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

مهین بهزادی‌فرد[1]، یوسف مرتضوی[2]، صادق رضاپور[3]، علی اکبر پورفتح اله[4]، سعید کاویانی[5]، منصوره حقیقی[6]، سمانه بهزادی فرد[7]

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

مقدمه: لوسمی حاد شایعترین بدخیمی کودکان است. یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) جهش های مربوط به پروتوانکوژنها و تبدیل آنها به انکوژن ها می باشد. از جمله این پروتوانکوژنها، پروتوانکوژن 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 جهش ها را با سن، جنس و نوع ALL بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی 60 نفر کودک بیمار با تشخیص ALL (32نفر common-ALL، 20نفر preBALL، 6 نفر T-ALL و2 نفر BALL) با طیف سنی 11 ماهه تا 14 سال،شامل 40 نفر مذکر 20 نفر مونث از نظر جهش های ژن N-RAS در کدون‌های 12، 13 و 61 با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: جهش‌های N-RAS در 11/7% (7/60) بیماران شناسایی شد، بیشتر آنها مذکر و کمتر از5 سال بودند. فراوانی کلی جهش ها در کدونهای 12، 13 و 61 به ترتیب 8/3%، 3/3% و1/7% به دست آمد و بیشتر بیماران دارای جهش (71/4%) c-ALL بودند.

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

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

آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، کیلومتر3جاده خرم‌آباد -بروجرد، پردیس دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان،دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی
پست الکترونیک: mahin_behzadi@yahoo.com

مقدمه

لوسمی حاد شایعترین بدخیمی کودکان است(1). 77% لوسمی‌های کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) و 11% از نوع میلوبلاستیک حاد(Acute Myeloblastic Leukemia)بوده و 12درصد از سایر انواع لوسمی می باشد(2). درلوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌سازهای لنفوسیت‌هایTوB درگیر می‌شوند. جهش در پروتوانکوژنها 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(3و4).

پروتئین21 کیلودالتونی کد شده توسط ژنN-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 وMEK-1 کیناز می‌گردد(8-5).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 ترانسفورماسیون در سلول می‌شود(11و12). جهش‌های این ژن نقطه‌ای بوده و بیشتر در کدون‌های12،13و61رخ می‌دهد(13و14).

جهش ژن N-RAS در11-6 درصد مواردALL گزارش شده است(9و15).به منظور بررسی فراوانی جهش درکدون‌های 12،13و61 ژن N-RAS در کودکان ایرانی و بررسی وجود ارتباط این جهش‌ها با سن، جنس و نوع لوسمی لنفوبلاستیک60 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 شامل40 نفر مذکر و20نفر مونث، با سن11ماه تا 14سال 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 (بند2) 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 کیتdNP سیناژن انجام گردید. کدانهای 12،13و61 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 کوچکتری از ژن نیز تکثیر گردید(جدول1).

جدول شماره 1-توالی پرایمرهایی که مورداستفاده قرار گرفته اند

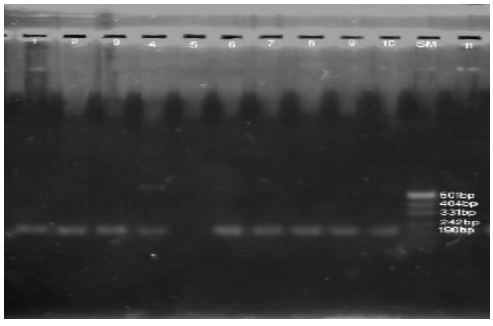
نام پرایمر	توالی پرایمرها	طول قطعه تکثیر شده
NB12و231 پرایمرهای مربوط به تکثیر قطعه خارجی Nested PCR کدون های 12و13	NB12:5'ctctatggtgggatcatattca3' 231:5'aagctttaaagtactgtagat3'	189bp
پرایمرهای داخلی جهت تکثیر کدون 12	12R:5'tgtcagtgcgcttttcccaacatc3' 12F:5'atgactgagtacaaactggtggtg3'	60bp
پرایمرهای داخلی جهت تکثیر کدون 13	13R:5'gattgtcagtgcgcttttcccatc3' 12F:5'atgactgagtacaaactggtggtg3'	63bp
پرایمرهای مربوط به تکثیر کدون 61	N61A:5'gacatactggatacagcggc3' N61B:5'cctgtcctcaatgtattggtc3'	65bp

