



## بررسی ادغام ژنی AML1/ETO در کودکان مبتلابه لوسمی مراجعه کننده به بیمارستان

### امام خمینی (ره) تهران

رقیه بیگزاده<sup>۱</sup>، عقیل تبار ملاحسن<sup>۲\*</sup>، نعمت‌اله رزمی<sup>۳</sup>

۱- دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات شیراز- دانشکده زیست‌شناسی- گروه بیوشیمی- کارشناسی ارشد.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل- دانشکده پیراپزشکی- گروه ایمنی‌شناسی- دکترای تخصصی.

۳- دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات شیراز- دانشکده زیست‌شناسی- گروه بیوشیمی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۵

#### چکیده

**مقدمه:** ادغام  $T(8;21)$  یا به عبارتی  $AML1-ETO$  شایع‌ترین ترانسلوکاسیون در لوسمی میلوئیدی حاد در هر دو سن کودکان و بزرگسالان است. وقوع این ادغام ژنی در آینده درمانی شخص بیمار تأثیرگذار است و نقش پیش‌آگهی دارد. در جامعه مبتلایان ایرانی به لوسمی حاد این ادغام ژنی مشخص نشده و شیوع آن نامشخص است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی ادغام ژنی  $AML1/ETO$  در کودکان مبتلابه لوسمی مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی(ره) تهران انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه بررسی مقطعی تعداد ۵۸ کودک مبتلابه لوسمی میلوئیدی حاد با ریخت‌شناسی متفاوت در طی سال ۹۵ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تهیه خون محیطی، بلافاصله سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران جدا شدند. همچنین لام خون محیطی افراد برای تأیید ابتلا به لوسمی تهیه شد. از سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران  $RNA$  تام بیماران استخراج شد. با استفاده از روش‌های مولکولی  $PCR$ ,  $Nested PCR$ ،  $Real-time PCR$  جهت ارزیابی ادغام مورد استفاده قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که رنج سنی کودکان مورد مطالعه ۴-۵ سال بود. نسبت جنسیتی ۵۳/۵٪ مؤنث و ۴۶/۵٪ مذکر بودند. ۸۰٪ افراد مورد مطالعه دارای این ادغام ژنی بودند و همین‌طور  $mRNA$  آن در پلاسما در حد قابل توجهی وجود داشت. در بررسی خون محیطی غلظت هموگلوبین ۹/۶ گرم در دسی‌لیتر و میانگین شمارش گلبول‌های سفید ۷۰۵۰۰ در میکرولیتر به‌دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به فراوانی ادغام این ترانسلوکاسیون ژنی در جمعیت ایرانی مورد مطالعه، به‌نظر می‌آید استفاده از بررسی این ادغام جهت تعیین پیش‌آگهی و نیز استراتژی درمانی مفید باشد.

**واژه‌های کلیدی:** لوسمی حاد، میلوئیدی،  $AML$ ،  $AML1-ETO$ .

\*نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، دانشکده پیراپزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، تلفن: ۰۹۳۶۵۹۹۸۴۲۶، نمابر: ۰۱۱۳۲۷۲۵۸۲۹.

Email: doctoragheel@yahoo.com

**ارجاع:** بیگزاده رقیه، تبار ملاحسن، رزمی نعمت‌اله. بررسی ادغام ژنی  $AML1/ETO$  در کودکان مبتلابه لوسمی مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی(ره) تهران. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۶؛ ۱۲(۲): ۴۲-۴۸.

## مقدمه

لوسمی‌های حاد، دسته‌ای از بدخیمی‌های خونی حاد محسوب می‌شوند که با افزایش تعداد سلول‌های نارس مغز استخوان به‌ویژه میلو بلاست‌ها و لنفوبلاست‌ها مشخص می‌شوند که در اثر افزایش تعداد آنها، این سلول‌های نارس وارد خون محیطی می‌شوند (۱). عوامل مختلفی از جمله ژنتیک، تابش اشعه، ویروس‌ها، بیماری‌های نقص ایمنی و غیره را در ایجاد آن دخیل می‌دانند (۲).

