



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2008년 2월
박사학위 논문

한국인 필라델피아 염색체 음성 만
성골수증식성질환 환자에서 *JAK2*
V617F 돌연변이에 대한 연구

조선대학교 대학원

의 학 과

박 건

한국인 필라델피아 염색체 음성 만성
골수증식성질환 환자에서 *JAK2*
V617F 돌연변이에 대한 연구

JAK2 V617F Mutation in Korean Patients with
Philadelphia Chromosome-Negative Chronic
Myeloproliferative Disorders

2008년 2월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

박 건

한국인 필라델피아 염색체 음성 만
성골수증식성질환 환자에서 *JAK2*
V617F 돌연변이에 대한 연구

지도교수 박 영 진

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2007년 10월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

박 건

목 차

LIST OF TABLES	II
LIST OF FIGURES	III
ABSTRACT(영문)	IV
1. 서론	1
2. 재료와 방법	3
I. 대상	3
II. 골수도말검체에서 DNA 추출 및 정제	3
III. 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 (allele-specific PCR, ASP)	4
IV. 통계분석	5
3. 결과	6
I. 분석환자들의 임상적 특징	6
II. ASP법의 최저검출한계	6
III. <i>JAK2</i> V617F 변이 발생 빈도	6
IV. <i>JAK2</i> V617F 돌연변이 유무에 따른 군간 임상적 특징 비교	6
4. 고찰	8
5. 요약	14
6. 참고문헌	21
7. 감사의 글	29

LIST OF TABLES

Table 1. Allele-specific PCR primers and condition for detecting the JAK2 V617F mutation	13
Table 2. Clinical laboratory characteristics of the patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders at the time of bone marrow examination	21
Table 3. Frequency of the JAK2 V617F mutation in previously reported studies and in this study	20
Table 4. Comparison of the clinical laboratory characteristics according to the mutational status of <i>JAK2</i> V617F	22

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Detection limit of the allele-specific PCR assay. 24

Fig. 2. The allele-specific PCR assay in patients with Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. 24

ABSTRACT

Incidence of *JAK2* V617F mutation in Philadelphia chromosome–negative chronic myeloproliferative disorders

Geon Park

Advisor: Prof. Young Jin Park M.D., Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Background : *Janus tyrosine kinase 2 (JAK2)* V617F mutation has been described in a high proportion of patients with Philadelphia chromosome–negative chronic myeloproliferative disorders (Ph– CMPD), ie polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), chronic idiopathic myelofibrosis (IMF) and chronic myeloproliferative disorders, unclassified (UMPD). However, the incidence rates of *JAK2* V617F for the Ph– CMPD was variable by reporters. Therefore, we investigated the frequency of *JAK2* V617F mutation and its correlation with other clinical laboratory characteristics in Ph– CMPD.

Methods : Herein, we carried out a retrospective study comprised 133 patients with Ph– CMPD (PV, 24; ET, 80; IMF, 18; UMPD, 11), covering the years from 1999 to October 2007 in three university hospitals. Genomic DNA extracted from bone marrow aspirates on glass slides were tested for occurrence of the *JAK2* V617F mutation by allele–specific PCR (ASP).

Results : The *JAK2* mutation was detected in 77/133 (57.9%) patients; 20/24 (83.3%) in PV, 42/80 (52.5%) in ET, 7/18 (38.9%) and 8/11 (72.7%) in UMPD. The presence of *JAK2* mutation closely correlated with old age, leukocytosis and erythrocytosis in Ph– CMPD, with leukocytosis and thrombocytosis in PV, with old age and erythrocytosis in ET, with old age

and leukocytosis in IMF, and with thrombocytosis in UMPD.

Conclusions : The *JAK2* V617F mutation rates performed by ASP correlate well with results already reported. *JAK2* V617F mutation assay should be performed at the diagnosis of Ph- CMPD in Korean patients.

Key Word: *JAK2*, Mutation, Chronic myeloproliferative disorders, Philadelphia chromosome

1. 서 론

만성골수증식성질환(chronic myeloproliferative disorders, CMPD)은 클론성 조혈모세포의 지속적이며 비조절된 증식으로 인한 조혈작용의 증가를 특징으로 하는 이질적인 질환군이며(Levine RL *et al.*, 2007; Hussein K *et al.*, 2007) 만성골수성백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML), 진성적혈구증다증(polycythemia vera, PV), 만성원발성골수섬유증(chronic idiopathic myelofibrosis, IMF), 진성고혈소판혈증(essential thrombocythemia, ET), 만성중성구백혈병(chronic neutrophilic leukemia, CNL), 만성호산구백혈병(chronic eosinophilic leukemia, CEL), 특발성과호산구증후군(hypereosinophilic syndrome, HES), 미분류만성골수증식성질환(chronic myeloproliferative disorders, unclassified, UMPD) 등으로 분류된다(Imbert M *et al.*, 2001). CMPD에 대한 분자적 병인 연구는 새로운 진단과 치료에 대한 접근을 제시하여 분자유전학이 포함된 새로운 질병 분류 체계가 고안될 수 있다. 예를 들어 CML의 경우 필라델피아 염색체가 발견되어 염색체 변이가 암을 일으킬 수 있음을 처음으로 증명되었고 또한 BCR/ABL 융합 유전자가 발견되어 이를 진단과 치료에 이용함으로써 암 정복에 커다란 진보를 하게 되었다(Kurzrock R *et al.*, 2003). 하지만 Ph- CMPD에서 BCR/ABL 같은 질병특이적인 표지자가 발견되지 않았으나 최근 Ph- CMPD 환자의 상당수에서 야누스 타이로신 카이나제 2 (Janus tyrosine kinase 2, *JAK2*)의 617번 아미노산이 발린에서 페닐알라닌으로 치환되는 점돌연변이(*JAK2* V617F)가 발견되어(Kralovics R *et al.*, 2005; Levine RL *et al.*, 2005; James C *et al.*, 2005) Ph- CMPD를 *JAK2* V617F positive CMPD와 *JAK2* V617F negative CMPD로 구분할 수 있게 되었고 항*JAK2*제제(anti-*JAK2* agents)의 가능성을 열게 되었다(Tefferi A *et al.*, 2007). 또한 CMPD는 엄격한 진단기준에 의해 분류됨에도 불구하고 이차성 질환, 다른 골수증식성질환 그리고 다른 골수계 암들, 즉 골수이형성증후군(myelodysplastic syndromes, MDS)와 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML) 간의 감별이 쉽지 않았으나(Levine RL *et al.*, 2007; Ahn JY *et al.*, 2007) *JAK2* V617F 유무에 따른 분자생물학적 감별진단에도 도움을 주게 되었으며 Ph- CMPD의 분자생물학적 진단기준으로 적용이 가능하게 되었다(Tefferi A *et al.*, 2007). 그러나 Ph- CMPD에서 *JAK2* V617F 돌연변이 발생 빈도에 대한 다양한 범위의 보고들이 있다(Kralovics *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Baxter *et al.*, 2005; Jones *et al.*

2005; Jelinek J *et al.* 2005; Horn *et al.* 2006; Levine RL *et al.* 2006; Bang SM *et al.* 2006; Speletas *et al.* 2007; Langabeer *et al.* 2007; Chen S *et al.* 2007). 이에 저자들은 Ph- CMPD에서 *JAK2* V617F 유전자 돌연변이 빈도와 돌연변이 유무에 따른 임상적 특성의 차이를 살펴보고자 한다.

