บทความฟื้นวิชา

การกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* ใน Myeloproliferative Neoplasms

สุพัตรา กันนิ่ม[1] และ จิรายุ เอื้อวรากุล[2]

[1]ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล;

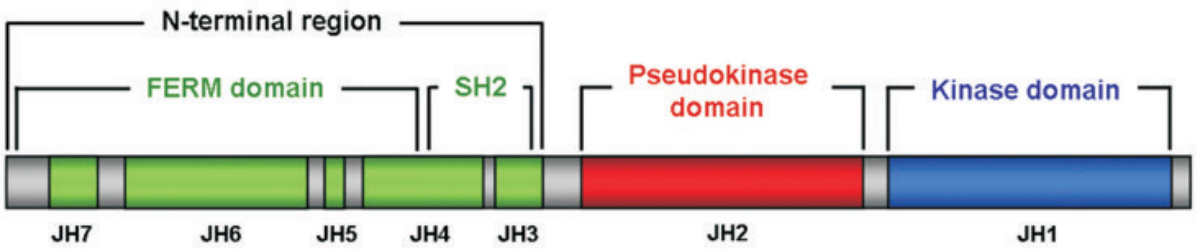
[2]สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ยีน *JAK2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม nonreceptor tyrosine kinase ซึ่งเดิมทีไม่ได้รับความสนใจมากนัก จุดเริ่มต้นสำคัญที่ทำให้มีการศึกษายีน *JAK2* ในมะเร็งระบบโลหิตเป็นผลจากความพยายามที่จะค้นหาความผิดปกติของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณหลังจากการจับกันของซัยโตไคน์และตัวรับที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเม็ดเลือดสายมัยอีลอยด์ เพื่อใช้อธิบายความผิดปกติของโรคในกลุ่มที่ไขกระดูกมีการสร้างเม็ดเลือดมากผิดปกติ (Myeloproliferative neoplasms, MPN) โดยพบว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีน JAK2 ส่งผลให้หยุดการสร้าง endogenous erythroid colony (EEC) ซึ่งเป็นลักษณะผิดปกติที่พบได้บ่อยในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วย MPN บทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับยีน *JAK2* ตั้งแต่ลักษณะโครงสร้างของยีน การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย บทบาทของยีนในโรค MPN รวมไปถึงเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป

Janus Kinase (JAK) family

JAK family เป็นชื่อเรียกของโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่เป็น tyrosine kinase ชนิดที่ไม่ใช่ตัวรับซัยโตไคน์ (nonreceptor tyrosine kinase: NRTK) ซึ่งมีขนาดประมาณ 120-140 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 1,100 ตัว[1] ชื่อ JAK ได้มาจากชื่อของเทพเจ้าโรมัน Janus ที่ทำหน้าที่เฝ้าประตู โดยเป็นเทพเจ้าที่มี 2 หน้า เนื่องจาก JAK มี phosphate-transferring domain ที่เหมือนกัน 2 อันแม้จะทำหน้าที่ตรงข้ามกัน ชื่ออื่นของ JAK ในระยะแรกๆ คือ just another kinase ได้มาจากการค้นพบโปรตีน 2 ตัวคือ JAK1 และ JAK2 ท่ามกลางโปรตีน kinase จำนวนมากที่ได้จากการตรวจกรองด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)[2]

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า JAK family มีสมาชิก 4 ชนิด คือ JAK1, JAK2, JAK3 และ TYK2[1] โปรตีนใน JAK family มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันเรียกว่าโดเมน JAK homology (JH) มีทั้งหมด 7 โดเมน โดเมน JH1 ที่อยู่ทางปลายสุดด้านคาร์บอกซี่ (carboxy terminus) มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟต มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า kinase domain ถัดมาเป็นโดเมน JH2 ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโดเมน kinase domain แต่กลับไม่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต จึงถูกเรียกว่า pseudokinase domain ส่วนทางปลายด้านอะมิโน (amino terminus) มีโดเมนที่เรียกว่า FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) ซึ่งประกอบขึ้นจากโดเมน JH5 ถึง JH7 และบางส่วนของโดเมน JH4 โดยทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับซัยโตไคน์ ส่วนโดเมน JH3 และโดเมน JH4 ที่เหลือมีลักษณะคล้ายโดเมน Src Homology (SH)-2 ในโปรตีนชนิดอื่น จึงถูกเรียกว่าโดเมน SH2-like ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน [3] (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนในกลุ่ม JAK family ประกอบด้วย 7 โดเมน ปลายด้านคาร์บอกซี่ (C-terminal region) ประกอบด้วยโดยเมน JH1 หรือ kinase domain และ JH2 หรือ pseudokinase domain ส่วนโดเมน JH3 ถึง JH7 จะอยู่ทางปลายด้านอะมิโน (N-terminal region)[4]