واکنش PCR در حجم نهایی 25µL شامل 2/5 µL بافر10X، 0/75 µL، (50 mM) $MgCl^2$ 0/5µL، (10 mM dNTPs) 0/5 µL ، از هر پرایمر با غلظت 10 µM ، یک واحد آنزیمTag polymerase DNA (سینا ژن) و (200ng/µL-150) 1 µL DNA ژنومی انجام گردید. دماهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه خارجی جهت کدون‌های 12 و 13 بدین شرح می‌باشد، دمای واسرشته سازی اولیه 94^oC به مدت3دقیقه و برای یک دور و سپس واسرشته سازی 94^oC ، سی ثانیه و دمای اتصال 56^oC ، سی ثانیه، دمای توسعه 30^oC، هفتاد و دو ثانیه برای 35 دور و دمای توسعه نهایی 72^oC به مدت10 دقیقه و برای یک دور. جهت تکثیر قطعه داخلی مربوط به کدون 12 و 13 از شرایط فوق و دمای اتصال 62^oC، در موردPCR مربوط به کدون 61 از دمای اتصال 60^oC استفاده گردید.

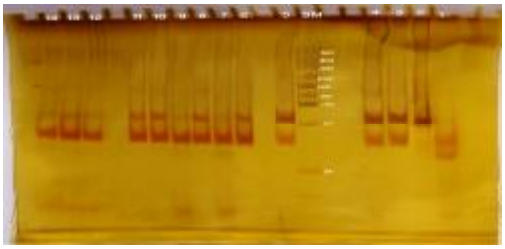
پس از انجامPCR جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد بررسی، محصولات PCR روی آگارز 1/5%(سیگما، آلمان) الکتروفورزشدند . جهت هضم محصولات PCR مربوط به کدون 12و 13، 5µL از محصول PCR مربوط به کدون 12 یا 13، 1/5 µL بافر10X به همراه 0/5 µL آنزیم HphI (Bio Labs، انگلستان) برای مدت 12 ساعت در 37^oC آنکوبه گردید. در صورت وجود جهش، آنزیم قادر به برش محصول PCR (60bp) مربوط به کدون 12 و 63bp مربوط به کدون 13 نمی باشد و در صورت عدم وجود جهش در مورد کدون 12 و 13 آنزیم محصولات PCR را برش زده و به ترتیب منجر به ایجاد قطعات (14bp و46 bp) و (15 bp و 48 bp) می گردد(شکل 2و3).

یافته‌ها:

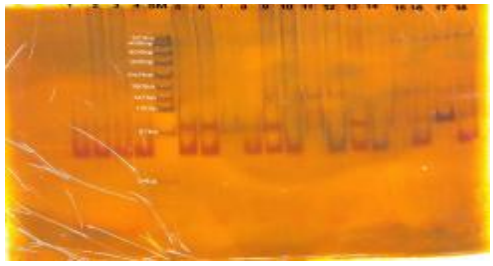
کدون‌های 12،13،61 از ژن N-RAS ابتدا توسط پرایمرهای خارجی تکثیر گردید و سپس توسط پرایمر های داخلی (Nested PCR) قطعات کوچکتری از ژن تکثیر شد. جهت بررسی جهش، محصولات PCR توسط آنزیم های برش زننده برش زده شد. بعلت کوچکی قطعات حاصل از آنزیم محصولات بر روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شده و برای مشخص کردن باند های مربوطه ، ژل با رنگ آمیزی اختصاصی نیترات نقره رنگ آمیزی شد (شکل 4-2). هضم محصولات PCR مربوط به کدون 61 باآنزیم MscI مانند کدونهای 12 و 13 انجام شد. در صورت عدم وجود جهش برش آنزیم باعث ایجاد قطعات(21bp و44 bp) می شود و درصورت وجود جهش آنزیم قادر به برش محصول PCR (65bp) نمی باشد (شکل4).



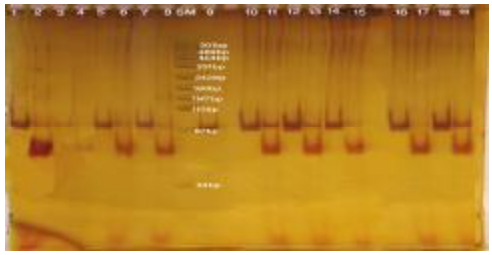
شکل شماره1-نتایج تکثیر قطعه خارجی Nested PCR بر روی ژل اگارز 1%. SM (سایز مارکر)،-C نمونه کنترل منفی، و 1-11 نمونه بیماران می باشد.



