

Molecular study of CALR gene mutations in children with leukemia hospitalized in Kerman hospitals¹

Farzaneh parnak | Master of Biology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran. poursaba@gmail.com
Babak Kheirkhah | Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman branch, Kerman, Iran
(Corresponding Author). babak.kheirkhah4@gmail.com

Abstract

Background: CALR mutation has recently been identified in myeloproliferative neoplasms, but little is known about the occurrence of this mutation in Iran. This study was performed to molecular study of CALR gene mutations in children with leukemia hospitalized in Kerman hospitals.

Material and Methods: The present study was an experimental study. In this study, the mutation of calerticulin was evaluated by simple random sampling in 50 children or in the treatment of myeloproliferative malignancies. To determine the mutation, genomic DNA was first extracted from peripheral blood buffer and mutation was determined by polymerase chain reaction with specific allele. The samples were then sequenced. The results were correlated with demographic factors using SPSS software.

Results: 1.2% of patients with myeloproliferative neoplasms had CALR mutation. The rate of CALR gene mutation in the study group is comparable with previous reported results.

Conclusion: Therefore, according to WHO criteria, polymerase chain reaction with specific allele can be used to identify this mutation in Iranian patients with suspected myeloproliferative neoplasms.

Keywords: Mutation, Calerticulin gene, Leukemia, Thrombocythemia, Myelofibrosis.

1. **The present study is taken from:** Farzaneh Parnak's master's thesis in the field of cellular and molecular biology, supervised by Babak Khairkhah, which was approved on 22/6/97 at the Islamic Azad University, Sirjan Branch.

Received: 2019/09/18 ; **Accepted:** 2020/02/19

**Copyright © the authors

بررسی مولکولی جهش‌های ژن CALR در کودکان مبتلا به سرطان خون بستری در بیمارستان‌های شهر کرمان^۱

فرزانه پرناک | کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران. poursaba@gmail.com
بابک خیرخواه | استادیار، گروه میکروپزشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، ایران (نویسنده مسئول). babakkheirkhah@yahoo.com

چکیده

هدف: جهش CALR به تازگی در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو شناسایی شده است، اما اطلاعات اندکی در مورد بروز این جهش در ایران وجود دارد. مطالعه حاضر جهت بررسی مولکولی جهش‌های ژن CALR در کودکان مبتلا به سرطان خون بستری در بیمارستان‌های شهر کرمان انجام شد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر از نوع مطالعه تجربی بوده و در آن جهش کالرتیکولین با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده در ۵۰ کودک بیمار یا در حال درمان مبتلا به بدخیمی‌های میلوپرولیفراتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین جهش ابتدا DNA ژنومی از بافی کوت تهیه شده از خون محیطی استخراج شد و تعیین جهش به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آلل اختصاصی انجام شد. سپس نمونه‌ها توالی‌یابی شدند. تعیین ارتباط نتایج حاصل با فاکتورهای دموگرافیک با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج: ۱/۲٪ بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مورد بررسی، دارای جهش CALR بودند. میزان جهش ژن CALR در گروه مطالعه قابل مقایسه با نتایج گزارش شده قبلی است.

نتیجه‌گیری: براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آلل اختصاصی می‌توان برای شناسایی این جهش در بیماران ایرانی مشکوک به نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: جهش، ژن کالرتیکولین، سرطان خون، ترومبوسیتمی، میلوپروفیروز.

۱. پژوهش حاضر برگرفته از: پایان‌نامه کارشناسی ارشد فرزانه پرناک، در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، استاد راهنما بابک خیرخواه می‌باشد که در تاریخ ۹۷/۶/۲۲ در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان به تصویب رسیده است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

۱. مقدمه

سرطان دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه‌یافته و سومین عامل در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است (۱،۲). سرطان خون حدود ۸ درصد کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد که در کشورهای توسعه‌یافته بیشتر اتفاق می‌افتد (۳). اگرچه عامل اصلی سرطان خون هنوز ناشناخته است، اما محققان بر این باورند که عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز این بیماری نقش دارند (۴).

طبق طبقه‌بندی WHO در سال ۲۰۰۸ نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو^۱ شامل پلی‌سایتمی ورا^۲، ترومبوسایتمی اولیه یا اساسی^۳، میلو فیبروز اولیه^۴، لوسمی میلوئیدی مزمن^۵، لوسمی نوتروفیلیک مزمن^۶، لوسمی ائوزینوفیلیک مزمن^۷، ماستوسیتوزیس و نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو دسته‌بندی نشده^۸ می‌باشند (۵).

