

## بررسی جهش کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)

دکتر یوسف مرتضوی<sup>۱</sup>، مهین بهزادی فرد<sup>۲</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله<sup>۳</sup>، دکتر سعید کاویانی<sup>۴</sup>، دکتر عبدالامیر فیضی<sup>۵</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

لوسمی میلوئیدی حاد (AML) شامل گروه هتروژنی از بیماری‌های بدخیم سلول‌های پیش‌ساز سیستم خونی است که با توقف بلوغ سلولی همراه می‌باشد. یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده این بیماری، جهش‌های مربوط به پروتئوآنکوژن‌ها و تبدیل آن‌ها به انکوژن است. از جمله این پروتئوآنکوژن‌ها، پروتئوآنکوژن N-RAS می‌باشد. از آن جا که آماری از فراوانی جهش این ژن در بیماران AML 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 زیر گروه FAB بررسی نماییم.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. کلیه بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون بیمارستان شریعتی در سال ۸۴-۸۳ که تشخیص AML برای آن‌ها داده شده بود، وارد مطالعه شدند. در این مطالعه ۶۰ بیمار با تشخیص AML از نظر جهش‌های ژن N-RAS در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور قبل از شروع درمان از بیماران نمونه خون محیطی اخذ و استخراج DNA ژنومی انجام شد. هر یک از کدون‌های فوق توسط PCR تکثیر شدند و محصولات PCR برای ارزیابی جهش توسط آنزیم‌های خاص برش زده شدند.

#### یافته‌ها

جهش‌های ژن N-RAS در ۲۰٪ (۱۲/۶۰) بیماران شناسایی شد، بیشتر آن‌ها مرد و بالای ۴۰ سال بودند. فراوانی جهش‌ها در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ به ترتیب ۱۵٪، ۱۱/۶٪ و ۵٪ به دست آمد و وقوع آن‌ها بیشتر در زیر گروه AML-M4 بود.

#### نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به دست آمده در این تحقیق از نظر فراوانی وجود جهش، با آمار ارایه شده توسط سایر محققان تفاوت چندانی نداشت. اما این تحقیق فراوانی بیشتری از جهش کدون ۶۱ را در مقایسه با برخی از مطالعات قبلی نشان داد. مطالعه تعداد بیشتری از بیماران در گروه‌های برابر از نظر جنسیت و زیر گروه‌های FAB و نیز استفاده هم زمان از روش سکوانس نمودن مستقیم ژن در کنار PCR-RFLP برای حصول نتیجه بهتر در مطالعات آینده توصیه می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** لوسمی میلوئیدی حاد، جهش، PCR

تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۲۰

۱- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان - شهرک کارمندان - دانشکده پزشکی - کدپستی: ۴۵۱۳۹۵۶۱۱۱

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشگاه تربیت مدرس

۳- PhD ایمونولوژی - استاد دانشگاه تربیت مدرس

۴- PhD هماتولوژی - استادیار دانشگاه تربیت مدرس

۵- متخصص آسیب‌شناسی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

## مقدمه

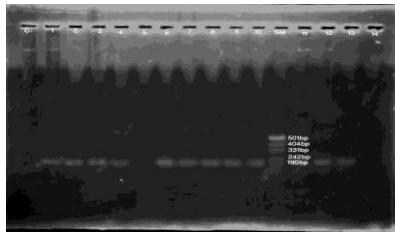
لوسمی میلوئیدی حاد، گروه هتروژنی از بیماری‌های بدخیم سلول‌های پیش‌ساز سیستم خونساز بوده که قادر به بلوغ نرمال نمی‌باشد (۱). جهش‌های مربوط به پروتئوآنکوژن‌های RAS (H-RAS, K-RAS, N-RAS) از شایع‌ترین جهش‌های شناسایی شده در بدخیمی‌های انسانی به ویژه آدنوکارسینومای پانکراس، کولون، ریه، تومورهای تیروئید و بدخیمی‌های خونی از جمله لوسمی میلوئیدی حاد، سندروم‌های میلودیسیپلاستیک و مالتیپل میلوما می‌باشند (۲، ۳، ۴). پروتئین ۲۱ 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 پایین دست از طریق مولکول‌های هدف مانند RAF کینازها، P13 کیناز و MEK-1 کیناز می‌گردد (۵). 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 (۶، ۷).

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 (۸). جهش در ژن RAS از طریق اتصال پروتئین RAS به GTP، باعث فعال شدن خاصیت پروتئین کینازی و در نهایت فعال شدن فاکتورهای نسخه‌برداری می‌گردد که این به نوبه خود باعث نگه‌داشتن مسیرهای انتقال پیام و القای ترانسفورماسیون در سلول می‌شود. جهش‌های این ژن نیز باعث فعال نگه‌داشتن مسیرهای انتقال پیام و القای ترانسفورماسیون در سلول می‌شود. جهش‌های این ژن نقطه‌ای بوده و در بیشتر کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ رخ می‌دهند. جهش ژن N-RAS در ۱۵ تا ۳۰ درصد موارد گزارش شده است (۹، ۱۰). به منظور بررسی فراوانی جهش در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS و ارتباط وجود این جهش‌ها با سن، جنس و زیر گروه FAB، ۶۰ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد از بیمارستان شریعتی تهران قبل از شروع شیمی درمانی توسط روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند.