در سال‌های اخیر گسترش تجزیه و تحلی‌های مولکولی، شاخص‌های نوین و ارزشمندی برای تشخیص AML فراهم آورده‌اند. به‌عنوان مثال تضاعف‌های متوالی داخلی (Internal Tandem Duplication: ITD) در ژن (fms-Like Tyrosine Kinase3)، تضاعف‌های متوالی نسبی در ژن MLL (Mixed Lineage Leukemia) و نیز بیان افزایش‌یافته عامل نسخه‌برداری (Ectopic Virus Integration Site1) همگی بیانگر پیش‌آگهی ضعیف هستند (۳-۵). در این بین مهمترین بازآرایی ژنی در زمان کودکی t(12;21) یا به عبارتی TEL-AML1 می‌باشد (۶-۸). از طرفی ترانسلوکاسیون t(8;12) و یا به عبارتی AML1-ETO شایع‌ترین ترانسلوکاسیون در دوران کودکی و بزرگسالی می‌باشد (۷ و ۸).

ترانسلوکاسیون غالب در AML بین کروموزوم‌های ۸ و ۱۲ رخ می‌دهد که در ۱۰-۱۵ درصد افراد بالغ مبتلا دیده می‌شود که در نتیجه جایگزینی c-ترمینال فاکتور فعال‌کننده رونویسی AML1 توسط فاکتور مهارکننده رونویسی ETO ایجاد می‌شود و منجر به تولید پروتئین AML1-ETO می‌گردد (۹ و ۱۰).

ETO به کو-رپرسورهایی مانند SMRT, mSin3, NcoR و آنزیم هیستون داستیلاز متصل می‌شود (۱۱ و ۱۲) و در نهایت منجر به بیان AML1 شده که به نوبه خود از تمایز سلولی جلوگیری می‌کند (۱۳) از طرفی AML1-ETO منجر به مهار عامل تحریکی کلنی گرانولویست-ماکروفاژ می‌شود که عمل خلاف AML1 است (۱۴) مطالعات مختلف گزارشات متفاوتی از افزایش بیان AML1-ETO را در رده‌های سلولی میلوئیدی نشان می‌دهد که فراوانی آن ۱۰ تا ۲۰ درصد را شامل می‌شود (۱۳).

از طرفی ترانسلوکاسیون t(12;21) فرم غالب در B-ALL دوران طفولیت است که در نتیجه ادغام آگزون ۱ تا ۴ از ژن TEL با AML1 اتفاق می‌افتد (۱۳). فراوانی این ترانسلوکاسیون در جوامع مختلف متفاوت به‌دست آمده است اما به‌طور کل ۱۳ تا ۴۰ درصد موارد را شامل می‌شود. این اختلاف فراوانی می‌تواند به جمعیت مورد مطالعه و یا پروتوکول تشخیصی مربوط باشد (۱۶ و ۱۷).

لذا باتوجه به تناقضات در گزارشات موجود و باتوجه به اینکه میزان این ترانسلوکاسیون در جمعیت ایرانی مشخص نیست، مطالعه حاضر با

هدف تعیین میزان این اختلالات رایج مولکولی در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) تهران مبتلابه لوسمی حاد میلو بلاستیک به‌روش کمی در سال ۹۵ انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۵۸ بیمار کودک مبتلابه انواع لوسمی میلوئیدی مراجعه‌کننده به مرکز امام خمینی تهران (ره) مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه کودکان از نظر پاتولوژی دارای AML تشخیص داده شده بودند. رضایت‌نامه کتبی از والدین کودکان اخذ گردید.

پس از اخذ رضایت‌نامه و تکمیل پرسشنامه دموگرافیک، میزان ۵-۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی در ضد انعقاد EDTA تهیه شد. نمونه‌ها به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در ادامه توسط دستگاه شمارش سلولی Sysmex-N21, India شمارش سلولی و سایر عوامل خونی نظیر هموگلوبین و هماتوکریت از نمونه خون وریدی انجام شد. یک قسمت از خون جهت جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از فایکول انجام شد. از سلول‌های جدا شده استخراج RNA تام توسط کیت Gene all انجام شد.