MPNs بدخیمی‌های کلونال خونی هستند که در اثر اختلال در سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایجاد می‌گردند. این اختلالات باعث افزایش فعالیت خون‌سازی می‌شوند و معمولاً با افزایش تولید سلول‌های خونی همراه هستند که عموماً یک رده به صورت غالب افزایش می‌یابد (۶). در برخی موارد افراد با MPNs یا هیچ نوع علائمی ندارند یا ممکن است علائم تا سال‌ها قبل از شناخته شدن به صورت خفیف بمانند (۷). این علائم شامل: نتایج CBC غیرطبیعی، بزرگ شدن طحال^۹ یا کبد^۱، درد شکمی، لخته شدن بیش از حد (به عنوان مثال لخته شدن خون در ورید یا شریان)، کبودی و خونریزی آسان، سردرد، سرگیجه، مشکلات بینایی. از این رو یافتن جهش‌های

-
1. MPNs: Myeloproliferative neoplasms
 2. Polycythemia vera (PV)
 3. Essential thrombocythemia (ET)
 4. Primary sisolbyfolmym (PMF)
 5. Chronic myeloid leukemia (CML)
 6. Chronic neutrophilic leukemia (CNL)
 7. Chronic (Eosinophilic Leukemia)
 8. MPNU: Myeloproliferative neoplasm unclassifiable
 9. Splenomegaly
 10. Hepatomegaly

جدید و بیومارکرهای تازه کشف شده می‌تواند در افتراق و شناسایی MPNs کمک‌کننده و مفید باشند (۷، ۸).

از جمله این بیومارکرها، جهش تازه کشف شده کالرتیکولین^۱ می‌باشد (۸). این جهش بعد از جهش JAK2، جزء شایع‌ترین ناهنجاری ژنتیکی است که در ۲۵-۲۰٪ از بزرگسالان با ترومبوسیتمی ضروری و ۳۰-۲۵٪ از بزرگسالان با میلوپروز اولیه دیده می‌شود (۹). کالرتیکولین برای بار نخست به عنوان پروتئینی که در شبکه اندوپلاسمیک با کلسیم پیوند می‌دهد و در کنترل کیفی سنتز پروتئین‌ها و تا خوردن دقیق آنها نقش دارد، مورد شناسایی قرار گرفت (۱۰). در خارج از شبکه اندوپلاسمیک، کالرتیکولین در قسمت‌های مختلف سلول با نقش‌های گوناگون از قبیل پاکسازی سلول‌های آپوپتوز شده، چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها، ذخیره کلسیم، سیگنال‌دهی در رابطه با کلسیم، تنظیم بیان ژن‌های حساس به هورمون‌های استروئیدی و پاسخ‌های خودایمنی مشاهده شده است (۹، ۱۰). جهش سوماتیک در آگزون شماره ۹ ژن کالرتیکولین به عنوان شایع‌ترین اختلال کروموزومی در ترومبوسیتمی اولیه (ET) و مایلوپروز اولیه (PMF) در مواردی که جهش JAK2 منفی است، در دسامبر ۲۰۱۳ گزارش گردید (۹). تمام جهش‌های CALR به صورت اضافه شدن^۲ و یا حذف نوکلئوتیدی در آخرین آگزون (آگزون ۹) روی می‌دهد که منجر به تغییر الگوی قرائت ژنتیکی^۳ می‌گردد (۱۱).

با وجودی که تاکنون بیش از ۵۰ جهش گوناگون در ژن CALR مشاهده شده است، ولی دو جهش اختصاصی با حذف ۵۲ جفت باز (bp۵۲) یا جهش تایپ یک و دیگری با اضافه شدن ۵ جفت باز یا جهش تایپ دو بیشتر از ۸۰٪ جهش‌های CALR را شکل می‌دهند (۹). با توجه به اینکه جهش‌های فوق در سرطان‌های لنفوئیدی و بافت توپر مشاهده نگردیده، می‌توان از آنها به عنوان نشانه ایده‌آل تشخیصی در ET و PMF استفاده کرد (۱۲). مطالعات نشان می‌دهد که افراد با جهش‌های CALR در کل میزان بقاء آنها بیشتر از افراد با جهش‌های JAK2 یا MPL (لوسمی میلوپرولیفراتیو) می‌باشد. همچنین افراد با این جهش نسبت به دیگر افراد ترومبوسیتمی ضروری با

1. CALR: Calreticulin

2. Insertion

3. Frameshift

جهش مثبت JAK2، خطر کمتری برای ترومبوز دارند (۱۳).