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ รศ. ดร. พญ. จิรายุ เอื้อวรากุล สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล 2 ถนนพรานนก เขตบางกอกน้อย กทม. 10700 email: sicaw@mahicol.ac.th

ดังที่กล่าวแล้วว่า JAK family เป็น tyrosine kinase ดังนั้นจึงมีหน้าที่หลักในการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine residue) เพื่อก่อให้เกิดการส่งสัญญาณไปควบคุมการทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ โปรตีนเหล่านี้มักจะติดอยู่กับตัวรับซัยโตไคน์ที่ไม่มีความสามารถในการเติมหมู่ฟอสเฟตเองได้ เช่น ตัวรับซัยโตไคน์ประเภทที่ 1 ได้แก่ interleukin-2 receptor (IL-2R), IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-12R, IL-11R, IL-13R, GM-CSF-R, EPO-R และ TPO-R รวมไปถึงตัวรับซัยโตไคน์ประเภทที่ 2 ได้แก่ ตัวรับ interferon (IFN) ชนิด α, β และ γ เป็นต้น[1]

โครงสร้างโมเลกุลและหน้าที่ของ JAK2

ยีน *JAK2* ได้รับการค้นพบในปี ค.ศ. 1989 โดย Andrew Wilks จากการโคลนนิ่ง cDNA ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด FDC-P1 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดของหนู[2] สำหรับยีน *JAK2* ที่พบในคนจะอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 9 ตำแหน่ง 9p24 โดยมี genomic DNA ยาวประมาณ 140 กิโลเบส แบ่งออกเป็น 25 เอ็กซอน[5] ยีน *JAK2* จะถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,132 ตัว โดยปกติโปรตีน JAK2 จะอยู่ภายในเซลล์โดยจับอยู่กับตัวรับซัยโตไคน์ประเภทที่ 1 ที่เป็นตัวกลางสำคัญในการส่งสัญญาณควบคุมการผลิตเม็ดเลือดสายมัยอีลอยด์ ได้แก่ ตัวรับ erythropoietin (EPO-R) ตัวรับ thrombopoietin (TPO-R) หรือตัวรับ IL-3 (IL-3R) เป็นต้น การศึกษาบทบาทของยีน JAK2 ในหนูพบว่า หนูที่ขาดยีน *JAK2* จะเสียชีวิตตั้งแต่ระยะที่เป็นเอมบริโอ เนื่องจากไม่สามารถผลิตเม็ดเลือดแดงได้[6]

กระบวนการส่งสัญญาณผ่าน JAK2 จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการจับกันระหว่างซัยโตไคน์และตัวรับ JAK2 ที่ติดอยู่กับตัวรับนั้น จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับตัวเองได้เป็น JAK2 ในรูปที่กระตุ้นแล้ว (phosphorylated JAK2; p-JAK2) ซึ่ง p-JAK2 จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับตัวรับไซโตไคน์ในตำแหน่งจำเพาะ เพื่อให้เหมาะกับการจับของโปรตีนชนิดอื่นที่ช่วยในการส่งสัญญาณ เช่น STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) หลังจากที่ STAT5 เข้ามาจับที่ตัวรับซัยโตไคน์แล้ว จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต หลังจากนั้น STAT5 ที่ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว (phosphorylated STAT5; p-STAT5) จะหลุดออกจากตัวรับซัยตัวไคน์แล้วจับคู่กันเอง (dimerization) แล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งตัว การอยู่รอด และการพัฒนาของเซลล์เม็ดเลือดต่อไป นอกจากการส่งสัญญาณผ่านทาง JAK2/STAT5 pathway แล้ว JAK2 ยังเป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณผ่านกระบวนการอื่นๆ เช่น RAS/MAPK pathway และ PI3K/AKT pathway เป็นต้น[7] อย่างไรก็ตาม การส่งสัญญาณเหล่านี้สามารถถูกยับยั้งผ่านทางหลายกระบวนการ ได้แก่ การดึงหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation) การจับกับโปรตีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว การทำลาย JAK2 ด้วย proteasome เป็นต้น[8] นอกจากนั้น ส่วน pseudokinase domain ของ JAK2 เองยังเป็นส่วนสำคัญที่ควบคุม kinase activity ของ kinase domain ด้วย การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด 293T พบว่าเซลล์ที่มี JAK2 แบบที่ไม่มี pseudokinase domain มีการกระตุ้นมากกว่าเซลล์ที่มี JAK2 แบบปกติหลายเท่า ซึ่งตรวจสอบได้จากปริมาณ p-JAK2 และ p-STAT5 ที่เพิ่มขึ้น[9]

ชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2*

ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับยีน JAK2 ในระยะแรกๆ เป็นการค้นพบการเชื่อมต่อกันของยีน *JAK2* กับยีนอื่นได้เป็นยีนลูกผสม (fusion gene) ชนิดใหม่ เช่น *TEL-JAK2* ที่พบผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิด Lymphoproliferative disorder[10], *PCM1-JAK2* และ *BCR-JAK2* ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีโครโมโซมผิดปกติชนิด t(8;9)(p22;p24) และ t(9;22)(p24;q11) ตามลำดับ[11,12] ความผิดปกติเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในกระบวนการส่งสัญญาณ อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติเหล่านี้พบได้น้อยมาก โดยมีรายงานเฉพาะในผู้ป่วยบางราย ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 ได้มีการค้นพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในระดับยีนในส่วน pseudokinase ของยีน *JAK2* ซึ่งพบได้บ่อยกว่าการเกิด fusion gene โดยการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะเกิดที่ exon 14 และส่วนน้อยพบที่ exon 12

1) การกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F ใน exon 14

ในปี ค.ศ. 2005 มีนักวิจัยอย่างน้อย 4 กลุ่มรายงานการค้นพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในผู้ป่วยกลุ่มโรค Philadelphia (Ph)-negative MPN[13-16] โดยพบในผู้ป่วยโรคเม็ดเลือดแดงมากผิดปกติ (Polycythemia vera, PV) มากถึง 97% และในผู้ป่วยโรคเกร็ดเลือดมากผิดปกติ (Essential thrombocythemia, ET) และโรคไขกระดูกเป็นพังผืด (Primary myelofibrosis, PMF) ประมาณร้อยละ 50-60 ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับยีนที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,849 ใน exon 14 ของยีน *JAK2* (GenBank accession NM_004972) โดยเปลี่ยนจาก Guanine (G) เป็น Thymine (T) ส่งผลให้การแปลรหัสกรดอะมิโนลำดับที่ 617 ของโปรตีน JAK2 ผิดพลาดจาก valine (V) กลายเป็น phenylalanine (F) เรียกการกลายพันธุ์นี้ว่า *JAK2*V617F ซึ่งกรดอะมิโนลำดับที่ 617 นี้ อยู่ในส่วนของ pseudokinase domain

การวิจัยเพื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ชนิดนี้โดยการใส่ยีน *JAK2*V617F เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีสมบัติพิเศษคือจะเจริญ

ได้ในสภาวะที่มี growth factor เท่านั้น พบว่าในภาวะที่ไม่มี growth factor เซลล์เพาะเลี้ยงที่มียีน *JAK2*V617F สามารถเติบโตได้ดีแตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่มียีน *JAK2* ชนิดปกติ (wild type) ซึ่งจะไม่พบการเจริญเติบโตเลย[13] เมื่อวัดปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน JAK2 ในเซลล์ดังกล่าว พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใส่ยีน *JAK2*V617F มีปริมาณโปรตีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว เช่น p-JAK2, p-STAT5, p-AKT และ p-ERK สูงกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่มียีน *JAK2* แบบปกติอย่างมีนัยสำคัญ[13] การที่เซลล์เพาะเลี้ยงที่มียีน *JAK2*V617F สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มี growth factor สอดคล้องกับการเกิด EEC ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ตัวอ่อนของเม็ดเลือดแดง (erythroid progenitor) ของผู้ป่วย PV สามารถเจริญได้ในหลอดทดลองในภาวะที่ขาด EPO ซึ่งเป็นซัยโตไคน์ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดแดง[17] และสามารถพบลักษณะเดียวกันนี้ในผู้ป่วย ET และ PMF[18-20] ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาถึงผลของยีนกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F ในสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกที่มียีน *JAK2*V617F แสดงลักษณะอาการของโรคคล้ายกับผู้ป่วยโรค PV ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงสูง ปริมาณเม็ดเลือดขาวสูง และม้ามโต เป็นต้น[21,22] นอกจากนี้ หนูบางตัวยังมีการพัฒนาของโรคจนพบพังผืดในไขกระดูกซึ่งคล้ายกับ spent phase ของผู้ป่วย PV[21]

การกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F นอกจากจะพบใน PV, ET และ PMF แล้ว ยังสามารถตรวจพบได้บ้างในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสายมัยอีลอยด์ชนิดอื่นๆ เช่น Ph-negative CML, chronic neutrophilic leukemia (CNL), myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukemia (CMML), megakaryocytic leukemia และ secondary acute myeloid leukemia (AML) โดยมีอุบัติการณ์น้อยกว่าใน PV, ET และ PMF อย่างมาก โดยพบในร้อยละ 18 ของผู้ป่วย Ph-negative CML ร้อยละ 5 ของผู้ป่วย MDS และร้อยละ 13 ของผู้ป่วย CMML[23-28] และยังไม่มีรายงานการกลายพันธุ์ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสายลิมฟอยด์[25, 28, 29]