RNA استخراج شده پس از تأیید کیفی و کمی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند تا فرآیند نمونه‌گیری به پایان رسید. سپس از نمونه استخراج RNA تام نمونه cDNA سنتز شد. نمونه cDNA برای انجام واکنش‌های PCR, Nested PCR و Realtime PCR مورد استفاده قرار گرفت.

بدین منظور پرایمرهای علیه ژن ادغام یافته طراحی شد (جدول ۱). برای طراحی از نرم‌افزار الیگو بهره‌گیری شد و نتیجه طراحی برای جستجوی اختصاصیت BLAST شد. پس از بهینه‌سازی دما و اجزای واکنش، واکنش‌های PCR انجام شد. نتایج PCR و Nested-PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و وجود یا عدم وجود باند موردنظر جستجو شد.

برای تأیید میزان فعالیت بیان ژن به‌صورت کمی، واکنش Real time PCR علیه ژن مذکور انجام شد تا بیان ژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

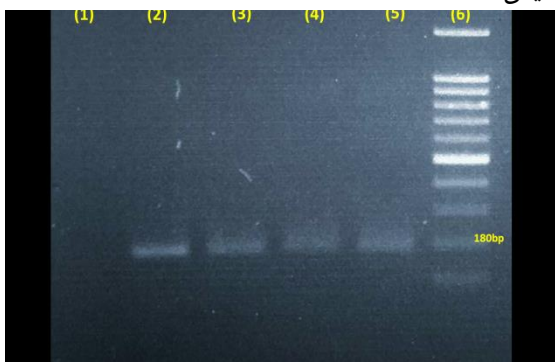
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده (سفارش و تهیه از شرکت Bioner محصول کره جنوبی)

طول محصول	توالی	الیگو
۴۳۰ جفت باز	TCCCTGAACCACTCCACTG	Forward(AML/ETO)
	TTGAGTAGTTGGGGGAGGTG	Revers(AML/ETO)
۱۸۰ جفت باز	CCAATACCTGGGATCCATTG	Forward(ETO)
	TTTCCGGCAGTCACCTATT	Revers(ETO)

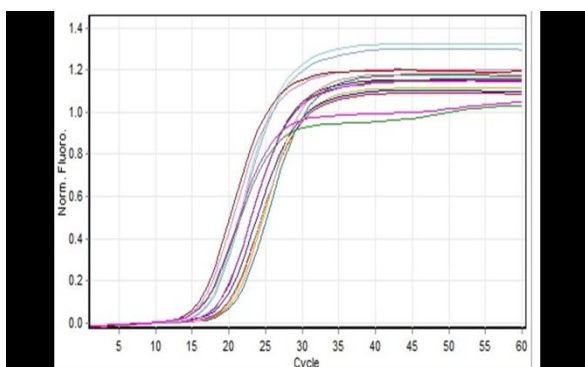
## نتایج

از تعداد ۵۸ کودک مبتلا که مورد مطالعه قرار گرفتند تعداد ۲۷ نفر (۴۶/۵٪) مذکر و ۳۱ نفر (۵۳/۵٪) مؤنث بودند. میانگین سنی بیماران

۱۵ سیکل تعداد نسخه‌های mRNA ی ژن AML/ETO قابل وضوح و تشخیص هستند.



شکل ۲- الکتروفورز محصول Nested PCR علیه ژن ETO در آگارز ۱/۵٪ چاهک ۱: کنترل منفی. چاهک ۶: خط کش DNA. چاهک ۲ و ۳ و ۴ و ۵ نمونه‌های بیماران با نتیجه مثبت علیه ETO



نمودار ۱- نمودار انجام Real time- PCR در نمونه‌های مورد مطالعه نتایج حاصل از انجام Real-time PCR نشان می‌دهد پس از انجام ۱۵ سیکل تعداد نسخه‌های mRNA ی ژن AML/ETO قابل وضوح و تشخیص هستند.

