

بررسی جهش‌های ژن N-RAS در اطفال مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)

- مهین بهزادی فرد¹، یوسف مرتضوی²، صادق رضاپور³، علی اکبر پورفتح اله⁴، سعید کاویانی⁵، منصوره حقیقی⁶، سمانه بهزادی فرد⁷
- 1- گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
 - 2- گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
 - 3- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
 - 4- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 5- گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 - 6- بیمارستان محک، تهران، ایران
 - 7- دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، الیگودرز، ایران

یافته / دوره سیزدهم / شماره 3 / پاییز 90 / مسلسل 49

چکیده

دریافت مقاله: 89/12/2، پذیرش مقاله: 90/1/21

Ø مقدمه: لوسمی حاد شایع‌ترین بدخیمی کودکان است. یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) جهش‌های مربوط به پروتوآنکوژن‌ها و تبدیل آنها به انکوژن‌ها می‌باشد. از جمله این پروتوآنکوژن‌ها، پروتوآنکوژن N-RAS است. از آنجایی که آماری از فراوانی جهش این ژن در کودکان ALL ایرانی وجود نداشت بر آن شدیم میزان فراوانی این جهش را در تعدادی از این بیماران بررسی و ارتباط این جهش‌ها را با سن، جنس و نوع ALL بررسی نماییم.

Ø مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی 60 نفر کودک بیمار با تشخیص ALL (32 نفر common-ALL، 20 نفر preBALL، 6 نفر T-ALL و 2 نفر BALL) با طیف سنی 11 ماهه تا 14 سال، شامل 40 نفر مذکر و 20 نفر مونث از نظر جهش‌های ژن N-RAS در کدون‌های 12، 13 و 61 با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

Ø یافته‌ها: جهش‌های N-RAS در 11/7% (7/60) بیماران شناسایی شد، بیشتر آنها مذکر و کمتر از 5 سال بودند. فراوانی کلی جهش‌ها در کدون‌های 12، 13 و 61 به ترتیب 8/3%، 3/3% و 1/7% به دست آمد و بیشتر بیماران دارای جهش c-ALL (71/4%) بودند.

Ø بحث و نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این تحقیق از نظر فراوانی جهش با آمار ارائه شده توسط سایر محققان تفاوت چندانی نداشت.

Ø واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک، ژن N-RAS، PCR-RFLP، پروتوآنکوژن

مقدمه

لوسمی حاد شایعترین بدخیمی کودکان است (1). 77% لوسمی‌های کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) و 11% از نوع میلو بلاستیک حاد (Acute Myeloblastic Leukemia) بوده و 12 درصد از سایر انواع لوسمی می باشد (2). در لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌سازهای لنفوسیت‌های B و T درگیر می‌شوند. جهش در پروتئین‌ها و تبدیل آنها به انکوژن از عوامل موثر در ایجاد بدخیمی‌ها است. جهش‌های انکوژن RAS از شایعترین تغییرات ژنتیکی در بدخیمی‌های انسان از جمله لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشند (3 و 4).

پروتئین 21 کیلودالتونی کد شده توسط ژن N-RAS نرمال در قسمت داخلی غشای پلاسمایی قرار می‌گیرد و با خاصیت اتصال به GTP موجب فعال شدن سیگنال‌های پائین دست از طریق مولکول‌های هدف مانند RAF کینازها، PI3 کیناز و MEK-1 کیناز می‌گردد (5-8). این سیگنال‌ها توانایی تحریک طیف وسیعی از پاسخ‌های بیولوژیکی از تکثیر تا مرگ سلول را به واسطه تحریک رونویسی و بیان ژنهای مؤثر در تکثیر، تمایز و آپوپتوزیس دارند (9).

در بدخیمی‌های مختلف خونی بیشتر ژن N-RAS دچار جهش می‌شود که ممکن است به علت بیان بالای این ژن در سلول‌های خونساز نسبت به K-RAS و H-RAS باشد (10). جهش در ژن RAS با فعال نمودن خاصیت پروتئین کینازی و در نهایت فعالیت فاکتورهای نسخه برداری می‌گردد، این تغییر موجب فعال نگه داشتن مسیرهای انتقال پیام و القا ترانسفورمسیون در سلول

می‌شود (11 و 12). جهش‌های این ژن نقطه‌ای بوده و بیشتر در کدون‌های 12، 13 و 61 رخ می‌دهد (13 و 14).