ในปัจจุบันยังไม่ทราบว่าเหตุใดการกลายพันธุ์ของ *JAK2* เพียงชนิดเดียวจึงทำให้เกิดโรคในลักษณะที่แตกต่างกันได้ถึง 3 โรค คือ PV, ET และ PMF แต่ได้มีผู้นำเสนอแนวคิดเป็น 4 แบบ ได้แก่

1. Gene dosage hypothesis แนวคิดนี้เชื่อว่าปริมาณอัลลีลที่กลายพันธุ์มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโรค การทดลองในหนูพบว่า หนูที่มีปริมาณอัลลีลกลายพันธุ์น้อยจะแสดงอาการคล้ายกับโรค ET (ET-like phenotype) ได้แก่ มีปริมาณเกร็ดเลือดสูง โดยที่ไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดแดง[30] ในขณะเดียวกัน หนูที่มีสัดส่วนของอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์สูงจะพบว่ามีเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นคล้ายกับโรค PV (PV-like phenotype)[21,22] ซึ่งสอดคล้องกับในผู้ป่วย PV ที่มีปริมาณอัลลีลกลายพันธุ์เฉลี่ยอยู่ถึงร้อยละ 54 ของอัลลีลทั้งหมด[31] ส่วนผู้ป่วย ET มีปริมาณอัลลีลที่กลายพันธุ์เฉลี่ยเพียงร้อยละ 24 ของอัลลีลทั้งหมด[32]

2. Genetic modification of host ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละคนส่งผลให้เกิดโรคที่ต่างกัน ดังเช่นการทดลองปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกที่มียีน *JAK2* กลายพันธุ์เข้าไปในหนู 2 สายพันธุ์ พบว่า หนูขาว Balb/C มีเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นร่วมกับอาการม้ามโต และมีเม็ดเลือดขาวสูงด้วย ในขณะที่หนูดำ C57Bl/6 พบเพียงเม็ดเลือดแดงสูงเท่านั้น[22]

3. Pre-existing event มีสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิด clonal hematopoiesis ก่อนที่จะมีการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* จากการศึกษาในครอบครัวที่มีประวัติเป็นโรคในกลุ่ม MPN พบว่าปริมาณแกรนูโลไซท์ที่เป็นโคลนเดียวกัน (clonal granulocytes) มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับสัดส่วนของอีลลีลกลายพันธุ์[33] แสดงให้เห็นว่า มี pre-existing event บางอย่างนำมาก่อนที่จะเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2*

4. Type of cells targeted by *JAK2*V617F ลักษณะ phenotype ของโรคขึ้นกับว่าการกลายพันธุ์นั้นเกิดขึ้นในเซลล์ระดับใด ตัวอย่างเช่น หากเกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ที่มีความสามารถในการผลิตเกร็ดเลือด ก็จะทำให้มีเกร็ดเลือดสูงในกระแสเลือด เป็นต้น ซึ่ง James และคณะพบว่า ลักษณะและชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของผู้ป่วย PV และ PMF นั้นอาจแตกต่างกัน ทำให้มีการแสดงออกของโรค (phenotype) ได้ไม่เหมือนกัน[34]

2) การกลายพันธุ์ใน exon 12

หลังจากที่มีการค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน JAK2 ชนิด V617F คณะวิจัยจากประเทศต่างๆ ก็ได้พยายามตรวจหาการกลายพันธุ์อื่นๆ ในผู้ป่วย Ph-negative MPN โดยเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F นักวิจัยพบการกลายพันธุ์ใน exon 12 ของยีน *JAK2* ได้แก่ F537-K539delinsL, H538QK539L, K539L, N542-E543del เป็นต้น ซึ่งพบได้เฉพาะในผู้ป่วย PV ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ชนิด V617F เท่านั้น[35, 36] ซึ่งการกลายพันธุ์เหล่านี้สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงสามารถเจริญได้ในภาวะที่ไม่ต้องเติมซัยโตไคน์ที่จำเป็นสำหรับการเติบโต และทำให้ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นอย่างมากในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกที่มียีนกลายพันธุ์[35]

อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2*

ตั้งแต่เริ่มต้นมีการค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* ได้มีนักวิจัยจากหลายประเทศรายงานอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ชนิด

*JAK2*V617F ในผู้ป่วย Ph-negative MPN ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ ในปัจจุบัน การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F จัดเป็นเกณฑ์ที่สำคัญที่ใช้เพื่อยืนยันว่า ผู้ป่วยเป็น PV, ET หรือ PMF หรือไม่ ดังตารางที่ 2