مطالعه حاضر جهت بررسی مولکولی جهش‌های ژن CALR در کودکان مبتلا به سرطان خون بستری در بیمارستان‌های شهر کرمان انجام شد.

۲. روش کار

مطالعه حاضر از نوع موردی-شاهدی در سال ۱۳۹۷ انجام شد. ابتدا خون ۵۰ نفر از کودکان مبتلا به سرطان خون که به بیمارستان‌های شهر کرمان مراجعه نموده بودند و همچنین خون ۵۰ نفر افراد سالم بدون هرگونه پیشینه سرطان خون، جمع‌آوری شد. افراد سالم حین مراجعه برای خون‌گیری از لحاظ سابقه خانوادگی ابتلا به هرگونه سرطان و همچنین از لحاظ دارا بودن فاکتورهای خطر ابتلا به سرطان خون مورد پرسش قرار گرفتند و در صورت دارا بودن هرگونه سابقه سرطان در خانواده یا دارا بودن عوامل پرخطر، از لیست افراد سالم حذف شدند. همه نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در 20°C به مدت حداقل ۲۴ ساعت نگهداری شدند. حجم نمونه براساس فرمول محاسبه حجم نمونه فرمول کوکران، با سطح خطای ۵ درصد، ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه گروه کنترل تخمین زده شد.

به منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون با نام «CAT NO»: PR881612CinnaPure-DNA CinnaPure-DNA (whole blood, serum and plasma), 50 Preps استفاده شد و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) در $\text{OD} = 260/280 = 1.8-2\text{nm}$ آنالیز گردید.

سپس واکنش Tetra-primers Arms PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر ۱۰x PCR Buffer، ۲ میکرولیتر ۲۵mM MgCl_2 ، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰mM dNTPs، ۰/۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی (۱۰۰pM) (جدول شماره ۱)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱۷/۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲ میکرولیتر DNA (با غلظت ۱/۹ نانوگرم) برای هر نمونه مورد نظر استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی مورد نظر برای انجام واکنش PCR با استفاده از گرادایانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با دنا توراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برای ۳۵ سیکل شامل: دنا توراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۷ درجه سلسیوس برای ۴۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس برای

۶۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای مشاهده پلی مورفیسم ژنومی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵% در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر 1× TBE (یک برابر) انجام شد.

۳. یافته‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی از کودکان بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر کرمان در مجموع ۱۰۰ نفر به عنوان گروه مورد و شاهد انتخاب شده و از نظر پلی مورفیسم ژن CALR مورد بررسی قرار گرفتند. افراد گروه مورد شامل ۵۰ نفر بیمار مبتلا به سرطان خون، که وجود سرطان در آنها و درجه سرطان تشخیص داده شده، بودند. همچنین ۵۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد پس از دو مرحله غربالگری انتخاب شدند. افراد گروه شاهد فاقد هرگونه سابقه ابتلا به سرطان در خود فرد و یا بستگان درجه اول و دوم بوده و وجود سرطان در این افراد رد گردید. در این مطالعه تعداد ۵۰ کودک با مراحل مختلف بیماری سرطان خون مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج tetra ARMS PCR در ژن CALR در جمعیت سالم نشان داد که تنها ۸ نفر هتروزیگوت برای آلل T و مابقی موارد برای آلل‌های A و T هوموزیگوت بودند (شکل ۱).

در این مطالعه ۲۰ فرد فاقد آلل A و ۴ نفر هم فاقد آلل T بودند. همچنین ۲۶ نفر هتروزیگوت برای هر دو آلل A و T بودند (شکل ۲).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد و هیچ اختلاف معنی‌داری بین افراد گروه بیمار با گروه کنترل وجود ندارد (جدول ۲ و ۳).

