می باشند. (۱)

جهش اگزون ۹ ژن CALR در مایلو فیبروز با شمارش بالاتر پلاکت و هموگلوبین بیشتر نسبت به بیماران مبتلا با جهش JAK2 یا با الگوی منفی سه گانه دارند. گفتنی است که مایلو فیبروز با الگوی سه گانه منفی بدترین حالت بیماری را در بردارد. علاوه بر جهش های JAK2 و CALR جهش های اپی ژنتیک در ژن های ASXL1

حدود ۹۰٪ بیماران مبتلا به نتوپلاسم های مایلوپرولیفراتیو در گروه ET و PMF دارای جهش هستند که در این میان ۵۰ تا ۶۰ درصد دارای جهش JAK2 V617F و ۲۰ تا ۳۰ درصد دارای جهش در اگزون ۹ ژن CALR و ۵ تا ۱۰ درصد جهش در ژن گیرنده ترومبوپوئین یا اگزون ۱۰ ژن MPL می باشند. (۱)

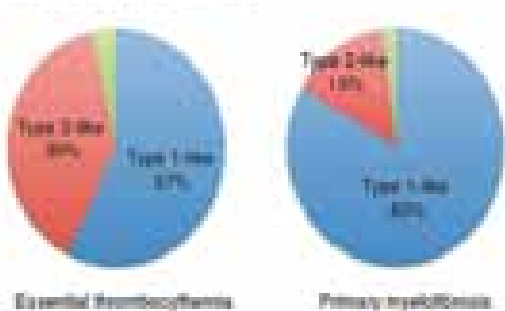


جهش های گوناگون ژن کالرتیکولین

با توجه به اینکه جهش های فوق در سرطان های لنفوئیدی و بافت توپر (solid) مشاهده نگردیده می توان از آن ها به عنوان نشانه ایده آل تشخیصی در ET و PMF استفاده کرد. برای مثال در افتراق ترومبوسیتوز واکنشی که گاهی شمارش پلاکت بالغ بر یک میلیون می گردد و یا در افتراق فیبروز مغز استخوان ناشی از متاستاز سرطان ها استفاده تشخیصی از مارکر های فوق بسیار سودمند است. گفتنی است که امکان دارد ترومبوسیتوز واکنشی با ترومبوسیتمی اساسی و فیبروز ناشی از متاستاز سرطان ها با مایلو فیبروز اولیه اشتباه گردد.

برخی از گزارش های اخیر حاکی از جهش همراه JAK2 و CALR نه تنها در بیماران مبتلا به ET و PMF بلکه در برخی از مبتلایان به پلی سیتمی ورا است. گرچه جهش JAK2 V617F در اگزون ۱۴ و جهش در اگزون ۱۲ ژن JAK2 در بیشتر 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 گردیده است و از این رو شاید بتوان از جهش های

Prevalence of CALR mutations



جهش در اگزون ۱۴ ژن ژانوس کیناز که فنیل آلانین جایگزین والین می شود در حدود ۹۵ درصد بیماران مبتلا به پرخونی ورا (PV) و ۵۰ تا ۶۰ درصد ET و مایلو فیروز مشاهده می شود. 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 اگزون ۱۴ که با پان مایلو ز همراه است، با اریتروسیتوز خالص همراه می شود. پان مایلو ز به مفهوم افزایش هموگلوبین، شمارش گلبول سفید و شمارش پلاکت می باشد. در ۵ تا ۱۰ درصد موارد مبتلایان به ET و PMF که فاقد جهش JAK2 می باشد دارای جهش در اگزون ۱۰ گیرنده ترومبوپوئین MPL بوده که با ازدیاد فعالیت گیرنده همراه می گردد.

جهش CALR همراهی بسیار قوی با ET و PMF غیرموتانت از نظر جهش های JAK2 (اگزون ۱۲ و ۱۴) و جهش اگزون ۱۰ ژن MPL دارد. بنظر می رسد که جهش CALR بتواند شکاف تشخیصی مواردی از ET و PMF که از نظر JAK2 و MPL منفی هستند را پر کند. در یک مطالعه جهش های تایپ یک (حذف 52bp;1092-1143) و جهش تایپ 2 (C.1154-1155ins;5bp ins TTGTC) به ترتیب دارای فراوانی ۵۳ و ۳۱/۷ بوده است. حاصل جهش های فوق تغییر الگوی قرائت و تولید پروتئین CALR با اسید آمینه های شارژ دار مثبت بجای شارژدار منفی در نوع طبیعی

و SRSF2 و EZH2 و IDH1 و IDH2 با پیشرفت بیماری و تبدیل به لوسمی حاد مشاهده شده است. گزارش ها از همراهی جهش های CALR و ASXL1 در پیش آگهی مایلو فیروز با تاکید از طول عمر بهتر بیماران با الگوی CALR+/ASXL- حکایت دارد. (۱)