2. 재료 및 방법

I. 대상

1999년 7월부터 2007년 10월까지 호남 지역에 소재한 세 개의 대학병원에서 CMPD로 새로이 진단받은 환자 133명을 대상으로 하였으며 PV 24명(18.0%), ET 80명(60.2%), IMF 18명(13.5%) 그리고 UMPD 11명(8.3%)이었다. 1999년부터 2001년까지 기간 동안 진단된 환자에 대해서는 PV와 ET의 경우 TVSG 진단기준을 따랐으며 (Michiels JJ *et al.* 1997) IMF의 경우 Barosi G 등이 제안한 진단기준을 따랐다 (Barosi G *et al.* 1999). UMPD의 경우 상기 진단기준들을 충족시키지 못한 경우 분류하였다. 2002년 이후 진단된 환자에 대해서는 상기 4가지 아형 모두 World Health Organization (WHO) 진단 기준(Vardiman JW *et al.* 2002)을 따랐다. 그리고 염색체 검사결과상 필라델피아 염색체 음성인 경우 또는 역전사 중합효소연쇄반응법에 의한 BCR/ABL 재배열 음성인 환자를 대상으로 하였으며 각 환자에 대해 병록지를 조회하여 성별, 나이, 일반혈액검사 결과 등을 조사하였다.

II. 골수도말검체에서 DNA 추출 및 정제

골수도말검체에서 유전체 DNA는 Puregene tissue core kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조회사의 지침과 Aplenc 등(Aplenc R *et al.* 2002)의 변형된 지침을 참조하여 추출하였다.

추출과정을 간략히 적으면 다음과 같다. 건조된 비염색 슬라이드 도말 검체의 경우 2 ~ 3장의 슬라이드 도말 검체를 이용하였으며 도말된 검체에 10~15 μ L의 cell lysis buffer (Gentra Systems)를 이용하여 충분히 젖게 한 후 다른 깨끗한 슬라이드를 이용하여 긁어 1.5 mL 미세원침관에 옮겨 담았다. 이 원침관에 cell lysis buffer (Gentra Systems) 600 μ L를 넣은 후 20초 이상 강하게 진탕한 후 다시 20mg/mL 농도의 proteinase K (Gentra Systems) 3.0 μ L를 넣고 진탕하여 섞어 주었다. 55°C로 미리 맞추어 둔 진탕항온수조 (SWB-03; Jeio Tech, DaeJeon, Korea)에 48시간 동안 방치하였다. 진탕항온수조에서 검체를 꺼내어 바로 4°C 냉장고에 5분 동안 넣어두어 처리 중인 검체의 온도를 실온으로 맞추었다. Protein precipitation buffer (Gentra

Systems) 200 μL 를 미세원침관에 넣은 후 20초 이상 강하게 진탕하여 충분히 섞어 주었다. 4°C 냉장고에 15분 동안 방치한 후 실온에서 14000 rpm으로 5분 원심분리를 시행하였다. 침전물이 상층액에 섞이지 않도록 주의하며 상층액을 깨끗한 1.5 mL 미세원침관으로 옮겨 담은 후 실온의 isopropanol (Amresco, Solon, OH, USA) 600 μL 를 첨가하였다. 여기에 20 mg/mL 농도의 glycogen (Gentra Systems) 1 μL 를 첨가한 후 부드럽게 50회 이상 상하 반전하여 섞어 주었다. -20°C 냉동고에 3시간 방치한 후 항온고속원심분리기(Mega 17R; Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)를 이용하여 4°C에서 14000 rpm으로 15분간 원심분리를 하였다. 침전된 DNA pellet이 떨어지지 않도록 주의하며 상층액을 깨끗이 제거하였다. 70% 에탄올 600 μL 를 넣은 후 수회 위아래로 반전하여 섞어 주었다. -20°C 냉동고에 30분 동안 방치한 후 다시 4°C에서 14000 rpm으로 5분간 원심한 후 상층액을 버리고 실온에서 15분간 방치하여 건조시켰다. DNA hydration solution (Gentra Systems) 20 μL 를 첨가한 후 65°C로 미리 맞추어 둔 진탕항온수조(Jeio Tech)에서 1시간 방치하여 DNA를 녹였다.

Wright-Giemsa 염색된 슬라이드 도말 검체의 경우 1장의 슬라이드 검체를 이용하였으며 슬라이드를 Xylene으로 채워진 coplin jar에 넣은 후 실온에서 3일 동안 넣어 두어 봉입제를 녹인 후 커버슬라이드를 떼어 내었다. 100% 에탄올을 이용하여 세척한 후 1시간 이상 실온에서 건조시켰다. 이 후 비염색 슬라이드 도말 검체와 동일한 방법으로 DNA를 추출하여 실험에 이용하였다.

III. 대립유전자특이중합효소연쇄반응법(allele-specific PCR, ASP)

JAK2 V617F 변이 유무는 대립유전자특이중합효소연쇄반응법(allele-specific polymerase chain reaction, ASP)을 이용하여 판정하였다(Baxter EJ *et al.* 2005). 이 ASP법은 정성적이며 *JAK2* V617F의 동형과 이형접합변이 여부를 판정할 수 없다. PCR 반응물 조제는 Hot start PCR 반응 혼합액인 2x Anydirect Max Red premix (1.5mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs) (BioQuest, Seoul, Korea)와 2 μL 시발체 혼합물 (Table 1)을 넣고 DNA 농도는 10 ng을 사용하여 최종 반응량이 20 μL 가 되도록 하였다. 시발체 혼합물은 10 μM 의 공통 역시발체(common reverse primer)와 5 μM 의 돌연변이 특이적 전시발체(mutant specific forward primer) 그리고 2.5 μM 의 내부 대조 전시발체(internal control forward primer)로 구성되었다. 돌연변이 특이적 전시발체

의 경우 돌연변이 대립유전자(mutant allele)에 특이적이고 고의적 불일치를 포함하며 203 bp의 산물로 나타난다. 내부 대조 전시발체의 경우 변이형과 야생형 대립유전자 모두에서 관찰되어 PCR의 성공 여부를 판정하게 되며 364 bp의 반응산물이 관찰된다. Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 94℃에서 5분 반응시키고 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 연장반응을 시켰다. 2% 아가로오즈겔 (iNtRon, Seoul, Korea)을 사용하여 PCR 산물을 전기영동하여 분석하였다(Fig. 1).