جهش ژن N-RAS در 6-11 درصد موارد ALL گزارش شده است (9 و 15). به منظور بررسی فراوانی جهش در کدون‌های 12، 13 و 61 ژن N-RAS در کودکان ایرانی و بررسی وجود ارتباط این جهش‌ها با سن، جنس و نوع لوسمی لنفوبلاستیک 60 نفر کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد از بیمارستان فوق تخصصی خون و انکولوژی محک تهران قبل از شروع شیمی درمانی توسط روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی 60 نفر کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد تازه تشخیص داده شده از بیمارستان فوق تخصصی خون و انکولوژی محک تهران شامل 40 نفر مذکر و 20 نفر مونث، با سن 11 ماه تا 14 سال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماری توسط آزمایشات تخصصی فلوسیتومتری و علائم بالینی توسط پزشک معالج تشخیص داده شد. این طرح در دهمین جلسه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی لرستان مورخ 87/12/14 (بند 2) به تصویب رسید. پس از کسب رضایت نامه کتبی از والدین بیماران 2 میلی‌لیتر خون محیطی در ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد. استخراج DNA با کیت dNP سیناژن انجام گردید. کدانهای 12، 13 و 61 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش Nested PCR تکثیر شدند. در این روش با استفاده از یک جفت پرایمر یک قطعه بزرگ‌تری از ژن تکثیر شده و سپس توسط پرایمرهای اختصاصی داخلی قسمت کوچکتري از ژن نیز تکثیر گردید (جدول 1).

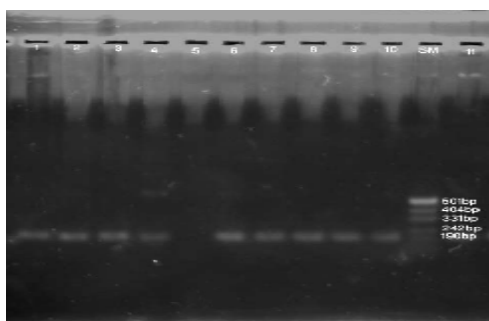
جدول شماره 1- توالی پرایمرهایی که مورد استفاده قرار گرفته اند

| طول قطعه تکثیر شده | توالی پرایمرها | نام پرایمر |
|--------------------|--|--|
| 189bp | NB12:5'ctctatggtgggatcatattca3' 231:5'aagcttaaagtactgtatg3' | NB12 و 231 پرایمرهای مربوط به تکثیر قطعه خارجی Nested PCR کدون های 12 و 13 |
| 60bp | 12R:5'tgctagtgcgcttttccaacatc3' 12F:5'atgactgagtacaaactggtg3' | پرایمرهای داخلی جهت تکثیر کدون 12 |
| 63bp | 13R:5'gattgctagtgcgcttttccatc3' 12F:5'atgactgagtacaaactggtg3' | پرایمرهای داخلی جهت تکثیر کدون 13 |
| 65bp | N61A:5'gacatactggatacagcggc3' N61B:5'cctgtcctcaatgtattgctc3' | پرایمرهای مربوط به تکثیر کدون 61 |

به ترتیب منجر به ایجاد قطعات (46 bp و 14 bp) و (15 bp و 48 bp) می‌گردد (شکل 2و3).

یافته‌ها:

کدون‌های 12، 13، 61 از ژن N-RAS ابتدا توسط پرایمرهای خارجی تکثیر گردید و سپس توسط پرایمرهای داخلی (Nested PCR) قطعات کوچکتری از ژن تکثیر شد. جهت بررسی جهش، محصولات PCR توسط آنزیم های برش زنده برش زده شد. بعلاوه کوچک قطعات حاصل از آنزیم محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شده و برای مشخص کردن باند های مربوطه، ژل با رنگ آمیزی اختصاصی نیترا ت نقره رنگ آمیزی شد (شکل 4-2). هضم محصولات PCR مربوط به کدون 61 با آنزیم MscI مانند کدونهای 12 و 13 انجام شد. در صورت عدم وجود جهش برش آنزیم باعث ایجاد قطعات (21 bp و 44 bp) می‌شود و در صورت وجود جهش آنزیم قادر به برش محصول PCR (65bp) نمی‌باشد (شکل 4).



شکل شماره 1- نتایج تکثیر قطعه خارجی Nested PCR بر روی ژل آگارز 1% SM (سایز مارکر)، C- نمونه کنترل منفی، و 11-1 نمونه بیماران می‌باشد.

