Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

مقاله پژوهشی

افزایش بیان ژن *JAK2* در بیماران مبتلابه لوسمی میلوئیدی حاد

زهرا مرادی، خدیجه عنصری*

گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوئیدی حاد (Acute myeloid leukemia, AML)، سومین سرطان شایع در ایران و پنجمین رتبه را در جهان دارد و حدود ۸٪ از کل سرطان‌ها را به خود اختصاص داده است. مسیر Janus kinas و فعال‌کننده رونویسی (JAK-STAT)، در تنظیم تکثیر سلولی، تمایز، آپاپتوز و همچنین در ایجاد بعضی از بیماری‌های خونی نقش دارد. مسیر JAK/STAT یک محور سیگنالینگ مهم است که فعال شدن غیرطبیعی این مسیر باعث پیشرفت در مسیر ابتلا به سرطان خون می‌گردد. یکی از ژن‌های مهم این مسیر، ژن *JAK2* است و هدف از این مطالعه، ارزیابی بیان *JAK2* در بیماران مبتلابه AML است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه شاهد- موردی، نمونه خونی از ۳۰ بیمار مبتلابه AML مراجعه‌کننده به بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی، تهران در سال ۱۳۹۵ و ۲۰ نمونه سالم به‌عنوان کنترل جمع‌آوری گردید. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن *JAK2* با روش Real time PCR به روش محاسباتی $\Delta\Delta CT$ بررسی گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری با نرم‌افزار Grafpad prism 6 و با بکار بردن t-test صورت گرفت. مقادیر $P<0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج: بررسی نتایج نشان می‌دهد که سطح بیان ژن *JAK2* در بیماران در مقایسه با گروه کنترل افزایش چشمگیری داشته است که ازنظر آماری نیز معنی‌دار بوده است (P=0.0001). درحالی‌که ارتباط معناداری بین سن (P=0.753) و جنسیت بیماران (P=0.494) با افزایش بیان ژن *JAK2* در جمعیت موردمطالعه وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: بررسی میزان بیان ژن *JAK2* می‌تواند در تعیین پیش‌آگهی بیماران مبتلابه AML نقش مهمی داشته باشد.

کلمات کلیدی: لوسمی میلوئیدی حاد، ژن *JAK2*، Real-time PCR

مقدمه

لوسمی ۸٪ کل سرطان‌های انسانی بوده، رتبه پنجم جهانی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان و رتبه دوم در ایران را به خود اختصاص داده است (۱). ازاین‌بین، لوسمی میلوئید حاد (Acute myeloid leukemia, AML)، بیماری بدخیم سلول‌های خون‌ساز است که از تغییر شکل سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه منشأ می‌گیرد. این سلول‌ها از خون‌سازی نرمال جلوگیری کرده، ترکیب خونی بیمار طی ۶-۳ هفته کاملاً به‌هم‌خورده و علائم بالینی ازجمله افت پلاکت، کاهش گلبول‌های قرمز، افزایش گلبول‌های سفید، تب و نشانه‌های نارسایی مغز استخوان ظاهر می‌گردد (۲). این بیماری ازنظر فنوتیپی و ژنوتیپی متفاوت بوده و با عدم تمایز تعداد گسترده‌ای از پیش سازهای سلول‌های میلوئیدی آغاز می‌گردد (۳). لوسمی میلوئید حاد، شایع‌ترین فرم لوسمی در دوران نوزادی و بزرگ‌سالی بوده و نسبت کوچکی را در زمان تولد و نوجوانی باعث می‌شود. افزایش شیوع نسبتاً زیاد این بیماری که در حدود ۱/۵ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است، در اولین سال زندگی فرد اتفاق می‌افتد. شیوع ابتلا در ده سال اول زندگی به ۰/۴ مورد کاهش و سپس در دهه دوم زندگی به یک مورد در هر صد هزار نفر افزایش پیدا می‌کند. تقریباً از ۲۵ سالگی تا ۸۰ سالگی این شیوع به ۲۵ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ارتقا