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน JAK2

ในช่วงแรกการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน JAK2 จะใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้วนำไปหาลำดับเบสที่ผิดปกติโดยวิธี sequencing[13, 15, 16] (ตารางที่ 1) ซึ่งข้อจำกัดของวิธีนี้คือมีความไวต่ำ สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์เมื่อมีปริมาณอัลลีลที่กลายพันธุ์มีมากกว่าร้อยละ 20 ของอัลลีลทั้งหมด[14, 48] ดังนั้นจึงมีความพยายามค้นคิดวิธีอื่นที่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ในตัวอย่างตรวจที่มีปริมาณอัลลีลกลายพันธุ์น้อยกว่าร้อยละ 20 ดังตัวอย่างต่อไปนี้

วิธี Allele Specific-PCR (AS-PCR) อาศัยการตรวจหายีนกลายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนสาย DNA ที่กลายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ (allele specific) แล้วตรวจสอบ product ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค gel electrophoresis ซึ่งวิธี AS-PCR นี้มีความไวสูง และทำได้สะดวก[14, 40] วิธี Two-round AS-PCR ซึ่งเป็นการทำ AS-PCR ครั้งแรกแล้วตามด้วยการทำซ้ำอีกครั้งโดยใช้สภาวะที่ต่างออกไป ทำให้สามารถตรวจพบอัลลีลที่กลายพันธุ์ได้ต่ำสุดถึงร้อยละ 0.01 ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มความไวของการตรวจได้ถึง 100 เท่าเมื่อเทียบกับวิธี AS-PCR[49]

วิธี PCR-Restriction Fragment Length Polymophism (PCR-RFLP) อาศัยการทำ PCR แล้วตามด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ *Bsa*XI ซึ่งสามารถจดจำลำดับเบสที่คร่อมนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,849 และสามารถตัดสาย DNA ที่มียีน JAK2 ปกติให้เป็นสายสั้นลงได้ ในขณะที่หากเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง

ตารางที่ 1 อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* ชนิด *JAK2*V617F

ประเทศและปีที่รายงาน	เทคนิคที่ใช้ตรวจ	อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F (%/จำนวน case)		
		PV	ET	PMF
สหรัฐอเมริกา ปี 2005[15]	DNA Sequencing	74% (164)	32% (115)	35% (46)*
สหรัฐอเมริกา ปี 2005[37]	DNA Sequencing	95% (38)	55% (22)	30% (10)
สหรัฐอเมริกา ปี 2005[38]	DNA Sequencing	-	49% (150)	-
ฝรั่งเศส ปี 2005[13]	DNA Sequencing	89% (45)	-	-
ฝรั่งเศส ปี 2006[39]	Real-time PCR	95% (80)	-	-
สหราชอาณาจักร ปี 2005[14]	AS-PCR	97% (73)	57% (51)	50% (16)
สหราชอาณาจักร ปี 2005[40]	ARMS	81% (72)	41% (59)	43% (35)
สหราชอาณาจักร ปี 2005[41]	AS-PCR	-	53% (776)	-
สวิตเซอร์แลนด์ ปี 2005[16]	cDNA Sequencing	65% (128)	23% (93)	57% (23)
กรีซ ปี 2007[42]	AS-PCR	81% (43)	69% (111)	58% (12)
จีน ปี 2005[43]	cDNA Sequencing	83% (24)	-	-
จีน ปี 2008[44]	AS-PCR	-	63% (95)	-
จีน ปี 2008[45]	AS-PCR	94% (116)	79% (153)	78% (142)
ไต้หวัน ปี 2008[46]	PCR-RFLP	85% (33)	59% (49)	33% (6)
ไทย ปี 2009[49,50]	*Two-round AS-PCR*	*95% (65)*	*68% (79)*	*65% (17)*

ตัวย่อ AS-PCR, allele specific PCR; ARMS, amplification refractory mutation system; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; *รวมเอาโรค post-PV MF และ post-ET MF ไว้ในกลุ่มนี้ด้วย

ตารางที่ 2 เกณฑ์ในการวินิจฉัย PV, ET, PMF[47]