۴. بحث

عموماً پلی مورفیسم‌ها، مستقیماً با بیماری‌های خاص در ارتباط نیستند، ولی ابزارهای مفیدی برای مطالعه بیماری‌های مولتی فاکتوریال (چند عاملی) هستند (۱۴). نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که پلی مورفیسم ژن CALR در ناحیه پروموتور در ارتباط است، اما پلی مورفیسم قرار گرفته در ناحیه +۳۹۵۴ از نظر آماری ارتباط معنی‌داری را با خطر افزایش بیماری نشان نداد. شواهد نشان داد که آنالیز SNPsها (پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی) می‌تواند ژن‌های مرتبط با بیماری‌ها را مشخص و همین‌طور دانش ما را در مورد رشد و پیشرفت نئوپلاسم‌ها افزایش دهد (۱۵). پلی مورفیسم‌هایی که در نواحی تنظیمی یا ساختاری رخ می‌دهند،

می‌توانند سطح بیان ژن‌های مرتبط با واکنش‌های ایمنولوژیکی را تغییر دهند. به نظر می‌رسد که ژن‌های مستعدکننده با دیگر ژن‌ها و فاکتورهای محیطی در تعامل هستند و پیشرفت بیماری را سرعت می‌بخشد (۱۶).

Pietrowski و همکارانش در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اروپای میانه انجام شد، گزارش دادند که بین پلی‌مورفیسم ۵۱۱- در ژن CALR و سرطان خون ارتباط وجود دارد، ولی در پلی‌مورفیسم ۳۹۵۴+ این ژن ارتباطی پیدا نشده است (۱۷). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم ژن CALR در بعضی نژادها و قومیت‌ها که در معرض بعضی از عوامل محیطی خاص هستند، یک فاکتور مستعدکننده سرطان خون باشد، ولی در جمعیتی دیگر این‌طور نباشد.

پلی‌مورفیسم‌های متعددی از ژن CALR شناسایی شده که از جمله پلی‌مورفیسم C677T و A1298C دارای شیوع بالاتری بوده که از مهم‌ترین و فراوان‌ترین پلی‌مورفیسم‌های این ژن می‌باشند و باعث کاهش فعالیت این آنزیم می‌شوند. پلی‌مورفیسم MTHFR C677T شامل جایگزینی C→T در جفت باز ۶۷۷ در آگزون ۴ است که سبب جایگزینی والین با آلانین در اسید آمینه ۲۲۲ می‌شود (۱۷).

Sull و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر پلی‌مورفیسم MTHFR C677T بر پیشرفت سرطان خون در کره را بررسی کردند. برطبق نتایج گزارش شده در افراد دارای ژنوتیپ TT، خطر ابتلا بیشتری برای سرطان مشاهده شد (۱۸).

Mei و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای در چین دریافتند که بین پلی‌مورفیسم MTHFR و آسیب‌پذیری در برابر سرطان رابطه معنی‌داری وجود دارد. به طوری که افراد دارای ژنوتیپ TT دارای بیشترین خطر ابتلا به سرطان خون می‌باشند (۱۹).

در مطالعه‌ای که توسط Lambropoulos و همکاران در سال ۲۰۰۳ در یونان انجام شد، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم MTHFR C677T و خطر دیسپلازی سرطان یافت نشد. فراوانی ژنوتیپ CC در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (۲۰).

این نتایج مختلف ممکن است به علت زمینه ژنتیکی متفاوت جمعیت‌های مورد مطالعه، یا اینکه بر اثر هتروژنوسیتی مرتبط با پلی‌مورفیسم ژن‌های خاص در جمعیت‌های مختلف باشد.

Zoodsma و همکارانش در مطالعه‌ای کاهش خطر ابتلا به سرطان سرویکس را در افراد هموزیگوت و هتروزیگوت دارای آلل T مشاهده کردند و آلل C، با افزایش خطر ابتلا به سرطان و CIN همراه بود (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Shekari و همکاران در سال ۲۰۰۸ در شمال هندوستان انجام شد، بر کاهش ریسک ابتلا به سرطان در افراد دارای ژنوتیپ CT و CT+TT تأکید شده است (۲۲).