***نویسنده مسئول: خدیجه عنصری**، گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

Email:onsory@gmail.com

https://orcid.org/0000-0001-5731-6987

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

پیدا می‌کند (۴). این نوع سرطان در کودکان و نوجوانان بسیار شایع است به‌طوری‌که، از هر ۳ مورد یک نفر به این بیماری مبتلا می‌گردد. میزان بروز آن در گروه‌های سنی مشابه، در مردان بیشتر از زنان است (۴/۴ در برابر ۳) (۲). AML، در اثر تغییر شکل سلول‌های اولیه خونی به وجود می‌آید که نتیجه تغییرات کروموزمی و موتاسیون در تعداد بسیاری از ژن‌های درگیر در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های خونی است (۵، ۶). این سلول‌های بنیادی لوسمی که قابلیت تقسیم زیادی داشته و پس از مدتی جمعیت انبوهی از سلول‌های لوسمی را ایجاد می‌کنند، در مقابل درمان مقاومت نشان داده و مانع بزرگی در درمان محسوب می‌شوند (۷). لوسمی میلوئید حاد، مانند دیگر سرطان‌ها روندی چندمرحله‌ای داشته که قبل از ظهور بیماری اختلالات ژنتیکی متعددی در بدن بیمار رخ می‌دهد. تغییر در بعضی از مسیر سیگنالینگ موجب پیدایش این بیماری می‌گردد. مسیر JAK/STAT نقش مهمی در انتقال پیام سلولی، تکثیر، تمایز و بقاء سلولی ایفا می‌کند. این مسیر شامل خانواده پروتئین تیروزین کینازهای سیتوپلاسمی هستند که خود شامل چهار عضو JAK1، JAK2، JAK3 و TYk2 است. این خانواده از گیرنده‌های آنزیمی، با دمین سیتوپلاسمی گیرنده‌های سایتوکاین‌ها ارتباط دارند (۱۱-۸). نام اولیه JAK از عبارت Janus kinas گرفته شده است، زیرا می‌تواند به‌طور هم‌زمان در دو جهت متفاوت عملکرد داشته باشد. هر یک از این مولکول‌ها دارای یک دمین کینازی، یک دمین کاتالیتیکی غیرفعال شبه کینازی و یک انتهای آمینی دارند. این مولکول‌ها به‌عنوان واسطه سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد عمل کرده که بااتصال لیگاند به دمین آمینی، JAK فعال گشته و درنتیجه باعث ایجاد جایگاهی برای اتصال گروهی از فاکتورهای رونویسی می‌گردد. بعد از اتصال سایتوکاین به گیرنده سطح سلولی، گیرنده‌ها به‌صورت دایمر درآمده و با فسفریلاسیون بر روی اسیدآمینه تیروزین، فسفریلاسیون پروتئین‌های STAT سیتوپلاسمی صورت گرفته و پیام به هسته انتقال‌یافته و بااتصال به DNA، باعث تنظیم رونویسی بسیاری از ژن‌های هدف و ژن‌های درگیر در آپوپتوزیس و تحریک سیکل سلولی می‌گردد (۱۱). یکی از مهم‌ترین این پروتئین کینازهای سیتوپلاسمی *JAK2* است که نقش مهمی در انتقال پیام در سلول‌های خون‌ساز در مسیر JAK/STAT دارد (۱۲، ۱۳). ژن *JAK2* که اولین بار در سال ۱۹۸۹ کلون شد، بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۹ (9p24) قرار داشته و دارای ۲۵ اگزون است. این ژن کدکننده پروتئین JAK2 است که دارای ۱۱۳۲ اسیدآمینه با ۱۳۰/۷ کیلودالتون است (۱۴). تحت شرایط فیزیولوژیک طبیعی، وقتی یک لیگاند خون‌ساز مانند اریتروپوئیتین به گیرنده سایتوکاینی مربوطه متصل می‌شود، باعث تجمع بخش سیتوپلاسمی گیرنده‌ها شده و بااتصال مولکول JAK2، اتوفسفریلاسیون در واحدهای تیروزینی آن رخ می‌دهد. فسفریلاسیون گیرنده و *JAK2* متصل به آن سبب ایجاد تغییر در شکل فضایی گیرنده شده، به‌گونه‌ای که جایگاهی برای اتصال پروتئین‌های فعال‌کننده نسخه‌برداری انتقال پیام (STAT) فراهم می‌گردد و باعث فسفریله شدن این مولکول‌ها و دایمریزه شدن آن‌ها می‌شود (۱۵، ۱۶). فسفریلاسیون تیروزین، سایر مولکول‌های کلیدی تنظیم‌کننده مسیر انتقال پیام سایتوکاین‌ها را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد و فعال شدن JAK2 باعث فعال شدن دیگر مسیرها ازجمله مسیر PI3K/AKT و ERK/MAPK که از مسیرهای انتقال پیام می‌باشند نیز می‌شود. نتایج بیولوژیکی این مسیرها تکثیر، تمایز و بقاء سلولی است. با توجه به نقش کینازی JAK2 در فعال کردن تعدادی از سایتوکاین‌هایی که درواقع فاکتور رشد سلول‌های خون‌ساز هستند، دور از انتظار نیست که فعال شدن خودبه‌خودی آن باعث پرولیفراسیون غیرطبیعی و درنتیجه ایجاد بدخیمی‌های خونی گردد (۱۷، ۱۸). برای رهایی بیماران مبتلابه AML و جهت افزایش نتیجه درمان باید به دنبال بیومارکرهای مولکولی بود؛ بنابراین، هدف از این مطالعه که برای اولین بار بر روی جمعیت ایرانی صورت گرفته است، بررسی بیان ژن *JAK2* در بیماران مبتلابه AML است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، خون ۳۰ بیمار مبتلابه AML و ۲۰ فرد سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی، تهران در سال ۱۳۹۵ بعد از اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه مطابق با قوانین بیمارستان و مرکز تحقیقات از بیماران گرفته شد و با کد ۲۹۸۷۰۵۰۳۳۴۲۹۸۵۱ به انجام این تحقیق اقدام گردید. محدوده سنی بیماران بین ۳۲ تا ۷۴ سال و محدوده سنی افراد سالم بین ۳۱ تا ۷۸ سال است. تشخیص نوع سرطان خون بر اساس طبقه‌بندی FAB با رنگ‌آمیزی رومانوسکی لام خون محیطی انجام گردید. آزمایش CBC برای بررسی خون محیطی بیماران به‌منظور اندازه‌گیری WBC، PLT، Hb و تعیین درصد بلاست بیماران به‌طور جداگانه صورت گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