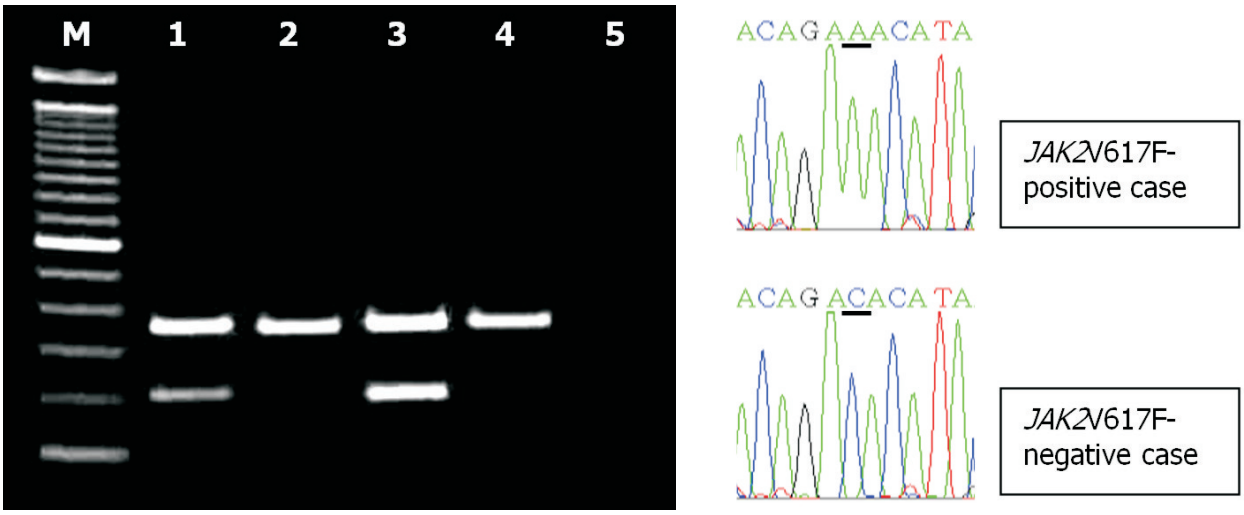
PV (การวินิจฉัย: **A1+A2+one Minor** หรือ **A1+two Minor**)	
Major criteria	**Minor criteria**
A1 ค่าฮีโมโกลบิน >18.5 g/dL ในเพศชาย หรือ 16.5 g/dL ในเพศหญิง หรือพบหลักฐานอื่นๆที่บ่งบอกว่ามีการเพิ่มขึ้นของ red cell volume*	B1 ผลการตรวจชิ้นเนื้อไขกระดูกพบ hypercellularity with trilineage growth (panmyelosis) และมีการเพิ่มจำนวนอย่างชัดเจนของเซลล์ erythroid, granulocytic และ megakaryocytic lineage
A2 พบ *JAK2*V617F หรือยีนกลายพันธุ์ชนิดอื่นที่ทำให้เกิดผลเหมือนกับ *JAK2*V617F ได้แก่ การกลายพันธุ์ใน exon 12 ของ *JAK2*	B2 ระดับ serum erythropoietin (EPO) ต่ำกว่าค่าอ้างอิงในคนปกติ
	B3 พบการเกิด endogenous erythroid colony (EEC) ในหลอดทดลอง

ET (การวินิจฉัย: ต้องเข้าตามเกณฑ์ทั้ง 4 ข้อ)
1. ระดับเกร็ดเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ $450x10^9/L$[#]
2. ผลการตรวจชิ้นเนื้อไขกระดูกพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ megakaryocytic lineage เป็นหลัก โดยมีการเพิ่มจำนวนของ enlarged, mature megakaryocytes และไม่มี significant increase ของเซลล์ตัวอ่อน (left-shift) ของ neutrophil granulopoiesis หรือ erythropoiesis
3. ไม่เข้าตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกในการวินิจฉัยโรค PV, PMF, *BCR-ABL1* positive CML, MDS หรือ myeloid neoplasm ชนิดอื่นๆ
4. พบ *JAK2*V617F หรือ clonal marker อื่น หรือไม่พบ *JAK2*V617F และต้องไม่มีสาเหตุอื่นของ reactive thrombocytosis

PMF (การวินิจฉัย: เข้าตาม Major criteria ทั้ง 3 ข้อและ Minor criteria 2 ข้อ)	
Major criteria	**Minor criteria**
1. ผลการตรวจชิ้นเนื้อไขกระดูกพบ megakaryocyte proliferation and atypia โดยมักพบร่วมกับ reticulin และ/หรือ collagen fibrosis หรือในกรณีที่ไม่พบ reticulin fibrosis การเปลี่ยนแปลงของ megakaryocyte ต้องพบร่วมกับ bone marrow cellularity ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดแกรนูโลไซท์ และมักพบการผลิตเม็ดเลือดแดงน้อยลง (Pre-fibrotic cellular phase)	1. พบ leukoerythroblastosis 2. ระดับ serum lactate dehydrogenase (LDH) สูง 3. มีภาวะซีด 4. ม้ามโต
2. ไม่เข้าตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกในการวินิจฉัยโรค PV, *BCR-ABL1* positive CML, MDS หรือ myeloid neoplasm อื่นๆ	
3. พบ *JAK2*V617F หรือ clonal marker อื่นๆ (เช่น *MPL*W515K/L) หรือในกรณีที่ไม่พบ clonal marker ต้องไม่พบ bone marrow fibrosis หรือการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อ โรคแพ้ภูมิตัวเองหรือภาวะการอักเสบเรื้อรังอื่น hairy cell leukemia หรือ lymphoid neoplasm อื่น มะเร็งระยะลุกลาม หรือ toxic (chronic) myelopathies อื่นๆ	