### بحث

بیان RUNX1 (پروتئین ناشی از بیان AML1/ETO) جهت توسعه و تکامل تمام رده‌های سلول‌های خونساز مؤثر است همچنین مطالعات نشان داده جهت تکامل تیموسی سلول T-CD8 وجود این ژن ضروری است. از طرفی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این ژن می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور انکوژن در لوسمی حاد میلوئیدی شرکت نماید (۱۸). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد در ۳۱ نمونه بیمار مورد مطالعه این ترانسلوکاسین AML/ETO وجود دارد و احتمالاً می‌تواند عامل ابتلا به لوسمی حاد میلوئیدی در این بیماران باشد.

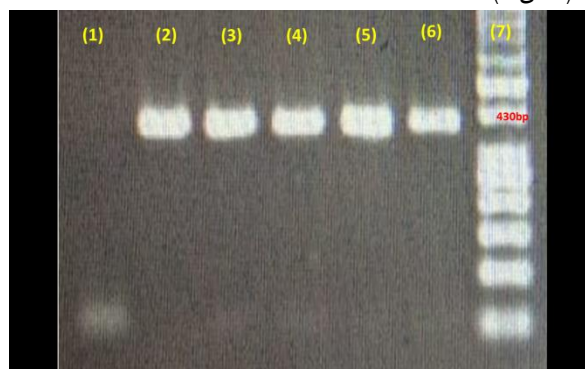
در سال ۱۹۹۲ اریکسون و همکاران و همچنین میوشی و همکاران در سال ۱۹۹۳ توانستند CBFA2T1 را شناسایی کنند و آنها این ژن را به‌عنوان شریکی برای AML1 در لوسمی میلوئیدی حاد و با عنوان

۴/۵±۱/۲ به‌دست آمد. مطالعات دموگرافیک نشان داد که ۱۰٪ آنها در خانواده دارای نوعی ابتلا به بیماری‌های سرطان بوده‌اند. مطالعه شاخص‌های هماتولوژیک در جدول ۲ نشان می‌دهد که میانگین هموگلوبین ۹/۶±۲/۳ در دسی‌لیتر خون به‌دست آمد. همچنین شمارش گلبول سفید ۷۰۵۰۰±۵۴۶ در هر میکرولیتر از خون را نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- شاخصه‌های توصیفی واحد پژوهش و آزمایش خون محیطی نمونه‌ها (میانگین±انحراف معیار)، (درصد فراوانی)

سن (سال)	۴/۵±۱/۲
جنسیت	
مذکر (درصد)	۲۷ (۴۶/۵٪)
مؤنث (درصد)	۳۱ (۵۲/۵٪)
Hb(g/dl)	۹/۶±۲/۳
WBC(mL)	۷۰۵۰۰±۵۴۶
Plt(mL)	۴۱۳۴±۶۳۸۷

انجام PCR بر نمونه‌های بیماران مورد مطالعه در ۴۶ نمونه ترانسلوکاسیون AML/ETO را نشان می‌دادند که پس از انجام PCR بهینه شده بر روی نمونه‌ها و الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ وجود قطعه با طول ۴۳۰ جفت باز مؤید این ترانسلوکاسیون است (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR علیه AML/ETO بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ چاهک ۱: نمونه کنترل منفی. چاهک ۷ خط کش DNA. چاهک ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ نمونه بیماران با وجود ترانسلوکاسیون AML/ETO. وجود قطعه با طول ۴۳۰ جفت باز نشان‌دهنده PCR مثبت علیه ژن AML/ETO است.

انجام Nested PCR در نمونه‌ها علیه ژن ETO در بیماران مورد مطالعه نشان داد که این ژن در تمام نمونه‌های بالینی مورد مطالعه وجود دارد و بیان شده است. مؤید این نکته وجود قطعه ۱۸۰ جفت بازی در PCR علیه ETO است (شکل ۲).