استخراج RNA و تهیه cDNA

بعد از جمع‌آوری نمونه‌های خونی، استخراج RNA توسط ترایزول (Invitrogen, USA) صورت گرفت. به‌منظور اطمینان از کیفیت RNA استخراج‌شده، جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین کیفیت RNAs توسط دستگاه نانودراپ بررسی گردید. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و طبق مواد زیر که شامل ۱ میکرولیتر Random Hegzamer، ۱ میکرولیتر پرایمر Oligi dT، ۱ میکرولیتر dNTP، ۵ میکرولیتر RNA، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MMuLV، ۲ میکرولیتر MMuLV Buffer، ۹/۵ میکرولیتر DEPC به هر میکروتیوب افزوده شد. کل واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای غیرفعال کردن آنزیم انجام شد. در انتهای این مرحله کل cDNA تک‌رشته‌ای حاصل شد و با خاصیت RNase موجود در آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، RNA حذف شد.

Real-time PCR

پس از تهیه cDNA، میزان بیان ژن *JAK2* در هر دو گروه بیمار و کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمر اختصاصی برای دو ژن *JAK2* و *GAPDH* (ژن مرجع) با استفاده از نرم‌افزار Gene Runnerبه‌صورت exon-exon Junction طراحی شدند (جدول ۱). همچنین به‌منظور بررسی عدم اتصال غیراختصاصی پرایمرهای طراحی‌شده، از NCBI-Blast استفاده گردید. اختصاصیت پرایمر و عدم آلودگی به DNA ژنومی توسط پیک منحنی ذوب اختصاصی برای ژن‌های *GAPDH* و *JAK2* مشخص گردید. در این تحقیق ازSYBR Green به‌عنوان رنگ فلورسانت استفاده شده است. سیکل دمایی بکار رفته عبارت بود از یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت فعال‌سازی آغازی آنزیم پلیمراز، در ادامه ۴۰ سیکل هر یک شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه است. واکنش‌ها به‌صورت سه‌تایی به همراه یک واکنش بدون الگو برای هر ژن در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی *JAK2* و ژن مرجع

ژن	Sequences 5′→3′	Tm (°C)	وزن محصول PCR (bp)
***JAK2*-F**	TGCCAAAGGACATTCTTCAG	58.85	95
***JAK2*-R**	ACTCCATTTGTCTGTTGCCA	59.14	
***GAPDH*-F**	ATGGAGAAGGCTGGGGCT	62.05	124
***GAPDH*-R**	ATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCTC	61.62	

آنالیز آماری

پس از انجام واکنش تکثیر، ct نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه و به RQ (Relative Quantification) تبدیل شد و سپس اندازه‌گیری میزان بیان ژن با روش ΔΔCt انجام گردید. میزان بیان نمونه‌های بیمار به‌صورت مقایسه‌ای با نمونه‌های نرمال بررسی گردید که در این امر نتایج به‌دست‌آمده نسبت به میزان بیان همان ژن در بافت نرمال است. RQ نمونه‌ها توسط دستگاه محاسبه و نمودار آن رسم گردید و نتایج به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار GraphPad prism 6 نیز به روش T-test آنالیز و رسم گردید.

نتایج

اطلاعات دموگرافیک شرکت‌کنندگان در جدول ۲ قابل‌مشاهده است.

نمودار منحنی تکثیر نمونه‌ها توسط اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسانس به‌وسیله دستگاه Real time PCR (ABI StepOne, USA) صورت گرفت که در آن تکثیر نمونه‌ها تائید کننده افزایش میزان محصول PCR است (نمودار ۱). تائید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرهای طراحی‌شده و نیز عدم آلودگی به DNA ژنومی با بررسی پیک منحنی ذوب اختصاصی در دمای ۷۷/۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

جدول ۲- مشخصات خون‌شناسی و معیارهای ورود و خروج نمونه‌های بیمار

شاخص	اطلاعات
سن بیماران	**Mean (±SD)**
۳۲-۷۴	۵۳ (±SD=۹/۸۱)
جنسیت	**تعداد بیماران (٪)**
مرد	۱۸ (٪۶۰)
زن	۱۲ (٪۴۰)
متغیرهای بالینی بیماران	**تعداد بیماران (٪)**
سلول‌های سفید ($\times10^9$/L)	
≤۱۰	۲۰(٪۶۶/۷)
۱۰ >	۱۰(٪۳۳/۳)
هموگلوبین (g/dl)	
≤۸۰	۲۲(٪۷۳/۳)
۸۰>	۸ (٪۲۶/۷)
پلاکت ($\times10^9$/L)	
≤۵۰	۱۳ (٪۴۳/۳)
۵۰>	۱۷(٪۵۶/۷)
بلاست مغز استخوان	
≤۵۰	۱۲(٪۴۰)
۵۰>	۱۸(٪۶۰)
دسته‌بندی بر اساس FAB*	
M1	۱ (٪۱/۳۳)
M2	۱۰ (٪۳۳/۳)
M3	۷ (٪۲۳/۳)
M4	۶ (٪۲۰)
M5	۲ (٪۶/۸)
M6	۳ (٪۱۰)
M7	۱ (٪۳/۳)

WBC white blood cell, *HGB* hemoglobin, *PLT*, platelet, FAB French American British

درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت (نمودار ۲). نمودار منحنی استاندارد برای ژن‌های *JAK2* و *GAPDH* در غلظت‌های ۱۰ پارتیکل تا ۱۰ هزار پارتیکل انجام شد (نمودار ۳).

نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن *JAK2* در افراد بیمار به‌طور میانگین ۳/۸۵۴ برابر نسبت به افراد نرمال افزایش داشته و ازلحاظ آماری نیز معنی‌دار است (P=0.0001) (نمودار ۴).

با بررسی نتایج بین دو گروه افراد بالای ۵۰ سال و پایین ۵۰ سال ارتباط معنی‌داری بین سن افراد و میزان بیان ژن مشاهده نگردید (P=0.753). نتایج حاصله از ارتباط بین جنسیت و میزان بیان ژن *JAK2* نیز نشان‌دهنده بی‌معنی بودن ارتباط بین این متغیر و تغییر بیان ژن است (P=0.494).

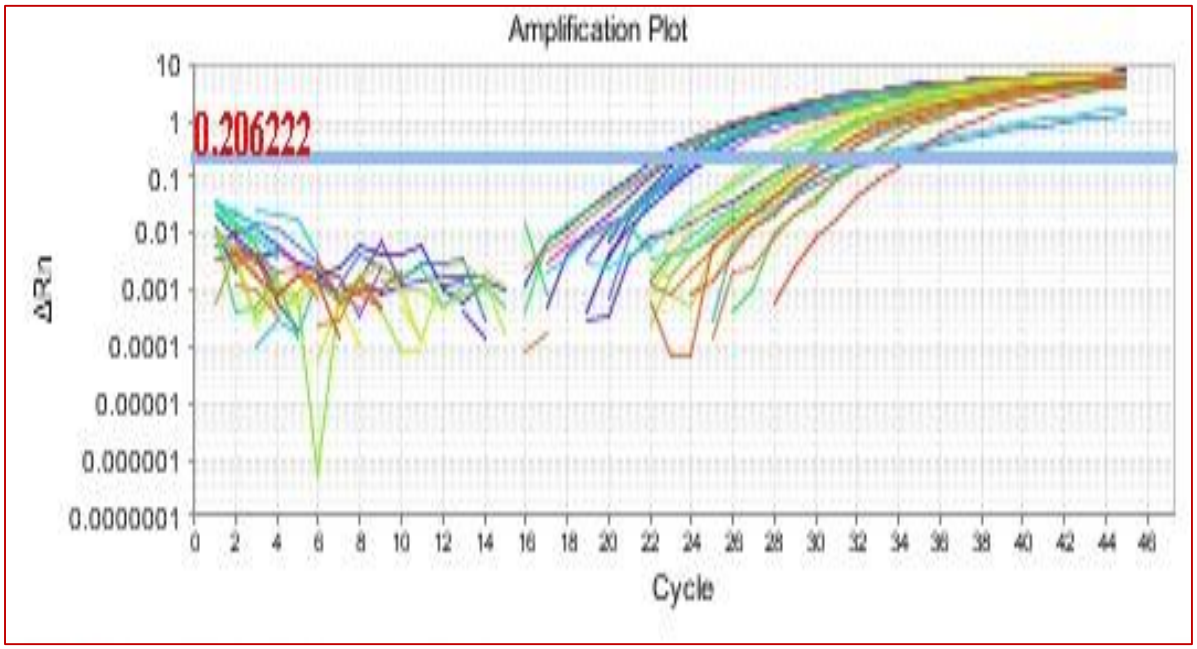
بحث

AML، مجموعه‌ای از بیماری‌های سلول‌های خونی مانند سلول‌های بنیادی و یا رده خاصی از سلول‌ها است که از تجمع سلول‌های بلاست درنتیجه تکثیر گرانومونوسیت‌های تغییریافته در مغز استخوان ایجاد می‌گردد. در این بیماری توانایی تمایز سلول‌های اولیه به سلول‌های بالغ کاهش‌یافته و توانایی تکثیر این سلول‌ها افزایش می‌یابد (۱۹). ژن *JAK2* در تکثیر، رگ زایی، تضعیف سیستم ایمنی و ضد آپوپتوزیسی سلول‌های سرطانی نقش دارد (۲۰). برای جلوگیری از تشکیل سلول‌های سرطانی خونی و عملکرد صحیح سلول‌های نرمال خونی، میزان سطح و فعالیت پروتئین JAK2 به‌طور دقیق تنظیم می‌شود. این پروتئین نقش مهمی در گسترش سرطان خون بازی می‌کند و عدم تنظیم مسیر سیگنالینگ آن باعث بروز انواع سرطان‌های خونی می‌شود (۲۱، ۲۲). مسیر تغییر، تبدیل و فعال‌کننده پروتئین‌های رونویسی (STAT)، شامل خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی است که فعالیت آن‌ها در بسیاری از مسیرهای بیولوژیکی، شامل تکثیر، آپوپتوزیس و گسترش سلول‌های سرطانی نقش دارد (۲۳، ۲۴). شواهد نشان می‌دهند که سیگنالینگ نابجای *JAK2* با طیف گسترده‌ای از تومورها در ارتباط بوده و نقش مهمی در تکثیر، تمایز و مرگ سلولی ایفا می‌کند؛ بنابراین فعال شدن غیرطبیعی مسیر JAK/STA نقش مهمی در پاتوژنز سلول‌های خونی و سرطانی شدن آن‌ها بازی می‌کند (۲۵، ۲۶). به‌عنوان‌مثال در مدل موشی که نقص در بیان *JAK2* وجود دارد، عدم پاسخ به سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های پیش ساز اریتروئیدی، باعث مرگ در دوران جنینی می‌گردد (۱۶، ۲۷). مسیر JAK/STAT راهی