Baxter EJ (Baxter EJ *et al.* 2005) 등이 개발한 ASP를 이용한 연구는 많이 보고 되었으나 구체적인 PCR 조건에 대한 기술은 제시되어 있지 않았다. 따라서 본 연구에 이용된 PCR 조건의 적절성을 평가하고 최저검출한계를 알아보기 위하여 동형접합성 *JAK2* F617 돌연변이를 가진 세포주인 HEL 92.1.7 (human erythroleukemia, TIB-180; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 유전체 DNA를 추출한 후 형광광도계(Qubit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 정량하여 100 ng/ μ L로 농도를 조절하였으며 정상인에게서 추출된 *JAK2* V617 야생형 유전체 DNA를 동일한 방법으로 100 ng/ μ L로 농도를 조절하고 이 두 DNA를 적절히 조합하여 여러 비율로 만들어 각 희석액에서 PCR을 실시하였다.

III. 통계분석

JAK2 V617F 돌연변이 유무에 따른 군간 혈액학적 지표의 차이를 분석하기 위해 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test를 실시하였으며 비연속변수인 성별간 비교를 위해 chi-square test를 이용하였다. 통계프로그램은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고 $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

3. 결 과

I. 분석환자들의 임상적 특징

Ph- CMPD 환자군의 성별 구성은 남성 73명(54.9%), 여성 60명(45.1%)로 남성이 많았으며 각 아형에서도 UMPD를 제외하고 모두 남성이 더 많은 비율을 차지하였다. 중위연령과 범위는 62세 및 11 ~ 87세이었는데 IMF가 가장 중위연령이 높고 UMPD는 가장 중위연령이 낮았다. 하지만 각 아형간 연령에 따른 통계적 유의성은 없었다($P>0.05$). 혈액학적 지표는 각 아형의 특성에 맞게 다양한 범위를 보였다(Table 1).

II. ASP법의 최저검출한계

본 연구에서 이용된 PCR 조건으로 실시된 동형접합성 변이 유전체 DNA의 최저검출한계는 0.5%로서 이 번 실험에 이용된 슬라이드 검체 내에 존재하는 유핵세포 중에 *JAK2* V617F 이형접합성 변이를 가진 세포가 1% 이상만 있어도 검출이 가능하였으며 100% *JAK2* V617 야생형 유전체 DNA의 ASP 경우 203 bp의 변이형 밴드는 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

III. *JAK2* V617F 변이 발생 빈도

JAK2 V617F 돌연변이 결과는 Ph- CMPD, PV, ET, IMF 그리고 UMPD 각각 77/133 (57.9%), 20/24 (83.3%), 42/82 (52.5%), 7/18 (38.9%) 그리고 8/11 (72.7%)이었다.

IV. *JAK2* V617F 돌연변이 유무에 따른 군간 임상적 특징 비교(Table 5)

JAK2 V617F 돌연변이 양성군은 남녀 각각 42명, 35명이었으며 음성군은 남녀 각각 31명, 25명이었다. 남녀간 V617F 돌연변이 양성률의 차이는 관찰되지 않았다 ($P=0.926$). 평균연령은 *JAK2* V617F 돌연변이 양성군이 62.1세, 음성군이 51.1세로

통계적으로 유의하게 양성군에서 높았다($P=0.001$). 평균 혈색소(hemoglobin, Hgb)치는 양성군이 13.2 g/dL, 음성군이 12.9 g/dL이었고 평균 백혈구(white blood cell, WBC)수는 양성군, 음성군 각각 $12.5 \times 10^9/L$, $18.7 \times 10^9/L$ 이었고 평균 혈소판(platelet, PLT)수는 각각 $797 \times 10^9/L$, $817 \times 10^9/L$ 으로 *JAK2 V617F* 양성군에서 모두 더 높았으나 백혈구수만이 통계적으로 유의하였다($p=0.011$).

연령은 모든 아형에서 돌연변이 양성군에서 높았으며 ET와 IMF에서 통계적으로 유의하였다(각각 $P=0.021$, $P=0.001$). 성별은 UMPD를 제외한 아형의 경우 양성군 및 음성군 모두에서 남성의 비율이 더 높았다. 백혈구수는 모든 아형에서 양성군에서 높았으며 PV와 IMF에서 그 차이가 통계적으로 유의하였다(각각 $P=0.010$, $P=0.033$). 혈색소치는 ET와 IMF의 경우 돌연변이 양성군에서 높았으며 ET에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P=0.003$). 혈소판수는 ET를 제외한 아형의 경우 양성군에서 더 높았으며 PV와 UMPD에서 통계적으로 유의하게 더 높았다(각각 $P=0.013$, $P=0.014$).

4. 고 찰

타이로신 키나제 (protein tyrosine kinase, PTK)는 ATP를 이용하여 표적단백질 (target protein)의 타이로신 잔기들을 인산화를 시켜 표적단백질의 구조 및 기능 변화를 일으키고 이를 통한 일련의 과정으로 세포의 성장, 분화, 대사 그리고 자가세포사멸 (apoptosis)과 같은 소기의 목적을 달성하며 최종적으로 정상적인 세포의 교류와 항상성 유지를 한다(Hunter T 2000; Schlessinger J 2000; Paul MK *et al.* 2004). 하지만 PTK의 기능 이상이나 비정상적인 조절은 암 발생에 중요한 사건으로 작용한다 (Levitzki A *et al.* 1995). 따라서 PTK를 표적으로 하는 많은 항암제가 개발되고 있다 (Paul MK *et al.* 2004). PTK는 세포막을 관통하는 수용체성 타이로신 키나제(receptor tyrosine kinase, RTK)와 수용성 세포질내 효소(soluble cytoplasmic enzyme)인 비수용체성 타이로신 키나제(non-receptor tyrosine kinase, NRTK)로 분류되며 인간의 경우 90개의 알려진 PTK 유전자가 있으며 이중 RTK는 58개, NRTK는 32개이다(Tefferi A 2005). RTK로는 EGFR (epidermal growth factor receptor), PDGFR (platelet derived growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor) 그리고 insulin receptor 등이 있으며 NRTK로는 SRC(homologues of the Rous sarcoma virus tyrosine kinase), ABL (homologues of the Abelson leukemia virus tyrosine kinase), FAK (focal adhesion kinase) 그리고 JAK (Janus tyrosin kinase) 등이 있다 (Paul MK *et al.* 2004).