شکل شماره2- نتایج هضم آنزیمی محصولات تکثیر شده کدون 12 بـر روی ژل پلـی اکریل آمید 7% ستون SM سایز مارکر pUC19، ستون 1 هضم نمونه نرمال، ستون 2 نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی،سـتونهای 3 الـی 14نـشان دهنـده هـضم آنزیمـی محصولات Nested PCRکدون 12 با آنزیم HphI می باشد. نمونه هـای 3، 4، 5، 6، 8، 10و 11 دارای جهش و نمونه های 7، 9، 12، 13و 14 فاقد جهش می باشند.



شکل شماره3- نتایج هضم آنزیمی محصولات PCR مربوط بـه کـدون 13. سـتون SM سایز مارکر PUC19، ستون 16 هضم نمونه نرمال، ستون 17 نمونه نرمـال بـدون هضم آنزیمی،ستونهای 3 الی 14 نـشان دهنـده هـضم آنزیمـی محـصولات PCR Nestedکدون 13 می باشد، نمونه های 5، 6، 9، 13 دارای جهش و ستون هـای 1،2، 3، 4، 7، 8، 10، 11، 12، 14،16 شامل نمونه های فاقد جهش می باشند.



شکل شماره4- الکتروفورز هضم انزیمی محـصولات PCR کـدون 61 روی ژل پلـی اکریل آمید 7% ستون SM سایز مارکر و ستون 1 نمونه نرمال بـدون هـضم آنزیمـی، ستون 2 نمونه نرمال با هضم آنزیمی، ستونهای11، 13، 19 نمونـه هـای دارای جهـش و ستون های 5، 7، 9، 10، 12، 14، 16، 18 نمونه های بدون هـضم آنزیمـی اسـت کـه در کناره نمونه های هضم شده به عنوان کنترل گذاشته شده است.

بـه طـور کلـی جهـش‌هـای ژن N-RAS در 11/7% (7/60) بیماران شناسایی شد (جدول 2). جهش های شناسـایی شـده همگـی هتروزیگوت بودند و هیچ جهش هموزایگوتی مشاهده نگردیـد. 5 نفـراز بیماران دارای جهـش مـذکر و 2 نفـر مونـث بودنـد. 6 نفـر از بیمـاران دارای جهش، کمتر از 5 سال و 1 بیمار بـیش از 5 سـال سـن داشـتند. فراوانی کلی جهـش هـا در کـدونهای 12، 13 و 61 بـه ترتیـب 8/3%، 3/3% و1/7% به دست آمد. یک بیمـار همزمـان در کـدون هـای 12و 13 دارای جهش بود (جـدول 2) 71/4% بیمـاران دارای جهـش از نـوع c- ALL، و 28/6% جهش ها در بیماران TALLشناسایی شد.

جدول شماره2-مشخصات بیماران دارای جهش در کدونهای 12، 13 و 61 ژن N-RAS

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

بحث و نتیجه‌گیری:

پروتوانکوژن 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 P21RASرا کد می‌نماید که خاصیت GTPase داشته و به نظر می‌رسد نقش آن در کنترل رشد سلول باشد. جهش‌های نقطه‌ای در کدون‌های 12،13 و61 ژن N-RAS، P21RAS را در حالت فعال متصل به GTP نگه داشته و با فعالیت پیوسته مسیر سیگنالینگ موجب القاء ترانسفورماسیون می‌شود (11،12).

تحقیقات نشان داده که در 11-6%درصد موارد در بیماران ALL در کدون‌های 12، 13 و 61 از ژن RAS جهش ایجاد و باعث ALL می‌گردد(9و15). نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که 8/3% بیماران

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 پرنتسیس و همکاران روی 870 کودک ALL موتاسیون ژن N-Ras ، 10/7% گزارش شد که 9/3% در کدون‌های12 و13 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 نفر ،TALL،2 نفر BALL ، 3 نفر ALL تمایز نیافته و1 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 پرنتسیس 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 زیر5 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 60نفر بیمار مبتلا به ALL که شامل 32 نفر Common ALL، 20نفر Pre BALL ، 6 نفر TALL و 2 نفر BALL ، جهش های کدانهای 12،13و61 در 5 نفر(71/4٪)از بیماران c-ALL و 2 نفر (28/6٪) TALL شناسائی شدند. در حالیکه در بیماران Pre BALL و BALL هیچ‌گونه جهشی شناسائی 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 و61 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 هزینه های مورد نیاز و نیز از کارکنان بیمارستان فوق تخصصی محک به‌ویژه همکاران بخش هماتولوژی قدردانی می نماییم.

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 .a 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 expresented 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

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

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