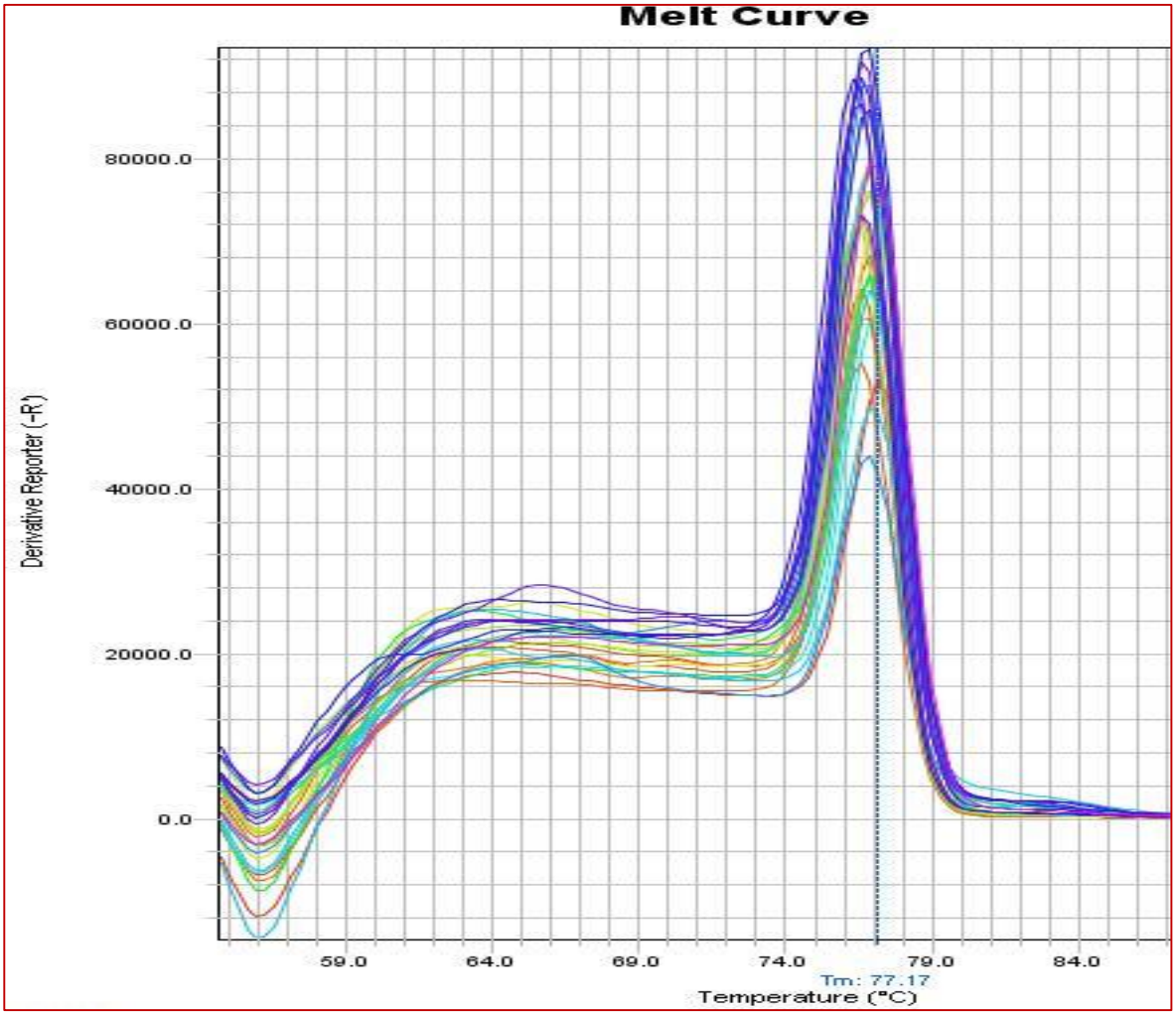
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019