야누스 타이로신 키나제(Janus tyrosine kinase, JAK)는 세포질에 있는 NRTK로서 타이로신 키나제 도메인이 내재되어 있지 않는 수용체로부터 전달된 신호를 STAT를 통해 핵 내로 전달시키는 역할을 한다(Ward AC *et al.* 2000). JAK 패밀리는 JAK1, JAK2, JAK3 그리고 TYK2 (tyrosine kinase 2)로 구성되어 있으며 약간의 기능적 차이가 있으나 이들은 모두 JH1(JAK homology 1)부터 JH7까지 7개의 도메인으로 구성되어 있다(Goldman JM 2005). JAK은 'Just Another Kinase'의 약어로서 키나제의 공통 부분을 표적으로 하여 실시된 PCR-based screen을 통해 발견될 당시(Wilks AF 1989) 기능에 대한 이해가 불충분 상황에서 별명으로 불리던 것이다(Ransohoff RM 1998; Tefferi A *et al.* 2005). 그러나 역설적으로 JAK은 단지 또 하나의 키나제가 아닌 사이토카인-세포신호전달체계에서 중심 역할을 하며(Ransohoff RM 1998; Tefferi A *et al.* 2005) 이를 통해 세포 증식, 분화, 대사 그리고 자가세포사멸

(apoptosis) 등의 조절에 관여한다(van der Geer P et al. 1994; Liu X et al. 1994; Levitzki A et al. 1995; Marshall CJ 1995; Schlessinger J 2000; Paul MK *et al.* 2004). 현재 사용되는 명칭인 야누스(Janus)는 그리스신화에서는 나타나지 않고 오직 로마신화에만 등장하는데 서로 반대방향을 바라보는 두 개의 얼굴을 가지고 있는 수문장격인 신이다. 이는 한 단백질 안에 아미노산의 염기서열이 비슷하면서 서로 인접해 있는 두 개의 도메인이 존재를 지칭하는 것이다(Tefferi A *et al.* 2005). 두 개의 얼굴은 JH1 도메인과 JH2 도메인이다. JH1 (JAK homology 1) 도메인은 타이로신 카이나제 기능을 소유하고 있어서 JAK-STAT 신호전달에 중심적인 역할을 하며 이와 달리 JH2 (JAK homology 2) 도메인은 pseudo-kinase 도메인으로서 JH1 도메인과 아미노산 서열은 유사하나 JH1에 의한 신호전달의 과항진(overactivation)을 억제하는 자가억제 기능(autoinhibitory function)을 가지고 있다(Watanabe S et al. 1996; Saharinen P *et al.* 2000). 따라서 JAK의 이중적 자가 조절 기능(auto regulatory function)을 비유적으로 잘 표현한 단어라고 할 수 있다.

JAK은 여러 신호전달체계와 연결되어 있으나 JAK/STAT 신호전달체계가 가장 많이 알려져 있다(Ward AC *et al.* 2000). JAK/STAT 신호전달체계는 처음에 인터페론의 신호전달을 관장하는 분자로서 동정되었으나(Yamaoka K *et al.* 2004), 그 후 I형 및 II형 사이토카인 수용체의 신호전달체계에 관여한다는 것이 알려졌다(Gadina M *et al.* 2001). I형 사이토카인 수용체는 JAK 패밀리는 4종류(JAK1~3, Tyk2), STAT 패밀리는 7종류 (STAT 1~4, 5a, 5b, 6)로 구성되며 조혈기능과 관련된 수용체는 I형 사이토카인 수용체이며 erythropoietin (EPO), thromboplastin (TOP), GM-CSF, IL-3 그리고 IL-5 등이 JAK2/STAT5를 통해 신호가 전달된다(Oda A *et al.* 1998). 타이로신 키나제 도메인이 내재되어 있지 않는 I형 사이토카인 수용체에 사이토카인 또는 배위자(ligand)가 결합하면 소단위로 떨어져 있던 수용체가 결합하면서 이중 복합체 또는 동종이량체가 되고 동시에 세포질 내의 도메인에 결합하고 있는 JAK끼리 끌어당기게 된다. 접근한 JAK는 서로가 상대의 키나제 도메인 안의 활성화 루프에 존재하는 타이로신 잔기를 인산화 시킴으로서 구조변화를 일으켜 활성화 된다. 활성화된 JAK은 수용체의 세포질 내 영역의 타이로신 잔기를 인산화하고 이렇게 인산화된 타이로신 잔기는 SH2 (Src homology 2) 도메인이나 PTB (phosphotyrosine binding) 도메인을 지닌 각종 신호전달분자가 결합할 수 있는 토대가 된다. STAT(signaling transducers and activators of trascription)이 JAK에 의해 활성화된 수용체의 인산화된 타이로신 잔기

에 결합한 후 JAK에 의해 인산화되어 활성화가 된다. 이렇게 활성화된 STAT은 핵 내로 이동하여 전사인자(transcription factor)로 작용한다(Levy DE *et al.* 2002; Matsuda T *et al.* 2004).

JAK2는 1132개의 아미노산으로 구성된 131 kDa의 JAK 패밀리 중 하나이며(Saltzman A *et al.* 1998) 이 단백질에 대한 유전정보는 9p24.1에 존재한다(Quentmeier H *et al.* 2006). JAK2는 GHR (growth hormone receptor), EPOR (erythropoietin receptor), MPL (thrombopoietin receptor), CSF3R (colony stimulating factor 3 receptor) 등의 다양한 사이토카인 수용체들로부터의 신호를 STAT를 통하여 핵 내로 전달하는 역할을 한다(Watanabe S *et al.* 1996).

1960년 Nowell과 Hungerford는 CML에서 필라델피아 염색체의 존재를 보고 하였는데(Nowell PC *et al.* 1960) 이는 CMPD에서 처음으로 보고된 질병특이적인 세포유전학적 표지자이었다(Tefferi A *et al.* 2005). 1984년 Grosveld에 의해 필라델피아 염색체에 내재되어 있는 발암성 돌연변이인 *bcr/ab1*의 존재가 밝혀졌다(Groffen G *et al.* 1984). 이러한 동안 Ph- CMPD에도 질병특이적인 돌연변이들이 소개되어졌다. CNL 일부에서 엑손 c3과 c4 사이에서 절단이 발생하여 230 kDa의 BCR/ABL 융합단백질을 발생하고(Pane F *et al.* 1996) CEL에서 4q12의 부분적 결실로 인해서 발생하는 *FIP1L1/PDGFR* 융합 유전자가 특이적으로 관찰되며(La Starza R *et al.* 2005) ET의 약 1%와 IMF 약 5%정도에서 thrombopoietin 수용체에 대한 유전정보를 가지고 있는 *MPL* 유전자의 돌연변이(*MPL* W515L와 *MPL* W515K)가 보고되고 있으며(Pikman Y *et al.* 2006; Pardanani AD *et al.* 2006) 전형적인 CMPD의 상당수에서 *JAK2*의 JH2 도메인을 구성하는 617번 아미노산이 발린에서 페닐알라닌으로 치환되는 V617F 돌연변이가 보고되고 있다(Kralovics R *et al.* 2005; Levine RL *et al.* 2005; James C *et al.* 2005). 이들 돌연변이는 모두 타이로신 카이나제 신호전달체계의 활성을 유발한다(Levine RL *et al.* 2007).