با توجه به نتایج این تحقیق در راستای سایر تحقیقات انجام یافته، به نظر می‌رسد در افراد دارای آلل T، کاهش ریسک ابتلا به بیماری وجود دارد. افراد دارای ژنوتیپ CC، 82/4 برابر بیشتر نسبت به افراد هتروزیگوت CT و هموزیگوت TT، در معرض خطر ابتلا به سرطان خون می‌باشند. از طرفی با توجه به عدد OR محاسبه شده برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها و استیج بیماری، کودکان دارای ژنوتیپ CT و TT، میزان پیشرفت بیماری در استیج CIN III و IC نسبت به ژنوتیپ CC کمتر می‌باشد. به عبارتی در افراد دارای ژنوتیپ CC احتمال پیشرفت بیماری به CIN III بیشتر خواهد بود.

همچنین استیج بیماری و سن بیمار نیز بررسی شد. همبستگی پایین ($r=0/1$) و غیرمعنی‌داری بین استیج بیماری و سن بیمار وجود دارد که از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P=0/32$). بنابراین، با استفاده از داده‌های جمع‌آوری شده و نتایج حاصل از آنالیز آماری، می‌توان این چنین نتیجه گرفت که بین بیمار و استیج بیماری رابطه‌ی معناداری وجود ندارد. در یک نگاه کلی به نتایج ذکر شده در جمعیت مورد بررسی در این تحقیق به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم MTHFR C677T در حالت هتروزیگوت (CT) و هموزیگوت موتان (TT) با کاهش خطر ابتلا به سرطان خون در ارتباط است.

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت سرطان خون پیشنهاد می‌شود این پلی مورفیسم در جوامع بزرگ‌تری بررسی شود. دستیابی به نتایج متفاوت در تحقیقات مختلف ناشی از عوامل تاثیرگذاری از جمله وجود تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف، تفاوت جغرافیایی، شیوه متفاوت زندگی می‌باشد. از این‌رو غربال‌گری و شناسایی ژنوتیپ‌ها در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف در تخمین خطر ابتلا به

سرطان‌ها و پیشبرد اهداف درمانی مفید و راه‌گشا خواهد بود.

۶. تشکر و قدردانی

پژوهشگران این تحقیق از همکاران و پرسنل محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و همچنین سرکار خانم زهرا معصومعلی نژاد، که در انجام این مطالعه، کمال همکاری و حمایت را داشتند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

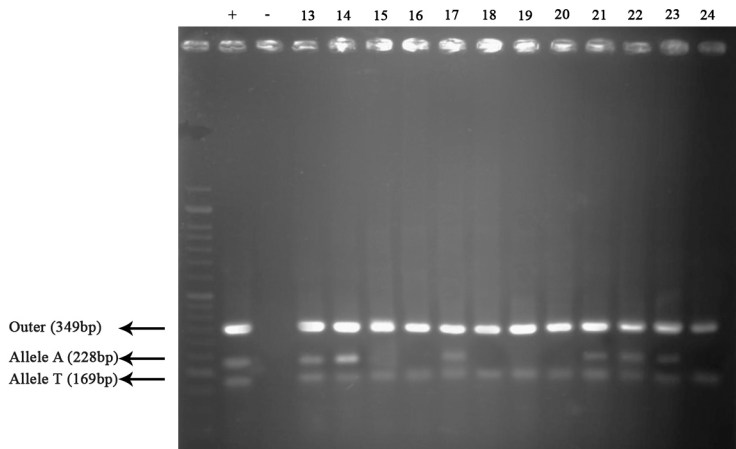
1. Ranjbar-Zeidabadi H, Kheirkhah B. Molecular isolation of a human papilloma virus from blood serum in patients with leukemia in Kerman. *Feyz*. 2018; 22(4): 355-61.
2. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 518-27.
3. World Cancer Report 2014. World Health Organization; 2014. p. Chapter 5.13. ISBN 9283204298.
4. Hutter JJ. Childhood leukemia. *Pediatr Rev*. 2010; 31(6): 234-41.
5. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, Colomer D, Pieri L, Pratorcorona M, Rotunno G, Sant'Antonio E. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014; 124(7): 1062-9.
6. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med*. 2013; 369(25): 2379-90.
7. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med*. 2013; 369(25): 2391-405.
8. Cui Y, Li B, Gale RP, Jiang Q, Xu Z, Qin T, Zhang P, Zhang Y, Xiao Z. CSF3R, SETBP1 and CALR mutations in chronic neutrophilic leukemia. *J. Hematol. Oncol*. 2014; 7(1): 77.
9. Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Hematol*. 2017; 105(6): 743-7.
10. Giona F, Teofili L, Capodimonti S, Laurino M, Martini M, Marzella D, Palumbo G, Diverio D, Foà R, Larocca LM. CALR mutations in patients with essential thrombocythemia diagnosed in childhood and adolescence. *Blood*. 2014; 123(23): 3677-9.
11. Li B, Xu J, Wang J, Gale RP, Xu Z, Cui Y, Yang L, Xing R, Ai X, Qin T, Zhang Y. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2014; 99(11): 1697-700.
12. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, James C, Verger E, Robin M, Socié G, Bidet A, Mahon FX, Cassinat B, Lippert E. Quantification of the mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: application to minimal residual disease evaluation after bone marrow transplantation. *J. Mol. Diagn*. 2016; 18(1): 68-74.
13. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, Sant'Antonio E, Abbonante V, Moccia F, Casetti IC, Bellini M. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016; 30(2): 431.
14. Tutt AN, van Oostrom CT, Ross GM, Van Steeg H, Ashworth A. Disruption of Brca2