واکنش PCR در حجم نهایی 25µL شامل 2/5 µL بافر 10X، 0/5µL، (50 mM) MgCl² 0/75 µL، 10 dNTPs، 0/5 µL از هر پرایمر با غلظت 10 µM، یک واحد آنزیم DNA Tag polymerase (سیناژن) و (200ng/µL) DNA (150 µL) ژنومی انجام گردید. دماهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه خارجی جهت کدون‌های 12 و 13 بدین شرح می‌باشد، دمای واسرشته سازی اولیه 94°C به مدت 3 دقیقه و برای یک دور و سپس واسرشته سازی 94°C، سی ثانیه و دمای اتصال 56°C، سی ثانیه، دمای توسعه 30°C، هفتاد و دو ثانیه برای 35 دور و دمای توسعه نهایی 72°C به مدت 10 دقیقه و برای یک دور. جهت تکثیر قطعه داخلی مربوط به کدون 12 و 13 از شرایط فوق و دمای اتصال 62°C، در مورد PCR مربوط به کدون 61 از دمای اتصال 60°C استفاده گردید.

پس از انجام PCR جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد بررسی، محصولات PCR روی آگارز 1/5% (سیگما، آلمان) الکتروفورز شدند. جهت هضم محصولات PCR مربوط به کدون 12 و 13، 5µL از محصول PCR مربوط به کدون 12 یا 13، 1/5 µL بافر 10X به همراه 0/5 µL آنزیم HphI (Bio Labs، انگلستان) برای مدت 12 ساعت در 37°C آنکوبه گردید. در صورت وجود جهش، آنزیم قادر به برش محصول PCR (60bp) مربوط به کدون 12 و 63bp مربوط به کدون 13 نمی‌باشد و در صورت عدم وجود جهش در مورد کدون 12 و 13 آنزیم محصولات PCR را برش زده و

هتروزایگوت بودند و هیچ جهش هموزایگوتی مشاهده نگردید. 5 نفر از بیماران دارای جهش مذکر و 2 نفر مونث بودند. 6 نفر از بیماران دارای جهش، کمتر از 5 سال و 1 بیمار بیش از 5 سال سن داشتند. فراوانی کلی جهش‌ها در کدونهای 12، 13 و 61 به ترتیب 3/3%، 1/7% و 28/6% به دست آمد. یک بیمار همزمان در کدون‌های 12 و 13 دارای جهش بود (جدول 2) 71/4% بیماران دارای جهش از نوع ALL - c و 28/6% جهش‌ها در بیماران TALL شناسایی شد.

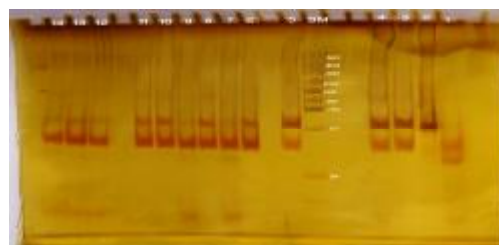
جدول شماره 2- مشخصات بیماران دارای جهش در کدونهای 12، 13 و 61 ژن N-RAS

| شماره بیمار | تشخیص نوع ALL | سن (ماه) | جنس | موتاسیون کدون |
|-------------|---------------|----------|------|---------------|
| 1 | c- ALL | 36 | مذکر | 61 |
| 2 | c- ALL | 24 | مونث | 13 |
| 3 | c- ALL | 30 | مذکر | 12 |
| 4 | c- ALL | 60 | مذکر | 13 |
| 5 | T-ALL | 38 | مونث | 12 |
| 6 | T-ALL | 72 | مذکر | 13 |
| 7 | c- ALL | 42 | مذکر | 12 |

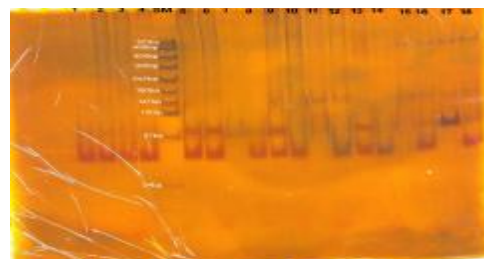
بحث و نتیجه‌گیری:

پروتوآنکوژن NRAS از خانواده RAS است این خانواده شامل ژنهای NRAS, K-RAS و HRAS بوده که در بدخیمی‌های خونی بیشتر NRAS دچار موتاسیون می‌شود. این ژن روی کروموزوم 1(1p13.2) قرار داشته و از 4978 bp تشکیل شده است. این ژن P21RAS را کد می‌نماید که خاصیت GTPase داشته و به نظر می‌رسد نقش آن در کنترل رشد سلول باشد. جهش‌های نقطه‌ای در کدون‌های 12، 13 و 61 ژن N-RAS در حالت فعال متصل به GTP داشته و با فعالیت پیوسته مسیر سیگنالینگ موجب القاء ترانسفورماسیون می‌شود (11، 12).