JAK2 V617F 돌연변이를 검출하기 위해 직접서열분석법(direct sequencing), 중합효소연쇄반응-제한효소길이다양성법(PCR-RFLP), 대립유전자특이중합연쇄반응법(allele-specific PCR, ASP) (Baxter EJ *et al.* 2005), 증폭내화성돌연변이시스템(amplification-refractory mutation system, ARMS) (Jones AV *et al.* 2005), Pyrosequencing법(Jones AV *et al.* 2005), Taqman PCR법(Bousquet M *et al.* 2006; Levine RL *et al.* 2006), 소식자해리분석법(probe dissociation analysis)

(Lay M *et al.* 2006), Locked nucleic acid-modified nucleotides (LNA) probes 법(Markova J *et al.* 2007), 대립유전자특이경쟁적방해자중합연쇄반응법 (allele-specific competitive blocker PCR, ACB) (Tan AY *et al.* 2007) 그리고 MALDI-TOF법(Koren-Michowitz M *et al.* 2007) 등이 소개되어 활용되고 있다. 이들 검사법 중 기본적인 PCR 장비만으로 *JAK2* V617F 변이를 검출할 수 있는 검사법은 PCR-RFLP, ASP, ARMS 그리고 ACB 등이 있다. 이 중 ASP와 ACB를 제외한 PCR-RFLP과 ARMS는 반정량적으로 돌연변이 대립유전자의 비율을 측정할 수 있다. 기존 보고에 의하면 직접서열분석법, PCR-RFLP법, ASP법, ARMS 그리고 ACB법의 민감도는 각각 20%(Baxter EJ *et al.* 2005), 5%(Frantz C *et al.* 2007), 1.5%(Baxter EJ *et al.* 2005), 1~2%(Jones AV *et al.* 2005) 그리고 1%(Tan AY *et al.* 2007)이다. 본 연구에서 ASP의 민감도는 1%로 기존 연구와 비슷하였다. 그리고 *JAK2* V617F의 초기 진단에 있어서 직접서열분석법을 적용하는 것은 낮은 민감도로 인해 권장되지 않는다(Frantz C *et al.* 2007). ASP법은 Baxter 등에 의해 수행된 90예의 대조군 실험에서 모두 음성 결과를 보여 좋은 특이도를 보였다 (Baxter EJ *et al.* 2005). 따라서 ASP법은 높은 특이도와 민감도를 보이므로 *JAK2* V617F를 검출하기 위한 검사법으로 적절할 것으로 사료되었다.

Ph- CMPD에서 *JAK2* V617F 발생 빈도는 57.9%로서 상당수에서 *JAK2* V617F 돌연변이가 존재함을 알 수 있었다. *JAK2* V617F 돌연변이 빈도는 성별에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 기존 연구들과 비슷한 결과이다 (Kralovics R *et al.* 2005; Baxter EJ *et al.* 2005; Levine RL *et al.* 2006; Speletas M *et al.* 2007). 이와 달리 *JAK2* V617F 빈도는 연령의 증가와 통계적으로 유의하게 관련이 있었다. 병원에 내원한 중국인을 대상으로 한 *JAK2* V617F 돌연변이에 대한 무작위 단면 연구(uncontrolled cross-sectional study)에 의하면 약 1% (37/3935)에서 *JAK2* V617F 변이를 보였으며 한 증례를 제외한 모든 V617F 양성 증례에서 혈액학적 검사 소견상 정상이었다고 한다. 또한 통계적으로 *JAK2* 양성군과 음성군간의 연령에 따른 차이가 있다고 하였다(Xu X *et al.* 2007). 또한 이러한 연령과의 관련은 기존 연구에서도 보고되고 있는 것이다(Kralovics R *et al.* 2005; Baxter EJ *et al.* 2005; Levine RL *et al.* 2006; Speletas M *et al.* 2007). 노화에 따른 수복유전자의 변화로 인한 것으로 생각해 볼 수 있으나 이에 대한 면밀한 추가 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

높은 *JAK2* V617F 양성률을 보이는 PV의 경우 *JAK2* V617F 양성군에서 세포수가 더 높을 것으로 생각할 수 있으나 혈색소치의 경우 다양한 결과를 보인다. Horn T 등의 보고에 의하면 *JAK2* V617F 음성군에서 혈색소치가 더 높았으나(Horn T et al. 2005) Speletas M 등은 *JAK2* V617F 양성군에서 음성군에 비해 혈색소치가 높다고 하였으며 Lippert E 등에 의한 연구에 따르면 *JAK2* V617F 양성 세포의 비율의 증가가 혈색소 증가와 관련되어 있다고 하였다(Lippert E et al. 2006). 본 연구에서는 Horn T 등의 연구결과와 유사하게 양성군에서 더 낮은 혈색소치를 보였다. 여성을 배제하고 남성만을 분석한 결과 평균 혈색소치가 19.1 g/dL로서 동일하였는데 이는 V617F 음성군의 경우 여성보다 정상적으로 높은 혈색소치를 보이는 남성만 있어서 성별에 의한 효과와 적은 수의 분석대상으로 인한 것으로 사료되었으나 추가연구가 필요할 것으로 생각되었다.

총 150명의 ET를 대상으로 한 Wolanskyj 등의 연구에서 *JAK2* V617F 양성군에서 연령, 혈색소치, 백혈구수가 통계적으로 유의하게 높았다고 하였으며(Wolanskyj AP et al. 2005) Baxter EJ 등은 51예의 ET환자를 대상으로 한 연구에서 백혈구수와 혈소판수가 더 높았으나 통계적으로는 유의하지 않았다고 하였다(Baxter EJ et al. 2007). 본 연구에서는 양성군에서 연령 및 혈색소치 그리고 백혈구수가 음성군보다 더 높았으나 연령과 백혈구수만이 통계적으로 유의하였다.

Barosi G 등은 prefibrotic stage를 제외한 primary myelofibrosis 174명을 대상으로 한 연구에서 *JAK2* V617F 양성군에서 혈색소치와 백혈구수 그리고 혈소판수가 통계적으로 유의하다고 하였다(Barosi G et al. 2007). 본 연구결과에서는 돌연변이 양성군에서 백혈구수와 혈소판수가 더 높았으나 백혈구수만이 통계적으로 유의하였다. 하지만 혈색소치는 오히려 양성군에서 더 낮았는데 이는 본 연구에서 prefibrotic stage를 포함하고 있어서 서로 다른 결과가 보인 것으로 생각되었다.

미분류골수증식성질환의 경우 *JAK2* V617F의 양성률은 알 수 있었으나 V617F 변이 유무에 따른 환자군간 임상적 특성을 비교한 자료는 찾을 수 없었다(Horn T et al. 2006; Langabeer SE et al. 2007). 본 연구에서의 양성률은 Horn 등의 연구결과와 비슷하였으나 Langabeer 등의 연구와는 많은 차이를 보여서 미분류골수증식성질환의 증례를 늘려서 추가연구가 필요할 것으로 사료되었다.