نمودار ۱- نمودار منحنی تکثیر ژن *JAK2*

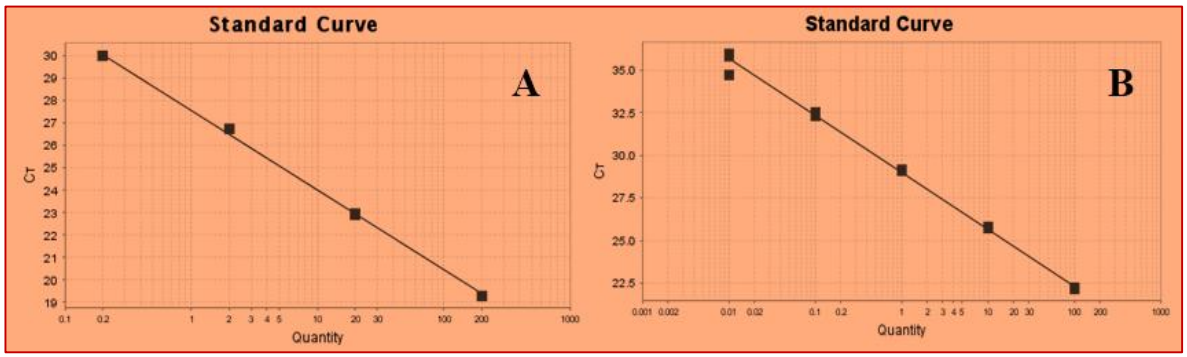


نمودار ۲- نمودار منحنی ذوب ژن *JAK2*

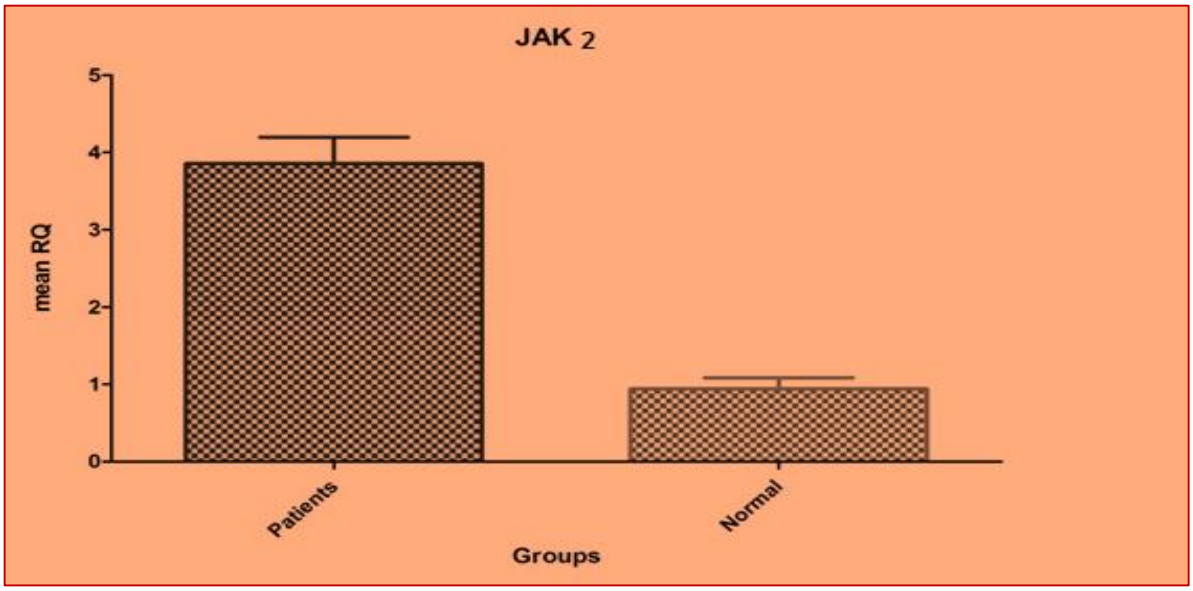
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019



نمودار ۳- نمودار استاندارد پرایمرهای A: *JAK2* و B: *GAPDH*



نمودار ۴- مقایسه بیان ژن *JAK2* بین افراد بیمار و سالم

برای انتقال سیگنال‌های خارجی به داخل سلول است که شامل سه جزء اساسی گیرنده، پروتئین کینازی Janus، یک مبدل سیگنال و تقویت‌کننده و فعال‌کننده رونویسی STAT است. این مسیر بیشتر در گلبول سفید کاربرد داشته و موجب تنظیم سیستم ایمنی می‌گردد (۸). بااتصال لیگاندهایی مانند اینترلوکین‌ها، اینترفرون‌ها و هورمون‌ها، فعالیت آنزیمی مسیر JAK/STAT فعال‌شده و موجب فسفریلاسیون برخی از پروتئین‌ها و یا خود گیرنده می‌شود. بخش‌های فسفریله شده به پروتئین‌های دارای حوزه SH2 اجازه اتصال می‌دهند. یکی از این پروتئین‌ها، STAT است و ازآنجایی‌که STAT3 در فرودست مولکول *JAK2* قرار دارد، JAK2 باعث فسفریلاسیون این پروتئین شده و با دایمریزاسیون و انتقال پیام به هسته و اتصال به پروموتر ژن‌ها، فرایند رشد، تمایز و یا مرگ سلولی تنظیم می‌گردد (۲۸، ۲۹). شواهد حاکی از آن است که تغییر بیان ژن *JAK2* با تکثیر، تمایز سلولی و آپوپتوزیس ارتباط مستقیم دارد (۳۰، ۳۱). در نتایج اخیر گزارش شده است که *JAK2* به‌عنوان انکوژن رفتار کرده و تغییر بیان این ژن در مسیرJAK/STAT در سرطان سینه به‌وضوح دیده‌شده است. در این تحقیق نشان داده شده است که کاهش سطح JAK2 باعث بقاء سلول‌ها و القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی سینه می‌شود (۲۰). نقش مسیر JAK/STAT و مهار *JAK2* در بیماران مبتلابهAML توسط دیگر تحقیقات نیز نشان داده شده است (۱۳). در سال ۲۰۱۵، Wang و همکاران بیان بالای *JAK2* را در بیماران مبتلابه سرطان ریه در چهار رده سلولی (A549, H1299, H1650,H358) گزارش کردند (۳۲). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ توسط Hou بر روی بیماران مبتلابه سرطان پانکراس