از طرفی بیان ژن AML1/ETO با بررسی Real time PCR نشان داد که این ژن ادغام شده دارای پروموتور فعال است و نسخه‌برداری از آن با حضور mRNA در سیتوپلاسم تأیید شد (نمودار ۱). پس از انجام

اساتو و همکاران با استفاده از تکنیک RT-PCR و در شرایط عاری از RNase در ۸ بیمار از ۱۶۰ بیمار مورد مطالعه جهش‌های نقطه‌ای در منطقه حفاظت شده دومین Runt مشاهده نمودند (۲۴). در سال ۲۰۰۲ تاکیتانی و همکاران به غربالگری RUNX1 در ۴۶ بیمار مبتلا به سندروم داون با بدخیمی خونی پرداختند. آنها موفق به تعیین یک جهش هتروزیگوت در یکی از بیماران شدند که در ۵ روزگی اختلالات میلوگرولیفاتیو از خود نشان داده بود. این بیمار به‌طور ناگهانی ۱۲ ماه بعد از تولد فوت می‌کند و مشخص نشد که آیا بیماری او به سمت لوسمی حاد میلوئیدی پیشرفت داشت یا خیر.

در مطالعه دیگری اساتو و همکاران جهش‌های نقطه‌ای در RUNX1 که باعث ایجاد و پیشرفت در لوسمی می‌شود را مورد بررسی قرار دادند. اغلب این موتاسوین‌ها در افراد اسپورادیک دو آلل داشتند که هر دو آنها درگیر بود اما نمی‌توان از آن به‌عنوان تنها عامل ایجاد لوسمی یاد کرد (۲۴).

در سال ۲۰۱۳ مؤسسه تحقیقات ژنتیک سرطان ژنوم ۲۰۰ بیمار مبتلا به AML را غربالگری و تجزیه و تحلیل نمودند و جهش در RUNX1 در ۱۰ درصد نمونه‌های مورد مطالعه مشخص شد (۶). در مطالعه دیگری در این زمینه مایلر و همکاران ۹ جهش در ژن RUNX1 را گزارش نمودند آنها همچنین چندین ژن دیگر را که احتمالاً در ایجاد و پیشبرد لوسمی مؤثر هستند را نیز شناسایی نمودند (۲۵).

در مطالعه زنا و همکاران تحت عنوان "بررسی میزان شیوع ادغام ژنی TEL/AML1 در کودکان برزیلی مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک" که با هدف تعیین شیوع این اختلال در برزیل انجام شد، تعداد ۵۸ کودک مبتلا به B-ALL در برزیل تحت مطالعه قرار گرفتند. نمونه افراد بیمار به محض تشخیص بیماری جمع‌آوری گردید و جهت وجود t(12;21) مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های مغز استخوان توسط G-باند کاربوتایپ شدند و توسط پروب DNA دو رنگ برای فوزیون هدف مورد بررسی قرار گرفتند. کاربوتایپ‌ها نشان دادند که شایع‌ترین ناهنجاری هایپر دیپلوئیدی می‌باشد. میزان شیوع TEL/AML1 در جمعیت مورد مطالعه ۱۹ درصد (۱۱ نفر در ۵۸ بیمار) به‌دست آمد و ۶ نفر از نمونه‌های مثبت کاربوتایپ طبیعی داشتند. در ۲۷/۳ درصد نمونه‌های مثبت، آنها حذف آلل وحشی TEL را مشاهده کردند که این موضوع همچنین در ۴/۲ درصد از نمونه‌های منفی نیز مشاهده شد. میانگین سن افراد مبتلا ۴/۸ سال به‌دست آمد و میانگین تعداد لکوسیت خون محیطی آنان  $44/27 \times 10^6$  در لیتر بود. میزان افراد مبتلا به B-ALL در این تحقیق ۳۳/۵۸ نفر مؤنث بود که آنها این مسأله را به جمعیت مورد بررسی نسبت دادند. آنها نتیجه گرفتند که این میزان شیوع متناسب با میزان جهانی آن است (۲۶). در مطالعه

ژن انتقال میلوئیدی در 8q22 برشمردند (۱۹ و ۲۰). در سال ۱۹۹۵ دانشمندان توانستند مدل موشی CBFA2T1 را جداسازی و تعیین توالی نمایند. مطالعات آنان نشان داد محصول این ژن ۵۵۷ اسید آمینه دارد که ۹۹/۳٪ با نوع انسانی مشابهت دارند (۲۱).