본 연구를 통해 한국인의 필라델피아 염색체 음성 골수증식성질환에서도 *JAK2* V617F 돌연변이 발생 빈도가 높고 기존 연구와 비슷한 임상적 특성을 갖는다는

것을 알 수 있었다. 골수증식성질환에 있어서 *JAK2* V617F 유무를 판정하는 것은 진단 하는데 도움이 될 것으로 생각되었다.

5. 요약

배경 : 야누스 타이로신 카이나제 2 (Janus tyrosine kinase 2, *JAK2*)의 V617F 돌연변이는 필라델피아 염색체 음성 만성골수증식성질환(Ph- CMPD) 즉, 진성적혈구증다증(polycythemia vera, PV), 진성고혈소판증(essential thrombocythemia, ET), 만성특발성골수섬유증(idiopathic myelofibrosis, IMF) 그리고 미분류만성골수증식성질환(chronic myeloproliferative disorders, unclassified, UMPD)의 상당수에서 보고되어지고 있다. 그러나 Ph- CMPD에서 *JAK2* V617F 돌연변이 빈도에 대한 다양한 보고가 있다. 이에 저자는 Ph- CMPD에서 *JAK2* V617F 돌연변이 빈도와 임상적 특징간의 연관성을 살펴보고자하였다.

방법 : 1999년부터 2007년 10월까지 세 대학병원에서 Ph- CMPD (PV, 24명; ET, 80명; IMF, 18명; UMPD, 11명)로 진단된 133명을 대상으로 하여 후향적 연구를 하였다. 슬라이드에 도말된 골수천자액 검체에서 유전체 DNA를 추출하고 대립유전자특이 중합효소연쇄반응법(allele-specific PCR, ASP)을 이용하여 *JAK2* V617F 돌연변이 여부를 판정하였다.

결과 : 환자군 전체에서 *JAK2* V617F 돌연변이는 77/133 (57.9%)가 관찰되었으며 PV에서는 20/24 (83.3%), ET에서는 42/80 (52.5%), IMF의 경우 7/18 (38.9%) 그리고 UMPD인 경우는 8/11 (72.7%)의 양성률을 보였다. *JAK2* V617F가 양성인 군에서는 음성군에 비해 연령이 높고 백혈구증다증과 적혈구증다증이 관찰되었다. *JAK2* V617F 양성군과 음성군 환자들간에 유의한 차이를 보이는 특징을 아형별로 열거하면 PV의 경우 상대적으로 높은 백혈구수와 혈소판수, ET에서는 상대적으로 높은 연령과 혈색소치, IMF에서는 상대적으로 높은 연령과 백혈구수, 그리고 UMPD에서는 상대적으로 높은 혈소판수로 나타났다.

결론 : 한국인 Ph- CMPD 환자에서 *JAK2* V617F 돌연변이 발생 빈도는 높았으며 이는 기존 연구와 비슷하였다. 한국인에서 Ph- CMPD을 진단하는데 *JAK2* V617F 돌연변이 여부를 확인하는 것이 반드시 필요할 것으로 사료되었다.

Table 1. Allele-specific PCR primers and condition for detecting the *JAK2* V617F mutation

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	T _m (°C)	Amplicons (bp)
Mutant-specific forward	agcatttggttttaaattaggagtatAtA	52.9	} 203
Reverse Common	ctgaatagtccacagtgttttcagttca	58.1	
Internal control forward	atctatagtcatgctgaagtaggagaaag	55.0	} 364

Base substitutions for the mismatch between primers and template DNA are denoted by capital letters.

Table 2. Clinical laboratory characteristics of the patients with Philadelphia chromosome–negative myeloproliferative disorders at the time of bone marrow examination

Characteristics	Total (n=133)	PV (n=24)	ET (n=80)	IMF (n=18)	UMPD (n=11)
Age (median; range, yr)	62.0; 11 ~ 87	60.5; 28 ~ 74	64.5; 11 ~ 84	66.5; 13 ~ 87	50.0; 16 ~ 73
Gender (M:F)	74:59	14:10	44:36	12:6	4:7
WBC (median; range, x10⁹/L)	12.0; 1.1 ~ 84.6	15.5; 3.8 ~ 53.8	11.5; 3 ~ 72.3	8.4; 1.1 ~ 34.9	12.8; 5.0 ~ 50.2
Hgb (median; range, g/dL)	11.9; 4.9 ~ 22.3	18.7; 16.2 ~ 22.3	11.7; 4.9 ~ 17.2	9.7; 6.5 ~ 16.8	10.6; 6.3 ~ 17.1
PLT (median; range, x10⁹/L)	788; 10 ~ 2677	508; 54 ~ 1263	1047; 185 ~ 2677	1185; 10 ~ 752	511; 91 ~ 768

Abbreviations: PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia; IMF, idiopathic myelofibrosis; UMPD, unclassified myeloproliferative disorders.

Table 3. Frequency of the *JAK2* V617F mutation in previously reported studies and in this study

References	Nation	Race	Specimen	Detection Method	Patients positive/patients studied (%)			
					PV	ET	IMF	UMPD
Levine RL et al. 2005	USA	Caucasian(94%), Hispanic(10%), Asian(4%), Black(1%), other(5%)	PB	SQ	121/164 (74)	37/115 (32)	16/46 (35)	
Jelinek J et al. 2005	USA	NM	PB, BM	PSQ	25/29 (86)	3/10 (30)	18/19 (95)	
Levine RL et al. 2006	USA	NM	PB	AST	76/77 (99)	55/76 (72)	(39)	
Baxter EF et al. 2005	UK	NM	PB, BM	SQ, ASP	71/73 (97)	29/51 (57)	8/16 (50)	
Jones AV et al. 2005	UK	NM	PB	ARMS, PSQ	58/72 (81)	24/59 (41)	15/35 (43)	
James C et al. 2005	France	NM	BM, PB	SQ	40/45 (89)	9/21 (43)	3/7 (43)	
Lippert E et al. 2006	France	NM	BM	qASP	60/62 (97)	45/60 (75)		
Horn T et al. 2006	Germany	NM	BM	ASP	27/28 (96)	17/23 (74)	28/45 (62)	6/8 (75)
Kralovics R et al. 2005	Switzerland, Italy	NM	PB	SQ	83/128 (65)	21/93 (23)	13/23 (57)	
Speletas M et al. 2007	Greece	NM	BM, PB	ASP	35/43 (81)	77/111 (69)	7/12 (58)	
Langabeer SE et al. 2007	Ireland	NM	PB, BM	ASP	27/29 (83)	16/26 (62)	1/6 (17)	3/8 (38)
Chen S et al. 2007	China	Asian	BM	ASP	42/57 (74)	40/68 (59)	8/12 (67)	
Bang SM et al. 2006	Korea	Asian	BM	ASP	9/12 (75)	12/26 (46)	1/7 (14)	
In this study	Korea	Asian	BM	ASP	20/24 (83)	42/82 (53)	7/18 (39)	8/11 (73)

Abbreviations: NM, not mentioned; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; SQ, sequencing; ASP, allele-specific PCR; ARMS, amplification refractory mutation screening; PSQ, pyrosequencing; qASP, quantitative allele-specific PCR; AST, allele-specific Taqman assay; See Table 1 for the others.