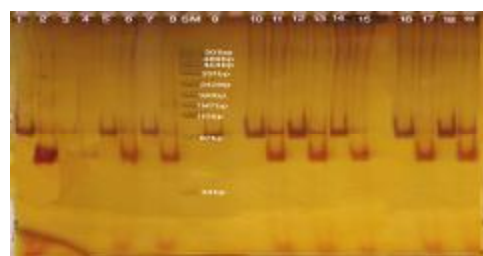
تحقیقات نشان داده که در 11-6% موارد در بیماران ALL در کدون‌های 12، 13 و 61 از ژن RAS جهش ایجاد و باعث ALL می‌گردد (9 و 15). نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که 8/3% بیماران



شکل شماره 2- نتایج هضم آنزیمی محصولات تکثیر شده کدون 12 بر روی ژل پلی اکریل آمید 7%؛ ستون SM سایز مارکر pUC19، ستون 1 هضم نمونه نرمال، ستون 2 نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستونهای 3 الی 14 نشان دهنده هضم آنزیمی محصولات Nested PCR کدون 12 با آنزیم HphI می باشد. نمونه های 3، 4، 5، 6، 8، 10 و 11 دارای جهش و نمونه های 7، 9، 12، 13 و 14 فاقد جهش می باشند.



شکل شماره 3- نتایج هضم آنزیمی محصولات PCR مربوط به کدون 13. ستون SM سایز مارکر pUC19، ستون 16 هضم نمونه نرمال، ستون 17 نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستونهای 3 الی 14 نشان دهنده هضم آنزیمی محصولات Nested PCR کدون 13 می باشد، نمونه های 5، 6، 9، 13 دارای جهش و ستون های 3، 4، 7، 8، 10، 11، 12، 14، 16 شامل نمونه های فاقد جهش می باشند.



شکل شماره 4- الکتروفورز هضم آنزیمی محصولات PCR کدون 61 روی ژل پلی اکریل آمید 7%، ستون SM سایز مارکر و ستون 1 نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستون 2 نمونه نرمال با هضم آنزیمی، ستونهای 11، 13، 19 نمونه های دارای جهش و ستون های 5، 7، 9، 10، 12، 14، 16، 18 نمونه های بدون هضم آنزیمی است که در کناره نمونه های هضم شده به عنوان کنترل گذاشته شده است.

به طور کلی جهش‌های ژن N-RAS در 11/7% (7/60) بیماران شناسایی شد (جدول 2). جهش‌های شناسایی شده همگی

در کدون 12، 3/3% در کدون 13 و 1/7% در کدون 61 دارای جهش هستند. مطالعه یوکوتا و همکاران از 125 کودک ALL نشان داد 11% بیماران در کدون‌های 12، 13 و 61 ژن N-RAS دارای جهش بودند(6). مطالعه ناکائو و همکاران نشان داد 10% کودکان ALL دارای جهش N-RAS بودند، 13 نفر در کدون 12، سه نفر در کدون 13 و در کدون 61 موتاسیونی گزارش نکردند(11).

در مطالعه پرنسیس و همکاران روی 870 کودک ALL موتاسیون ژن N-Ras، 10/7% گزارش شد که 9/3% در کدون‌های 12 و 13 و 1/4% در کدون 61 دارای جهش بودند(4). مطالعه یوکوتا از 125 کودک ALL ژاپنی شامل 64 نفر c-ALL، 22 نفر preBALL، 33، TALL، 2 نفر BALL، 3 نفر ALL تمایز نیافته و 1 نفر ALL طبقه‌بندی نشده، میزان موتاسیون مذکور را 11% گزارش نمود(16). این مطالعات فراوانی مشابهی از جهش ژن N-RAS را در مقایسه با مطالعه حاضر نشان می‌دهد. در مطالعه ناکائو در کدون 61 جهشی شناسایی نشد(11)، ولی در مطالعه پرنسیس میزان جهش در کدون 61، 1/4% و در مطالعه حاضر میزان این جهش 1/7% به دست آمد. بیشتر بیماران دارای جهش در تحقیق حاضر زیر 5 سال (با میانگین 3/6 سال) بودند، در حالی که بیماران فاقد جهش میانگین سنی بالای 5 سال داشتند. در این تحقیق ما بررسی‌های بیشتری به منظور یافتن ارتباط بین نوع ALL و جهش‌های ژن N-RAS صورت گرفت. از میان 60 نفر بیمار مبتلا به ALL که شامل 32 نفر Common ALL، 20 نفر Pre BALL، 6 نفر TALL و 2 نفر