بر طبق تقسیم‌بندی FAB ترانسلوکاسیون t(8;21)(q22;q22) یکی از فراوان‌ترین ناهنجاری‌های کاربوتایپی در AML است و این مسأله خصوصاً در تیپ M2 دیده می‌شود. در سال ۱۹۹۱ میوشی و همکاران توانستند این ژن را بر روی کروموزوم ۲۱ شناسایی، تعیین توالی نموده و cDNA مربوطه آن را بسازند (۲۱). در سال ۱۹۹۵ همین گروه محققین واریانت‌های مختلفی از AML1 را کلون نمودند. پروتئین در واریانت‌های مختلف دارای ۴۵۳ و ۴۸۰ اسید آمینه بودند که به‌ترتیب AML1b و AML1c نام‌گذاری شدند (۲۴) تفاوت این دو واریانت در ناحیه N-انتهایی آنها بود. قطعه N-انتهایی این پروتئین دارای ۲۵۰ اسید آمینه است که محققین آن را AML1a نام‌گذاری کردند (۱۹).

هر سه اینها دارای ۱۲۸ اسید آمینه حفاظت شده تحت عنوان دومین Runt هستند و میوشی نشان داد که رونویسی AML1c از اگزون ۱ شروع می‌شود اما نوع a و b از اگزون ۳ شروع به رونویسی می‌شوند (۲۲).

تجزیه و تحلیل‌های نورترن بلات نشان داد که در تمام بافت‌ها به غیر از قلب و مغز می‌توان نسخه‌های mRNA ی این ژن را یافت. بیشترین میزان بیان در تیموس و طحال گزارش گردید (۲۲). در مطالعه ما نیز بیان این ژن در سلول‌های خونی مورد تأیید قرار گرفت و در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئید مقادیر افزایش یافته بیان این ژن مشخص شد.

در سال ۱۹۹۷ گروه مطالعاتی ژانگ و همکاران با استفاده از cDNA موشی Aml1 حاوی دومین کدکننده Runt توانستند در cDNA سلول‌های T انسانی یک واریانت خیلی کوچک از AML1 (AML1-delta-N) را یافتند که در ویرایش از اگزون ۱ مستقیماً به اگزون ۴ رفته بود (۲۲). در مطالعات که از روش‌های محافظت در برابر RNase استفاده شد توانستند AML1-delta-N را در تمام رده‌های سلول‌های خون ساز اعم از میلوئیدی و لنفوبلاستی شناسایی نمایند. همچنین نتایج وسترن بلات نشان داد که این پروتئین ۴۳ کیلودالتون وزن مولکولی دارد (۲۲).

در سال ۲۰۰۱ لیوانون و همکاران ۱۲ واریانت از RUNX1 را شناسایی نمودند که در انتهای ۳-پریم و ۵-پریم با یکدیگر متفاوت بودند و پروتئین‌هایی از ۲۰ تا ۲۵ کیلودالتون را کد می‌کردند. تمامی این واریانت‌های حاوی قطعه حفاظت شده دومین Runt اتصال به DNA هستند (۲۳).

نتایج مطالعه حاکی از آن است در جمعیت ایرانی مبتلابه لوسمی حاد میلوئید ادغام ژنی AML\ETO وجود دارد. و محصول ژنی آن در بدن این افراد قابل ردیابی است. وجود و تعیین این ژن توسط آزمایشگاه در تعیین استراتژی درمانی بیماران مبتلا حائز اهمیت بوده و می‌تواند در تسهیل امر درمان و نیز موفقیت آن مفید باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه دوستان و همکاران در مرکز تحقیقات بیمارستان امام خمینی (ره) تهران تشکر و قدردانی می‌کنیم که ما را در انجام این مطالعه همیاری نمودند.