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

انجام گرفت نشان داده شده است که کاهش بیان *JAK2* باعث کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپاپتوز می‌شود (۳۳). همچنین تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ توسط Wu به‌وسیله روش Real time-PCR انجام شد، نشان داد که کاهش بیان *JAK2* باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان معده شده است (۳۴). تحقیق انجام‌شده در سال ۲۰۱۰ توسط Ding نشان داد که در سلول‌های سرطانی معده افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در میزان پروتئین *JAK2* وجود دارد (۳۵). افزایش بیان این ژن در بیماران مبتلابه AML نیز مشاهده شده است، همچنان که یافته‌ها در تحقیق حاضر نشان داد که ارتباط معناداری بین افزایش بیان ژن *JAK2* با خطر ابتلا به AML در جمعیت موردمطالعه وجود دارد (P=0.0001). تحقیق حاضر نتیجه اولین مطالعه‌ای است که به بررسی بیان ژن در بیماران مبتلابه سرطان خون میلوئیدی حاد در جمعیت ایرانی پرداخته است و هم‌راستا با دیگر تحقیقات انجام‌شده، افزایش بیان ژن *JAK2* در بیماران در مقایسه با گروه کنترل به‌وضوح به چشم می‌خورد. شواهد بسیاری گواه این است که مسیر JAK2/STAT3 در بسیاری از انواع سرطان‌ها افزایش بیان داشته که باعث القا تکثیر، تمایز و افزایش ضد آپوپتوزی شده است (۳۶، ۳۷)؛ بنابراین، ممانعت از بیان JAK2 به‌عنوان یک عامل استراتژی جدید ضد سرطان گسترش داده‌شده است (۴۰-۳۸). به همین علت این مسیر به‌عنوان هدف مهمی در درمان بسیاری از سرطان‌های انسانی در نظر گرفته می‌شود. AML، نتیجه تأثیر موتاسیون و یا تغییر در الگوی ژن‌هایی است که در تکثیر، بقا، تمایز و آپوپتوز نقش دارند؛ بنابراین، شناخت مارکرهای مولکولی باعث درک بهتر نقش جهش‌های ژنی در این بیماری شده و درنتیجه می‌تواند پایه‌ای برای توسعه داروهای جدید و استفاده صحیح از عوامل ضد لوسمی فراهم کند. یکی از محدودیت‌های تحقیق حجم کم نمونه‌ها است که در مطالعات بعدی بررسی بیان این ژن در دیگر انواع سرطان‌های خون و همچنین بررسی بیان ژن‌های دیگر درگیر در این مسیر با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

عوارض جانبی بعد از شیمی‌درمانی در بیماران مبتلابه AML باقی‌مانده و امکان عود مجدد بیماری وجود دارد. به همین دلیل یافتن بیومارکرهای مولکولی جهت تشخیص به‌موقع بیماری و درمان آن ضروری به نظر می‌رسد؛ بنابراین، بررسی میزان بیان ژن *JAK2* می‌تواند به‌عنوان عامل تشخیصی استفاده شود و در تعیین پیش‌آگهی بیماران مبتلابه AML نقش مهمی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق نتیجه پایان‌نامه دانشجویی با کد ۲۹۸۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۳ در دانشگاه آزاد واحد پرند است. نویسندگان مقاله از افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌ها از بیمارستان میرزا کوچک خان جنگلی ما را یاری نمودند کمال تشکر و امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Yazdi AH, Moslemi E, Mahmoudi LR, Taghavi A, Izadi A. Ubiquitin D gene expression in types of leukemia. Research in Medicine. 2017;41(1):45-49 [In Persian].
2. Shin SY, Lee ST, Kim HJ, Cho EH, Kim JW, Park S, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. Oncotarget. 2016; 7(34):54825-54837.
3. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet. 2006; 368(9550):1894-1907.
4. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, et al. Eds. Williams Hematology. 9th ed. United States of America: McGraw-Hill Education; 2016.
5. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2010; 24(1):35-63.
6. Nichol JN, Assouline S, Miller WH. The etiology of acute leukemia. In: Neoplastic Diseases of the Blood. New York, NY: Springer New York; 2013:177-198.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