BALL، جهش‌های کدانهای 13، 12 و 61 در 5 نفر (71/4%) از بیماران c-ALL و 2 نفر (28/6%) TALL شناسایی شدند. در حالیکه در بیماران Pre BALL و BALL هیچ‌گونه جهشی شناسایی نشد. این بررسی نشان داد بین وقوع جهش‌های ژن N-RAS و c-ALL ارتباط وجود دارد. در مطالعه یوکوتا 9 نفر از کودکان (64/2%) cALL، 3 نفر (24/1%) TALL و 2 نفر (11/7%) از نوع ALL تمایز نیافته بودند که تا حدودی با مطالعه حاضر مشابهت دارد. در تحقیق ما، از بین بیماران دارای جهش در کدون‌های 12، 13 و 61 ژن N-RAS، 71/4% بیماران مذکر و 28/6% مونث می‌باشند که نسبت فراوانی بیشتری از جهش در جنس مذکر را نسبت به مونث نشان می‌دهد. البته این نتیجه می‌تواند به علت تعداد بیشتر بیماران مذکر در مقایسه با جنس مؤنث باشد. لذا در تحقیقات آینده استفاده از تعداد مساوی از انواع ALL و بررسی تعداد بیشتری از بیماران در تعداد برابری از دو جنس در مطالعات مشابه می‌تواند نتایج معتبرتری را فراهم سازد. همچنین استفاده از روش‌های دیگری مانند Direct Sequencing در کنار PCR-RFLP می‌تواند دقت بیشتری را جهت شناسایی این جهش را فراهم نماید.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان به دلیل تامین هزینه‌های مورد نیاز و نیز از کارکنان بیمارستان فوق تخصصی محک به‌ویژه همکاران بخش هماتولوژی قدردانی می‌نماییم.

References

1. Bomken SN, Vormoor J H. Childhood leukaemia. *Leukemia* 2009,19: 345-50
2. Tubergen DG, Bleyer A. *Leukemia*. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of pediatrics. 17th edition. Philadelphia, WB Saunders 2004: 1694-7
3. Parikh C , Ren R. Mouse Model for NRAS-Induced Leukemogenesis. *Methods in Enzymology* 2008,439: 15-24
4. Perentesis J P , Bhatia S B, Boyle E c, Shao Y D, Shu X O D, Steinbuch M E et al. RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004,18(4): 685-92
5. Appelbaum F, Row J, Radich J and Dick J. Acute myeloid leukemia . *Blood* 2001:62-86
6. Rodriguez-Viciana P , Tetsu O , Oda K , Okada J , Rauen K , McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005,70:461-6
7. Repasky G A, Chenette E J b, Der C J. Renewing the conspiracy theory debate: Does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biology* 2004;14(11): 639-47
8. Case M A, Matheson E a, Minto L a, Hassan R d, Harrison C J E, Bown N B, et al. Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia . *Cancer Research* 2008,68: 6803
9. Hirai H, Kobayashi Y, Mano H, Hagiwara K, Maru y, Omine M, et al. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* 1987, 327: 430-32
10. Bos JL, Toksoz D, Marshal CJ, Verlaan-de vries M, Veeneman GH, Van der Eb AJ ,et al. Amino acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukemia. *Nature* 1985 , 315:726-30
11. Farr C J ,Saiki R K, Erlich H A, McCormick F. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 1629-33
12. Bowen D T, Frew M E, Rollinson S, Roddam P L, Dring A, Smith M.T et al. CYP12B allele is over expressed in subgroup of acute myeloid leukemia with poor-risk karyotype associated with N-RAS mutation, but not associated with Flt3 internal tandem duplication. *Blood* 2003, 101:2770-74
13. Oliveira, J B a g, Bidère N b, Niemela J E A, Zheng L B, Sakai K B, Nix C P, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007,104(21): 8953-58
14. Ahuja A ,Foti HG, Bar-Eli M, Cline MJ . The pattern of mutational involvement of Ras gene in human hematological malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood* 1990,75: 1684-90
15. M Lubbert, J Mirro , CW Miller, J Kahan, G Isaac, G Kitchingman. N-ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlate with a poor prognosis. *Blood* 1990,75(5): 1163-69
16. Seriu T, Horiike S, Nakao M, Yokota S, et al. Mutational analysis of the N-ras gene in acute

lymphoblastic leukemia: a study of 125 Japanese pediatric cases. Hematol Int J 1998,67(4): 379-87.

17. Keersmaecker K D, Marynen P, Cools J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2005, 90:1116-27