- increases the spontaneous mutation rate in vivo: synergism with ionizing radiation. *EMBO reports*. 2002; 3(3): 255-60.
15. Tamandani MK, Sobti RC, Shekari M, Mukesh M, Suri V. Expression and polymorphism of IFN- γ gene in patients with cervical cancer. *Exp. Oncol.* 2008; 30(3): 224-9.
 16. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(10): 3291-300.
 17. Pietrowski D, Thewes R, Sator M, Denschlag D, Keck C, Tempfer C. Uterine Leiomyoma is Associated with a Polymorphism in the Interleukin 1- β Gene. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009; 62(2): 112-7.
 18. Sull JW, Jee SH, Yi S, Lee JE, Park JS, Kim S, Ohrr H. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T on cervical cancer in Korean women. *Gynecol. Oncol.* 2004; 95(3): 557-63.
 19. Mei Q, Zhou D, Gao J, Shen S, Wu J, Guo L, Liang Z. The association between MTHFR 677C > T polymorphism and cervical cancer: evidence from a meta-analysis. *BMC cancer.* 2012; 12(1): 467.
 20. Lambropoulos AF, Agorastos T, Foka ZJ, Chrisafi S, Constantinidis TC, Bontis J, Kotsis A. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T is not associated to the risk of cervical dysplasia. *Cancer letters.* 2003; 191(2): 187-91.
 21. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, Van Der Steege G, de Vries EG, Te Meerman GJ, van der Zee AG. Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J. Med. Genet.* 2005; 42(8): e49.
 22. Shekari M, Sobti RC, Tamandani DM, Suri V. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) codon (677) and methionine synthase (MS) codon (2756) on risk of cervical carcinogenesis in North Indian population. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2008; 278(6): 517-24.
 23. Wu S, Lu S, Tao H, Zhang L, Lin W, Shang H, Xie J. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol., Med. Sci.* 2011; 31(1): 114-9.

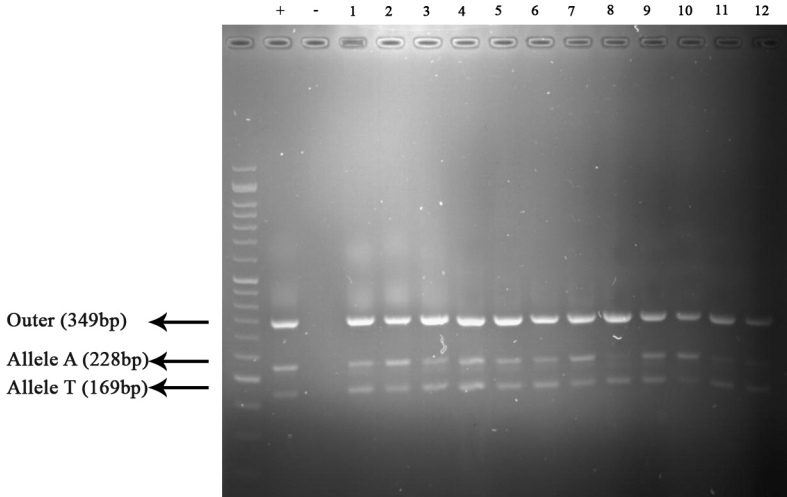
جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی پلی مورفیسم ژن CALR (۲۳)