Table 4. Comparison of the clinical laboratory characteristics according to the mutational status of *JAK2* V617F

Characteristics	Total (n=133)			PV (n=24)			ET (n=80)			IMF (n=18)			UMPD (n=11)		
	W* (n=56)	M† (n=77)	P	W (n=4)	M (n=20)	P	W (n=38)	M (n=42)	P	W (n=11)	M (n=7)	P	W (n=3)	M (n=8)	P
Age (mean ± SD, year)	51.1 ± 19.7	62.1 ± 14.3	0.001	48.0 ± 19.9	60.2 ± 10.8	0.079	53.3 ± 15.3	62.5 ± 15.3	0.021	46.3 ± 20.9	75.1 ± 5.5	0.001	43.6 ± 24.5	52.3 ± 14.8	0.759
Gender (M:F)	31:25	43:34	0.949	4:0	10:10	0.064	20:18	24:18	0.685	6:5	6:1	0.316	1:2	3:5	0.898
WBC (x 10 ⁹ /L)	12.5 ± 13.8	18.7 ± 13.5	0.011	5.1 ± 0.9	19.3 ± 9.9	0.010	13.6 ± 14.3	17.2 ± 11.5	0.215	7.8 ± 9.8	15.0 ± 8.0	0.033	25.2 ± 22.7	27.1 ± 27.7	0.838
Hgb (g/dL)	11.4 ± 13.8	13.6 ± 5.7	0.001	19.1 ± 0.9	18.5 ± 2.8	0.402	11.0 ± 2.4	12.7 ± 2.3	0.003	10.2 ± 2.6	9.1 ± 1.7	0.239	9.2 ± 1.8	10.9 ± 3.2	0.473
PLT (x 10 ⁹ /L)	797 ± 660	817 ± 415	0.835	162 ± 63	629 ± 338	0.013	1102 ± 350	1046 ± 650	0.603	137 ± 163	274 ± 233	0.135	205 ± 137	556 ± 92	0.014

*W, *JAK2* V617F wild type; †M, *JAK2* V617F mutant type

Abbreviation: See Table 1.

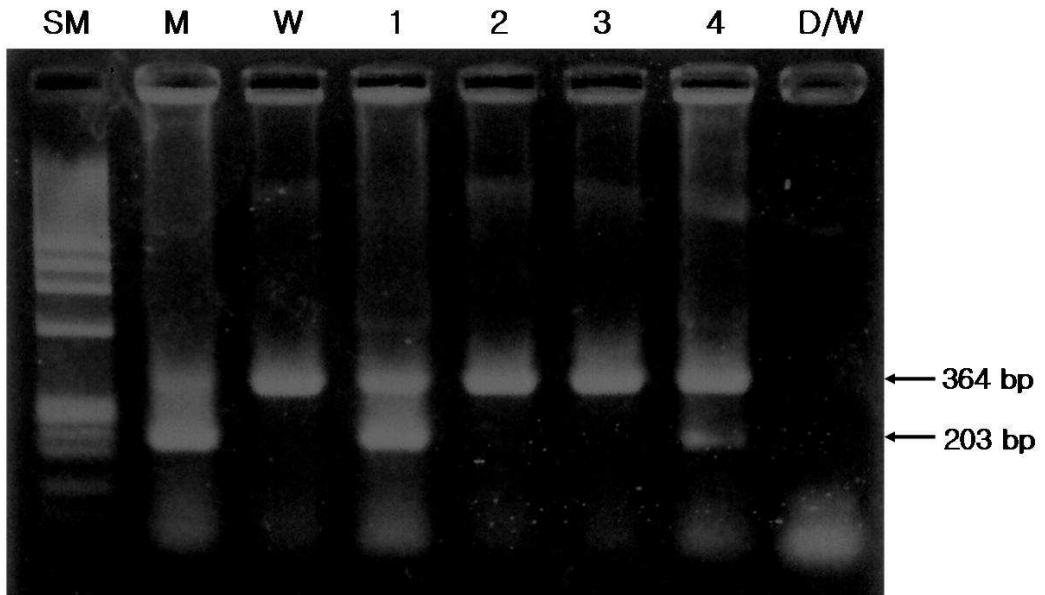


Fig. 1. The allele-specific PCR assay in patients with philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. The 364 bp of PCR product is an internal control and 203 bp is an mutant specific product. Lane SM, ϕ X174/HindIII DNA size marker (TaKaRa, Siga, Japan); lane M, *JAK2* V617F mutation positive control; lane W, *JAK2* V617 wild negative control; lane 1, 4, positive results from clinical samples; lane 2 and 3, negative results from clinical samples; lane D/W, deionized water.

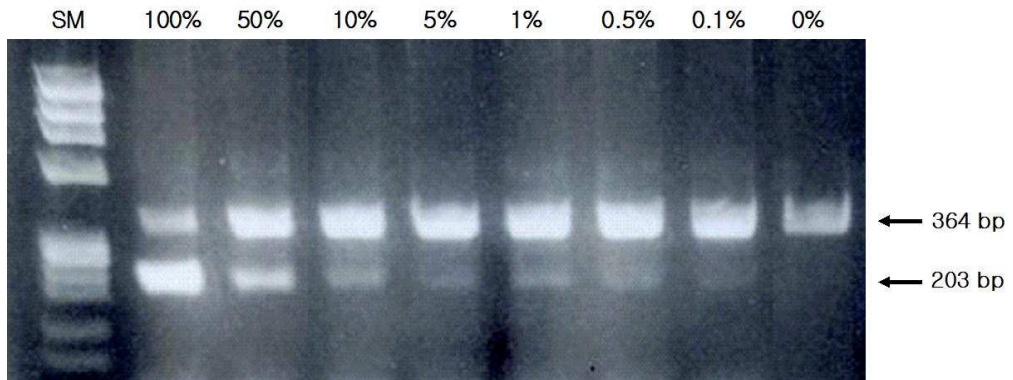


Fig. 2. Detection limit of the allele-specific PCR assay (ASP). DNA from the HEL cell line (homozygous for the V617F mutation) was serially diluted with DNA from a normal individual and amplified in the ASP. Percentage above each lane indicate percentage of DNA of HEL cell line. The marker (SM) is ϕ X174/HindIII DNA size marker (TaKaRa, Siga, Japan).

참고문헌

Ahn JY, Yoo SJ, Bang SM, Park PW, Seo YH, Shin DB, et al. *JAK2* (V617F) Mutation in Korean Patients with Essential Thrombocythemia. *Korean J Lab Med* 2007;27:77-82.