7. Bonnet, D. Dick, JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3:730–737.
8. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2000;103(2):211-225.
9. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 Tyrosine Kinase by Its Pseudokinase Domain. Mol Cell Biol. 2000; 20(10): 3387–3395.
10. Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. Immunity 2003;19(2):159-163.
11. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. J Biol Chem. 2007;282(28):20059–20063.
12. Barahmand Pour F, Meinke A, Groner B, Decker T. Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. J Biol Chem. 1998;273:12567–12575.
13. Briscoe J, Rogers NC, Witthuhn BA, Harpur AG, Wilks AF, Stark GR, et al. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. EMBO J. 1996;15:799–809.
14. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, Silvennoinen O, O'Shea J. The Janus kinase (Jaks). Genome Biology 2004,5(12):253.
15. Cacalano NA, Migone T, Bazan F, Hanson EP, Chen M, Candotti F, O'Shea JJ, Johnston JA. Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3 receptor interaction domain. EMBO J. 1999;18:1549–1558.
16. Darnell JE Jr, Kerr I M, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994;264:1415–1421.
17. Duhe R J, Farrar W L. Characterization of active and inactive forms of the Jak2 protein tyrosine kinase produced via the baculovirus expression vector system. J Biol Chem. 1995;270:23084–23089.
18. Feng J, Witthuhn B A, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr I M, Ihle J N. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. Mol Cell Biol. 1997;17:2497–2501.
19. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114:937–951.
20. Qian CJ, Yao J, Si JM. Nuclear JAK2: form and function in cancer. Anat Rec (Hoboken) 2011;294:1446–1459.
21. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. 1998. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. Cell 93: 385–395.
22. Kaosheng Lv, Jing Jiang, Ryan Donaghy, Christopher R. Riling, Ying Cheng, Vemika Chandra, et al. CBL family E3 ubiquitin ligases control JAK2 ubiquitination and stability in hematopoietic stem cells and myeloid malignancies. Genes Dev. 2017; 31(10): 1007–1023.
23. Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. Oncogene. 2002;21:8404–8413.
24. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. 2000;19:2474–2488.
25. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms 2012: the John M. Bennett 80th birthday anniversary lecture. Leukemia Research. 2012;36(12):1481–1489.
26. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13):2895–2901.
27. Harrison D A, Binari R, Nahreini T, Gilman M, Perrimon N. Activation of Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. EMBO J. 1995;14:2857–2865.
28. Butturini E, Carcereri de Prati A, Chiavegato G, Rigo A, Cavalieri E, Darra E, et al. Mild oxidative stress induces S-glutathionylation of STAT3 and enhances chemosensitivity of tumoural cells to chemotherapeutic drugs. Free Radic Biol Med. 2013;65:1322–1330.
29. Hsu KW, Hsieh RH, Huang KH, Fen-Yau Li A, Chi CW, et al. Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression. Carcinogenesis. 2012;33:1459–1467.
30. Lai SY, Johnson FM. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. Drug Resist Updat. 2010;13:67–78.
31. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. EMBO J. 2012;31:3513–3523.
32. Wang P, Lv H, Zhou D, Zhang D. miR-204 suppresses non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) invasion and migration by targeting JAK2. Genet Mol Res.2015; 15 (2);1162-1168
33. Hou B-H, Jian ZX, Cui P, Li SJ, Tian RQ, rui Ou J, et al. miR-216a may inhibit pancreatic tumor growth by targeting JAK2. FEBS letters. 2015, 589(17): 2224-2232.
34. Wu X, Zeng Y, Wu S, Zhong J, Wang Y, Xu J. MiR-204, down regulated in retinoblastoma, regulates proliferation and invasion of human retinoblastoma cells by targeting CyclinD2 and MMP-9. FEBS Lett. 2015;589(5):645-650.
35. Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. Cell Res. 2010; 20(7):784-793.

www.SID.ir

Archive of SID

36. Qi QR, Yang ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. World J Biol Chem. 2014;5:231–239.
37. Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. Cancer Res. 2011;71:5020–5029.
38. Verma A, Kambhampati S, Parmar S, Platanias LC. Jak family of kinases in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2003;22:423–434.
39. Hedvat M, Huszar D, Herrmann A, Gozgit JM, Schroeder A, Sheehy A, et al. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. Cancer Cell. 2009;16:487–497.
40. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010;115:3109–3117.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

Oiginal Article

Up-regulation of *JAK2* Gene in Patients with Acute Myeloid Leukemia

Moradi Z, OnsoryKh*

Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Received: 03 Dec 2017 Accepted: 05 May 2018

Abstract

Background & Objective: Acute myeloid leukemia (AML) is the third most prevalent type of cancer in Iran and fifth in the world, which includes 8% of the whole type of cancers. The Janus kinase and transcription activator (JAK-STAT) pathway plays pivotal roles in the regulation of cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis, which is closely related with the development of some hematological diseases. The JAK-STAT is an important signaling pathway which abnormal inactivation of that is involved in leukemia development. One of the important genes in this signaling pathway is *JAK2* and the purpose of this study was to evaluate the *JAK2* gene expression in AML patients and compare it with control group.

Materials & methods: In this case-control study, blood sample from 30 AML patients admitted to Mirzakochak Khan Jangli Hospital, in Tehran in 1395 and 20 healthy individuals as control were collected. RNA was extracted and after cDNA synthesis, the expression of *JAK2* gene was evaluated using Real time PCR (ΔΔCT computational). Statistical analysis was performed through software Graphpad prism 6, using t-test and $P<0.05$ was considered significant.

Results: The results showed there was a statistically significant association between increasing in *JAK2* gene expression in patients compared to the control group (P=0.0001). While no correlation was observed between the age (P=0.753) and sex (P=0.494) of patients with *JAK2* gene up-regulation in the studied population.

Conclusion: Investigating the rate of JAK2 gene expression, can play a significant role in the precaution of patients afflicted with AML.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, *JAK2* gene, Real-time PCR

***Corresponding Author: : Onsory Khadijeh,** Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
Email:onsory@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-5731-6987

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 1157-1166

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 12:35 +0430 on Sunday May 19th 2019