نام پرایمر	توالی
Forward inner primer	5'-TCTAGAAATAAAAAAGCATAAAT-3'
Reverse inner primer	5'-ACAATTTGGTGAATTATCCAT-3'
Forward outer primer	5'-ATTGGCTGGCTTATCTTCA-3'
Reverse Outer primer	5'-TGGTTTCTTCCTGGCTCT-3'

شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نمونه کنترل با استفاده از آغازگر اختصاصی T allele (۱۶۹ bp)، A allele (۲۲۸ bp) و Outer primer (۳۴۹ bp)



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR نمونه بیمار با استفاده از آغازگر اختصاصی A allele (۲۲۸ bp) و T allele (۱۶۹ bp) و Outer primer (۳۴۹ bp)



جدول ۲- نتایج آنالیز آماری از دیدگاه تعادل هاردی - واینبرگ

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium	
	Controls	Cases
	n11= 2 (1.11)	n11= 8 (5.58)
	n12= 3 (4.77)	n12= 9 (13.84)
	n22= 6 (5.11)	n22= 11 (8.58)
	f_a1= 0.32 +/-0.116	f_a1= 0.45 +/-0.077
	F= 0.37143	F= 0.34968
	p = 0.217990 (Pearson)	p = 0.064268 (Pearson)
	p = 0.224650 (Llr)	p = 0.061999 (Llr)
	p = 0.232198 (Exact)	p = 0.066719 (Exact)
SNP2	n11= 28 (20.54)	n11= 48 (0.00)
	n12= 36 (50.91)	n12= (0.00)
	n22= 39 (31.54)	n22= (0.00)
	f_a1= 0.45 +/-0.039	f_a1= 1.00 +/-0.000
	F= 0.29291	F= 0.00000
	p = 0.002952 (Pearson)	p = 0.000e+00 (Pearson)
	p = 0.002795 (Llr)	p = 0.000e+00 (Llr)
	p = 0.002927 (Exact)	p = 0.000e+00 (Exact)

جدول ۳- ارتباط بین تست‌ها از دیدگاه تعادل هاردی - واینبرگ

Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
Risk allele 2				
[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
Odds_ratio=0.579 C.I.=[0.204-1.638] chi2=1.07 p=0.30011 (P)	Odds_ratio=0.750 C.I.=[0.099-5.693] chi2=0.08 p=0.78051	Odds_ratio=0.458 C.I.=[0.073-2.890] chi2=0.71 p=0.40066	Odds_ratio=0.556 C.I.=[0.098-3.158] chi2=0.45 p=0.50371	Odds_ratio=0.671 chi2=0.79 p=0.37498
Risk allele 1				
[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
Odds_ratio=1.728 C.I.=[0.611-4.891] chi2=1.07 p=0.30011 (P)	Odds_ratio=1.636 C.I.=[0.317-8.454] chi2=0.35 p=0.55509	Odds_ratio=2.182 C.I.=[0.346-13.756] chi2=0.71 p=0.40066	Odds_ratio=1.855 C.I.=[0.453-7.584] chi2=0.75 p=0.38714	Odds_ratio=1.486 chi2=0.79 p=0.37498
Risk allele 2				
[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
Odds_ratio=0.004 C.I.=[0.000-0.068] chi2=85.34 p=2.511e-20 (P)	Odds_ratio=0.008 C.I.=[0.000-0.136] chi2=39.79 p=2.829e-10	Odds_ratio=0.007 C.I.=[0.000-0.126] chi2=42.28 p=7.917e-11	Odds_ratio=0.004 C.I.=[0.000-0.065] chi2=69.44 p=7.865e-17	Odds_ratio=0.040 chi2=57.17 p=3.994e-14
Risk allele 1				
[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
Odds_ratio=238.903 C.I.=[14.638-3899.140] chi2=85.34 p=2.511e-20 (P)	Odds_ratio=1.082 C.I.=[0.021-55.961] chi2=nan p=1.00000	Odds_ratio=134.439 C.I.=[7.954-2272.197] chi2=42.28 p=7.917e-11	Odds_ratio=59.403 C.I.=[3.562-990.695] chi2=24.50 p=7.418e-07	Odds_ratio=13.523 chi2=57.17 p=3.994e-14

استناد به این مقاله:

پرناک، فرزانه؛ خیرخواه، بابک (۱۳۹۹). بررسی مولکولی جهش‌های ژن CALR در کودکان مبتلا به سرطان خون بستری در بیمارستان‌های شهر کرمان. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۷، ص ۴۷-۶۰.