Table 1. 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 (11.7-17.6)	13.8 (9.2-16.5)	0.002	<0.001	0.411
WBC count, x10 ⁹ /l, median (range)	9.2 (3.8-62.2)	7.9 (4-17.5)	8.1 (4.3-17.9)	<0.001	<0.001	0.946
PLT count, x10 ⁹ /l, median (range)	700 (456-2148)	832 (502-3000)	982 (500-2670)	<0.001	<0.001	0.027
Patients with thrombosis at diagnosis, no. (%)	48 (8%)	7 (6%)	0	0.293	0.008	0.027

Abbreviations: J, 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 (5.5-17.8)	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 (4.4-13.5)	0.008	0.444	0.487
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)	16.1 (0.8-190.2)	34.1 (0.2-190.2)	25.2 (1.7-974.7)	0.030	0.496	0.024
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. 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

مایلو فیروز 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 کم خونی رفراکتوری با سیدرو بلاست حلقوی و ترومبوسیتوز را نام برد.

جهش تایپ یک کالر تیکولین با سیگنال دهی غیر طبیعی مسیرهای وابسته به کلسیم در سیتوپلاسم همراه است جهش های شبه تایپ یک CALR del 52 (TYPE 1 LIKE MUTATION) بطور عمده با فنوتایپ مایلو فیروز و در ET با خطر بالای تبدیل به مایلو فیروز همراه است. جهش های تایپ دو (CALR ins 5) اغلب همراهی با ET با خطر کم ترومبوز علیرغم شمارش بالای پلاکت و سیر تدریجی بیماری است. (۳)

بیانگر این نکته است که این جهش برخلاف جهش تایپ ۲ میل به فیروز مغز استخوان دارد و گفتنی است که تنها ۱۵ درصد بیماران مبتلا با مایلو فیروز دارای جهش تایپ ۲ بوده‌اند. بیشترین انتقال یون کلسیم درون سیتوپلاسمی در رابطه با جهش تایپ یک بوده است که شارژ منفی کالرتیکولین بطور کامل با اسید آمینه های شارژ مثبت یا خنثی جایگزین گردیده است. جهش تایپ یک با بیشترین تخمین پلاکتی همراه است. اختلال در پیوند کالرتیکولین با یون کلسیم با تهی شدن کلسیم در شبکه اندوپلاسمیک و اختلال در ذخیره سازی آن بطور عمده در جهش تایپ یک نسبت به جهش تایپ ۲ و یا JAK2 رخ می دهد. فعال شدن SOCE (Store Operated Calcium Entry) یا پروسه فعال ورود کلسیم از غشای سلول به دنبال تخلیه شبکه اندوپلاسمیک در جهش تایپ یک در مگا کاربوسیت‌ها مشاهده شده است. با توجه به اینکه جهش تایپ ۲ کالرتیکولین با کمترین شانس ترومبوز همراه است از اینرو گمان می رود که جهش JAK2 که با ترومبوز همراهی بیشتری دارد فاکتور مهم تری نسبت به شمارش پلاکت در پدیده ترومبوز است. پیشرفت فیروز در جهش CALR del52 شایع تر از CALR ins 5 است. (۲)

است. جهش تایپ یک با از دست دادن تقریبی تمام شارژ منفی همراه بوده در حالی که در جهش تایپ ۲ حدود نیمی از شارژهای منفی حفظ می شود. جهش تایپ یک بطور چشم گیر در مایلو فیروز نسبت به ترومبوسیتوپنی اولیه رخ می دهد. جایگاه کروموزومی ژن CALR کروموزوم 19P می باشد. تداوم پیوسته مسیر سیگنال دهی JAK/STAT در جهش های CALR ممکن است استفاده از بازدارنده های JAK2 را در درمان مایلو فیروز مطرح کند. جهش CALR مسیر سیگنال دهی JAK/STAT را از طریق گیرنده ترومبوپوئین (MPL) فعال کرده (MPL-JAK/STAT) و از اینرو با شمارش پلاکت بیشتری تظاهر می کند. (۴)

کالرتیکولین طبیعی با پیوند به یون کلسیم در شبکه اندوپلاسمیک کلسیم یونیزه را غیر فعال نگه می دارد. ولی کالرتیکولین جهش یافته با شارژ مثبتی که پیدا می کند میلی برای پیوند با کلسیم نداشته و موجب افزایش کلسیم یونیزه در سیتوپلاسم می گردد. گفتنی است که سطح کلسیم یونیزه در تنظیم تولید مگا کاربوسیت و پلاکت نقش دارد و از اینرو CALR موتانت ممکن است از طریق بهم زدن تعادل کلسیم یونیزه نقش در ایجاد اختلالات مایلوپروفیلاتیو داشته باشد. یافتن قابل توجه جهش تایپ یک یا شبه آن در مایلو فیروز

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 Bagiński, 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*