* *ฮีโมโกลบิน หรือฮีมาโตคริตสูงกว่า 99th percentile ของ method-specific reference range สำหรับ อายุ, เพศ, หรือระดับความสูงของที่พักอาศัยจากระดับน้ำทะเล หรือ ฮีโมโกลบินสูงกว่า 17 g/dL ในชาย และ 15 g/dL ในหญิง โดยพบ documented/sustained increase อย่างน้อย 2 g/dL จากค่าพื้นฐาน ซึ่งไม่ได้เป็นผลจากการแก้ไขภาวะ iron deficiency <u>หรือ</u> มี elevated red blood cell mass สูงจากค่าปกติร้อยละ 25*

\# *มีการเพิ่มแบบ sustained increase ระหว่างการสืบค้นหาสาเหตุ*



a) b)

รูปที่ 2 ตัวอย่างการตรวจหายีนกลายพันธุ์ชนิด *JAK2*V617F โดยเทคนิค a) AS-PCR (Lane M=100bp DNA ladder, Lane 1= Positive control, Lane 2 = Negative control, Lane 3 = *JAK2*V617F-positive case, Lane 4 = *JAK2*V617F-negative case, Lane 5 = Distilled water) และ b) DNA sequencing โดยใช้ reverse primer (A=Mutant, C=wild type)

ดังกล่าวจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถตัด DNA ส่วนนี้ได้[14] วิธีนี้มีความไวประมาณร้อยละ 5[41, 48]

วิธี Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) อาศัยการทำ PCR คร่อมบริเวณที่มีกลายพันธุ์ แล้วตามด้วยการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคพิเศษ ซึ่งมีหลักการคือ ใช้ความร้อนแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นจะปล่อยให้เย็นลงช้าๆ ทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะกลับมาจับคู่กันโดยเรียกดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการจับกันระหว่าง wild-type กับ wild-type หรือ mutant กับ mutant ว่า homoduplex และเรียกดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดการจับกันของสายเดี่ยวที่เป็น wild-type กับอีกสายหนึ่งที่เป็น mutant ว่า heteroduplex ซึ่งเมื่อนำไปผ่านเข้าคอลัมน์ที่มี ion-pairing reagent เป็น stationary phase และ acetonitrile gradient เป็น mobile phase จะทำให้ heteroduplex และ homoduplex จะหลุดออกมาจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่ต่างกัน ซึ่งวิธีนี้ให้ความไวประมาณร้อยละ 1-2.5[51, 52]

นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วยังมีเทคนิคอื่นๆ ได้แก่ การทำ melting curve analysis โดยใช้เครื่อง Real-time PCR และการทำ Pyrosequencing เป็นต้น ซึ่งมีความไวประมาณ 3-10%[53] สำหรับรูปที่ 2 แสดงการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* ด้วยวิธี AS-PCR และ sequencing

บทสรุป

การวินิจฉัยโรคในกลุ่ม MPN นั้น ในอดีตอาศัยเพียงการตรวจทางโลหิตวิทยาพื้นฐานเพื่อดูลักษณะและปริมาณของเซลล์ชนิดต่างๆ ในเลือดและไขกระดูก เนื่องจากโรคกลุ่ม MPN ส่วนใหญ่ไม่มีความผิดปกติที่จำเพาะระดับโครโมโซมหรือยีน ยกเว้นในโรค CML ที่มีความผิดปกติที่จำเพาะ ได้แก่ Ph chromosome และยีน *BCR-ABL* ซึ่งใช้เป็น standard diagnostic test และมีความสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยด้วยยากลุ่ม tyrosine kinase inhibitor (TKI) ที่มุ่งเป้าแก้ไขความผิดปกติระดับโมเลกุล การค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* ชนิด *JAK2*V617F ในปี ค.ศ. 2005 ได้นำไปสู่การค้นคว้าวิจัยที่ตามมาอีกมากมายที่ช่วยอธิบายความเกี่ยวข้องของการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* กับพยาธิกำเนิดของโรคในกลุ่ม Ph-negative MPN ได้แก่ PV, ET และ PMF ในปัจจุบันการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *JAK2* มีความสำคัญอย่างยิ่ง และได้รับการยอมรับให้เป็นหนึ่งในเกณฑ์ที่ใช้ช่วยในการวินิจฉัยยืนยันโรคในกลุ่ม Ph-negative MPN การพัฒนายาที่มุ่งเป้าแก้ไขความผิดปกติระดับยีน *JAK2* จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วย Ph-negative MPN เช่นเดียวกับที่มีการค้นพบยา imatinib mesylate และนำมาใช้อย่างได้ผลใน Ph-positive CML

เอกสารอ้างอิง

1. *Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol 1998;16:293-322.*
2. *Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:1603-7.*
3. *Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. Br J Haematol 2006;134:366-84.*