### References

- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005;106:899-902. doi: 10.1182/blood-2005-02-0560
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-5.
- Berndt P, Hobohm U, Langen H. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis* 1999;20:3521-6. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3521::AID-ELPS3521>3.0.CO;2-8
- Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:1416-24.
- Bitter MA, Le Beau MM, Rowley JD, Larson RA, Golomb HM, Vardiman JW. Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias. *Hum Pathol* 1987;18, 211-25.
- Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998;58:4173-9.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1605-16. doi: 10.1056/NEJMoa031046
- Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG. Molecular biology of acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997;24:32-44.
- Crute BE, Lewis AF, Wu Z, Bushweller JH, Speck NA. Biochemical and biophysical properties of the core-binding factor alpha2 (AML1) DNA-binding domain. *J Biol Chem* 1996;271:26251-60.
- Downing JR. The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br J Haematol* 1999;106:296-308.
- Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 1992;80:1825-31.
- Erickson RL, Hemati N, Ross SE, MacDougald OA. p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 2001;276:16348-55.
- Ferrara FF, Fazi F, Bianchini A, Padula F, Gelmetti V, Minucci S, et al. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2001;61:2-7.

حاضر ادغام ژنی AML\ETO در بیماران لوسمی میلوئیدی حاد مورد بررسی قرار گرفت که در ۵ نمونه از بیماران این ادغام مشخص شد. در مطالعه سازاوال و همکاران تحت عنوان "نمایه هماتولوژیکی و مولکولی لوسمی حاد میلوبلاستیک در هند" که با هدف غربالگری آبنرمالیتی‌های ژنتیکی شناخته شده در جمعیت هندی انجام شد، جمعاً تعداد ۱۱۳ نفر که براساس مورفولوژی خون محیطی و سیتوشیمی شناسایی شدند و براساس روش دسته‌بندی WHO طبقه‌بندی شده بودند. توزیع انواع بیماری M1(1), M2(32), M3(57), M4(14), M5(1),M6(1) و ۵ نفر فاقد طبقه مشخص بودند. سپس از RT-PCR برای بررسی ناهنجاری در جهش‌های PML/RAR, AML1/ETO, CBF/MYH11 و FLT3 استفاده شد. نتایج آنها نشان داد که از ۵۷ نفر با کلاس M3 تعداد ۵۵ نفر دارای نسخه‌ای از PML/RAR بودند. شیوع bcr3 (۶۲ درصد) بیشتر از bcr1 (۳۸ درصد) بود. FLT3 در بیش از سایر انواع AML به دست آمد و میزان AML1-ETO در ۱۶ نفر از ۵۶ که علائم هماتولوژیک مشخصی نداشتند مثبت شد. آنها نتیجه گرفتند که bcr3 بیش ساین است و در افراد با موتاسیون در FLT3 پیش‌آگهی ضعیف‌تر است (۲۷). در مطالعه بورخاردت و همکاران تحت عنوان "بررسی شیوع و ارتباط بالینی ادغام ژنی TEL/AML1 در کودکان مبتلابه لوسمی حاد لنفوبلاستیک که در مرکز چند منظوره خدمات درمانی ایتالیا-آلمان ثبت نام کرده‌اند" که با هدف بررسی میزان بروز TEL/AML1 در جمعیت‌های آلمانی و ایتالیایی صورت گرفت به بررسی این اختلال پرداختند. که طی آن ۳۳۴ کودک مبتلابه ALL پرداختند که ترانسلوکاسیون t(12;21) ۱۸/۹ درصد افراد بیمار را دربر می‌گرفت. ۶۳ نفر از نمونه‌های مثبت در رنج سنی ۱ تا ۱۲ سال بودند. آنها نتیجه گرفتند که برای بهبود تشخیص و طبقه‌بندی بیماری بهتر است پس از تشخیص اولیه ترانسلوکاسیون TEL/AML1 انجام گیرد (۲۸). در مطالعه وانگ و همکاران تحت عنوان "بررسی موتاسیون و افزایش بیان AML1-ETO and C-KIT در بیماران مبتلا/ به لوسمی t(8;21)" در پاسخ به درمان با Gleevec که با هدف شناسایی ناهنجاری‌های ژنتیکی در مبتلایان به AML انجام شد به بررسی ۱۱ نوع از جهش‌ها در ژن C-KIT پرداختند که با وقوع جهش در AML1-ETO همراهی داشتند؛ پرداختند. آنها متوجه شدند که جهش در ژن C-KIT در ۸۱/۳ درصد از افراد دارای t(8;21) رخ می‌دهد. آنها همچنین دریافتند که درمان با Gleevec همراه با سیتارابین در آنها اثر هم‌افزایی در القای آپوپتوزیس دارند لذا از آن به‌عنوان یک درمان مؤثر در این افراد نام بردند. در مطالعه حاضر نیز بیان ژن AML\ETO در بیماران لوسمی میلوئیدی حاد نشان داد می‌تواند در تعیین استراتژی‌های درمانی مؤثر واقع شود.