Aplenc R, Orudjev E, Swoyer J, Manke B, Rebbeck T. Differential bone marrow aspirate DNA yields from commercial extraction kits. *Leukemia* 2002;16:1865-6.

Bang SM, Ahn JY, Park J, Yoo SJ, Park SH, Nam EM, et al. Diagnostic Usefulness of the Janus Kinase 2 Mutation in non BCR/ABL Myeloproliferative Disorders. *Korean J Intern Med* 2006;21:219-24.

Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, Grossi A, Leoni P, Liberato NL, et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol* 1999;104:730-7.

Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. *JAK2* V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110:4030-6.

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.

Bousquet M, Le Guellec S, Quelen C, Rigal-Huguet F, Delsol G, Brousset P. Frequent detection of the *JAK2* V617F mutation in bone marrow core biopsy specimens from chronic myeloproliferative disorders using the TaqMan polymerase chain reaction single nucleotide polymorphism genotyping assay: a

retrospective study with pathologic correlations. *Hum Pathol* 2006;37:1458–64.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372–5.

Frantz C, Sekora DM, Henley DC, Huang CK, Pan Q, Quigley NB, et al. Comparative evaluation of three *JAK2*V617F mutation detection methods. *Am J Clin Pathol* 2007;128:865–74.

Goldman JM. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1744–6.

Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93–9.

Horn T, Kremer M, Dechow T, Pfeifer WM, Geist B, Perker M, et al. Detection of the activating *JAK2* V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2006;8:299–304.

Hunter T. Signaling–2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113–27.

Imbert M, Pierre R, Thiele J, Vardiman JW, Brunning RD, Flandrin G. Essential thrombocythaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al, editors. WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. p. 39–41.

James C, UgoV, 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.

James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A *JAK2* mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005;11:546–54.

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.

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.

Koren-Michowitz M, Shimoni A, Vivante A, Trakhtenbrot L, Rechavi G, Amariglio N, et al. A new MALDI-TOF-based assay for monitoring *JAK2* V617F mutation level in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation (allo SCT) for classic myeloproliferative disorders (MPD). *Leuk Res* 2007.

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.

Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 2003;138:819–30.

Langabeer SE, Ni Ainle F, Conneally E, Lawler M. Incidence and significance of the *JAK2* V617F mutation in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Ir J Med Sci* 2007;176:105–9.

La Starza R, Specchia G, Cuneo A, Beacci D, Nozzoli C, Luciano L, et al. The hypereosinophilic syndrome: fluorescence in situ hybridization detects the del(4)(q12)-FIP1L1/PDGFR α but not genomic rearrangements of other tyrosine kinases. *Haematologica* 2005;90:596–601.

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.

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.

Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of *JAK2* in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673–83.

Levitzki A and Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782–8.

Levy DE and Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651–62.

Liu X and Pawson T. Biochemistry of the Src protein-tyrosine kinase: regulation by SH2 and SH3 domains. *Recent Prog Horm Res* 1994;49:149–60.

Macdonald D and Cross NC. Chronic myeloproliferative disorders: the role of tyrosine kinases in pathogenesis, diagnosis and therapy. *Pathobiology* 2007;74:81–8.

Markova J, Prukova D, Volkova Z, Schwarz J. A new allelic discrimination assay using locked nucleic acid–modified nucleotides (LNA) probes for detection of *JAK2* V617F mutation. *Leuk Lymphoma* 2007;48:636–9.

Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal–regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179–85.

Matsuda T, Feng J, Witthuhn BA, Sekine Y, Ihle JN. Determination of the transphosphorylation sites of *JAK2* kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:586–94.

McLornan D, Percy M, McMullin MF. *JAK2* V617F: a single mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulster Med J* 2006;75:112–9.

Michiels JJ and Juvonen E. Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:339–47.

Nowell PC and Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85–109.

Oda A, Sawada K, Druker BJ, Ozaki K, Takano H, Koizumi K, et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of *JAK2*, *STAT5A*, and *STAT5B* in primary cultured human erythroid precursors. *Blood* 1998;92:443–51.

Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic–chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410–4.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6.

Paul MK and Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 2004;1:101–15.

Percy MJ and McMullin MF. The V617F *JAK2* mutation and the myeloproliferative disorders. *Hematol Oncol* 2005;23:91–3.

Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. *JAK2* V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006;20:471–6.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.

Ransohoff RM. Cellular responses to interferons and other cytokines: the JAK–STAT paradigm. *N Engl J Med* 1998;338:616–8.

Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the *JAK2* tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387–95.

Saltzman A, Stone M, Franks C, Searfoss G, Munro R, Jaye M, et al. Cloning and characterization of human Jak–2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:627–33.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211–25.

Tan AY, Westerman DA, Dobrovic A. A simple, rapid, and sensitive method for the detection of the *JAK2* V617F mutation. *Am J Clin Pathol* 2007;127:977–81.

Tefferi A and Gilliland DG. *JAK2* in myeloproliferative disorders is not just another kinase. *Cell Cycle* 2005;4:1053–6.

Tefferi A and Gilliland DG. *JAK2* in myeloproliferative disorders is not just another kinase. *Cell Cycle* 2005;4:1053–6.

Tefferi A and Gilliland DG. The *JAK2* V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2005;80:947–58.

Tefferi A and Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007;6:550–66.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110:1092–7.

Tefferi A and Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2007.

van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251–337.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–302.

Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;95:19-29.

Watanabe S and Arai K. Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:587-96.

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.

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.

Xu X, Zhang Q, Luo J, Xing S, Li Q, Krantz SB, et al. *JAK2*(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood* 2007;109:339-42.

Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004;5:253.

감사의 글

박사 과정 2년의 시간이 화살처럼 빨리 지나갔습니다. 비교적 짧은 시간이었지만 연구 주제를 정해 효과적인 실험법을 개발하고 몇 차례의 실패를 겪는 동안 많은 것들을 배울 수 있었던 알 찬 시간이었습니다. 연구 하는 동안 물심양면 많은 분들이 관심을 써주시고 격려해주셔서 미력하나마 이 논문을 제출할 수 있게 되었습니다. 특히 지도교수님이신 박영진 교수님은 연구 방향과 논문의 서술 방향 등을 지도해 주시고 격려해주셨던 스승이라는 두 글자의 의미를 알 수 있도록 해주신 분이십니다. 그리고 진단검사의학과의 문대수 교수님과 장숙진 교수님의 전공의 시절부터 베풀어 주셨던 은혜에 감사드립니다. 또한 환자 검체를 제공해주시고 많은 아이디어를 제공해주셨던 전남대학교 양동욱 교수님과 신명근 교수님, 전북대학교 최삼임 교수님과 조용곤 교수님, 원광대의 이영진 교수님께도 감사드립니다.

지금까지 저를 위해 새벽을 깨우시면서 기도하시는 아버님과 모든 일에 합력하여 선을 이루시는 하나님 아버지께 감사드립니다.

서석골에서

2007. 12. 20