4. *Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. Biochem Pharmacol 2006;72:1538-46.*
5. *Pritchard MA, Baker E, Callen DF, Sutherland GR, Wilks AF. Two members of the JAK family of protein tyrosine kinases map to chromosomes 1p31.3 and 9p24. Mamm Genome 1992;3:36-8.*
6. *Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. Cell 1998;93:385-95.*
7. *Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. Annu Rev Biochem 1995;64:621-51.*
8. *Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nat Rev Immunol 2003;3:900-11.*
9. *Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. Mol Cell Biol 2000;20:3387-95.*
10. *Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. Science 1997;278:1309-12.*
11. *Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. Cancer Res 2005;65:2662-7.*
12. *Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2005;44:329-33.*
13. *James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005;434:1144-8.*
14. *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;365:1054-61.*
15. *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;7:387-97.*
16. *Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005;352:1779-90.*
17. *Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. N Engl J Med 1974;290:1382.*
18. *Florensa L, Besses C, Woessner S, Sole F, Acin P, Pedro C, et al. Endogenous megakaryocyte and erythroid colony formation from blood in essential thrombocythaemia. Leukemia 1995;9:271-3.*
19. *Ciaudo M, Hadjez JM, Teyssandier I, Coly E, Zittoun R, Marie JP. Prognostic and diagnostic value of endogenous erythroid colony formation in essential thrombocythemia. Hematol Cell Ther 1998;40:171-4.*
20. *Reid CD. The significance of endogenous erythroid colonies (EEC) in haematological disorders. Blood Rev 1987;1:133-40.*
21. *Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 2006;108:1652-60.*
22. *Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 2006;107:4274-81.*
23. *Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. Blood 2005;106:1207-9.*
24. *Mc Lornan DP, Percy MJ, Jones AV, Cross NC, Mc Mullin MF. Chronic neutrophilic leukemia with an associated V617F JAK2 tyrosine kinase mutation. Haematologica 2005;90:1696-7.*
25. *Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. Blood 2005;106:3377-9.*
26. *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;106:3370-3.*
27. *Frohling S, Lipka DB, Kayser S, Scholl C, Schlenk RF, Dohner H, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. Blood 2006;107:1242-3.*
28. *Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. Blood 2005;106:2920-1.*
29. *Sulong S, Case M, Minto L, Wilkins B, Hall A, Irving J. The V617F mutation in Jak2 is not found in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2005;130:964-5.*
30. *Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood 2008;111:3931-40.*
31. *Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood 2007;110:840-6.*
32. *Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. Haematologica 2008;93:41-8.*
33. *Rumi E, Passamonti F, Pietra D, Della Porta MG, Arcaini L, Boggi S, et al. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. Cancer 2006;107:2206-11.*

34. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. Blood 2008;112:2429-38.
35. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356:459-68.
36. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. Leukemia 2007;21:1960-3.
37. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. Br J Haematol 2005;131:166-71.
38. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. Br J Haematol 2005;131:208-13.
39. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. Leukemia 2006;20:350-3.
40. 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;106:2162-8.
41. 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;366:1945-53.
42. Speletas M, Katodritou E, Daiou C, Mandala E, Papadakis E, Kioumi A, et al. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. Leuk Res 2007;31:1053-62.
43. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. J Biol Chem 2005;280:22788-92.
44. Wong RS, Cheng CK, Chan NP, Cheng SH, Wong WS, Lau KM, et al. JAK2 V617F mutation is associated with increased risk of thrombosis in Chinese patients with essential thrombocythaemia. Br J Haematol 2008;141:902-4.
45. Xiao Z, Zhang Y, Li L, Nie L, Yang L, Xu S. The Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation in Chinese patients with chronic myeloproliferative disorders. Haematologica 2008;93:787-8.
46. Lieu CH, Wu HS, Hon YC, Tsai WH, Yang CF, Wang CC, et al. Prevalence of the JAK2-V617F mutation in Taiwanese patients with chronic myeloproliferative disorders. Intern Med J 2008;38:422-6.
47. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
48. Lay M, Mariappan R, Gotlib J, Dietz L, Sebastian S, Schrijver I, et al. Detection of the JAK2 V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. J Mol Diagn 2006;8:330-4.
49. Kannim S, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU. Two-round allele specific-polymerase chain reaction: a simple and highly sensitive method for JAK2V617F mutation detection. Clin Chim Acta 2009;401:148-51.
50. Kannim S, Auewarakul CU. The impact of JAK2-non receptor tyrosine kinase mutation on the mobilization of hematopoietic stem cells into peripheral blood of patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders. Int J Cancer 2009;125:988-90.
51. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mutat 2001;17:439-74.
52. Sattler M, Walz C, Crowley BJ, Lengfelder E, Janne PA, Rogers AM, et al. A sensitive high-throughput method to detect activating mutations of Jak2 in peripheral-blood samples. Blood 2006;107:1237-8.
53. Olsen RJ, Tang Z, Farkas DH, Bernard DW, Zu Y, Chang CC. Detection of the JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by melting curve analysis using the LightCycler system. Arch Pathol Lab Med 2006;130:997-1003.