14. Follows GA, Tagoh H, Lefevre P, Hodge D, Morgan GJ, Bonifer C. Epigenetic consequences of AML1-ETO action at the human c-FMS locus. *Embo J* 2003;22:2798-809. doi:10.1093/emboj/cdg250
15. Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* 1995;11:2667-74.
16. Frank RC, Sun X, Berguido FJ, Jakubowiak A, Nimer SD. The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene* 1999;18:1701-10.
17. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001;98:2091-100.
18. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1087-98. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0375
19. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998;92:2322-33.
20. Gurbuxani S, Xu Y, Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD. Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11480-5. doi:10.1073/pnas.0500303102
21. Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C. Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol* 2004;83:S97-100.
22. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54. doi:10.1056/NEJMra023075
23. Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J, Irvin B, Durst K, Linggi B. The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:177-83.
24. Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T, et al. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* 2002;8:1731-9.
25. Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13132-7.
26. Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14059-64.
27. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004;104:1266-9.
28. Kukuruzinska MA, Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:415-48.



## Evaluation of AML1 / ETO Gene Integration in Children with Leukemia Referring to Imam Khomeini Hospital, Tehran

Roghayeh Beykzadeh (M.Sc.)<sup>1</sup>, Aghil Tabar Molahasan (Ph.D.)<sup>2\*</sup>, Nematollah Razmmi (Ph.D.)<sup>3</sup>

1- Dept. of Biochemistry, School of Biology, Azad Islamic University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran.

2- Dept. of Immunology, School of Pyrapezshky, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran.

3- School of Biology, Azad Islamic University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran.

Received: 20 July 2017, Accepted: 6 September 2017

### Abstract:

**Introduction:** The integration of T (8; 21), or AML1-ETO, is the most common translocation in acute myeloid leukemia at both ages of children and adults. The occurrence of this genetic integration is effective in the future of the patient's treatment and has a prognostic role. In the Iranian population of acute leukemia, this genetic integration is unclear and its prevalence is unclear. Therefore, the present study aimed to investigate the integration of AML1 / ETO gene in children with leukemia referring to Imam Khomeini Hospital in Tehran.

**Methods:** In this cross-sectional study, 58 children with acute myeloid leukemia with different morphology during the year 95 were evaluated. After peripheral blood supply, the mononuclear cells of the patients were immediately removed. Also, the peripheral blood lymphoma was prescribed to confirm leukemia. Single-core cells were extracted from patients with complete RNA. Using PCR molecular techniques, Nested PCR and Real-Time PCR were used to evaluate the integration.

**Results:** The results of this study showed that the age range of the children was between 4-5 years old. The sex ratio was 53.5% female and 46.5% male. 80% of the subjects had this genetic integration, as well as their plasma mRNA was significant. In the peripheral blood test, hemoglobin concentration was 9.6 g / dl and the average white blood cell count was 70500 /  $\mu$ l.

**Conclusion:** Considering the frequency of integration of this gene translocation in the Iranian population studied, it seems that the use of this integration is useful for determining

**Keywords:** Leukemia, AML, ETO.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: A. Tabar Molahasan, Email: doctoragheel@yahoo.com

**Citation:** Beykzadeh R, Tabar Molahasan A, Razmmi N. Evaluation of AML1/ETO gene integration in children with leukemia referring to Imam Khomeini Hospital, Tehran. Journal of Knowledge & Health 2017;12(2):42-48.