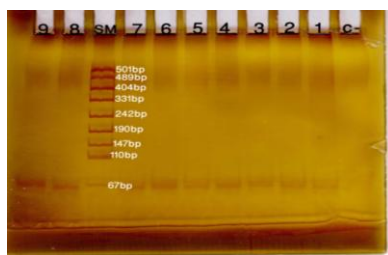
## مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. تمام بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون بیمارستان شریعتی تهران در سال ۱۳۸۴-۱۳۸۳ که تشخیص AML برای آنان داده شده بود، وارد مطالعه شدند. ۶۰ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد تازه تشخیص داده شده شامل ۲۵ زن و ۳۵ مرد، با سن ۵۷-۱۴ سال مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص بیماری به کمک آزمایش‌های تخصصی و علائم بالینی توسط پزشک معالج گذاشته شد و بیماران بر اساس طبقه‌بندی FAB تقسیم‌بندی گردیدند. قبل از شروع شیمی درمانی، ۲ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی بر روی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و استخراج DNA با کیت dNP (سیناژن، ایران) انجام شد. کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ با آغازگرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر گردیدند. در این تحقیق برای تکثیر قطعات مورد نظر از روش Nested PCR استفاده شد. یعنی ابتدا توسط یک جفت آغازگر قطعه بزرگ‌تری از ژن تکثیر شد و سپس توسط آغازگرهای اختصاصی داخلی، قسمت کوچکتری از ژن تکثیر گردید. کدون‌های ۶۱، ۱۳، ۱۲ از ژن N-RAS ابتدا توسط آغازگرهای خارجی تکثیر گردیدند و سپس توسط آغازگرهای داخلی (Nested) قطعات کوچکتری از ژن تکثیر شد. جهت بررسی جهش، محصولات PCR توسط آنزیم‌های برش زننده برش زده شد. به علت کوچکی قطعات حاصل از برش آنزیم، محصولات بر روی ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز شدند و برای مشخص کردن باندهای مربوطه، ژل‌ها توسط رنگ‌آمیزی اختصاصی نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردیدند (شکل‌های ۱-۳). آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم تک پلی‌مراز DNA (سیناژن) و ۱ میکرولیتر (۲۰۰ ng/μL - ۱۵۰) DNA ژنومی انجام گردید. دماهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه خارجی کدون‌های ۱۲ و ۱۳ بدین شرح می‌باشد، دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۴°C به مدت ۳



شکل ۱: نتایج هضم آنزیمی HphI محصولات تکثیر شده کدون ۱۲ بر روی ژل پلی اکریل آمید ۷٪، ستون SM سایز مارکر pUC19، ستون ۱ هضم نمونه نرمال، ستون ۲ نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستون‌های ۳ الی ۱۴ نشان دهنده هضم آنزیمی محصولات Nested PCR می‌باشد. نمونه‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۱ دارای جهش و نمونه‌های ۷، ۹، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ فاقد جهش می‌باشند.



شکل ۲: نتایج هضم آنزیمی محصولات PCR مربوط به کدون ۱۳. ستون SM سایز مارکر pUC19، ستون ۱۶ هضم نمونه نرمال، ستون ۱۷ نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستون‌های ۳ الی ۱۴ نشان‌دهنده هضم آنزیمی محصولات Nested PCR می‌باشد. نمونه‌های ۵، ۶، ۹، ۱۳ دارای جهش و ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶ شامل نمونه‌های فاقد جهش هستند.



شکل ۳: الکتروفورز هضم آنزیمی محصولات PCR کدون ۶۱ روی ژل پلی اکریل آمید ۷٪، ستون SM سایز مارکر و ستون ۱ نمونه نرمال بدون هضم آنزیمی، ستون ۲ نمونه نرمال با هضم آنزیمی، ستون‌های ۱۱، ۱۳، ۱۹ نمونه‌های دارای جهش و ستون‌های ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ نمونه‌های بدون هضم آنزیمی است که در کنار نمونه‌های هضم شده به عنوان کنترل گذاشته شده است.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت PCR ژن N-RAS به همراه طول قطعات تکثیر شده

| نام آغازگر                                                                 | توالی آغازگرها                                                          | طول قطعه تکثیر شده |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| NB12 و ۲۳۱ آغازگرهای مربوط به تکثیر قطعه خارجی Nested PCR کدون‌های ۱۲ و ۱۳ | NB12:5'ctctatgggtgggatcatattca3'<br>231:5'aagctttaag tactgttagat3'      | ۱۸۹ bp             |
| آغازگرهای داخلی جهت تکثیر کدون ۱۲                                          | 12R:5'tgtcagtcgcctttcccaacatc3'<br>12F:5'atgactgagtagtacaactgggtgggtg3' | ۶۰ bp              |
| آغازگرهای داخلی جهت تکثیر کدون ۱۳                                          | 13R:5'gattgtcagtcgcctttcccatc3'<br>12F:5'atgactgagtagtacaactgggtgggtg3' | ۶۳ bp              |
| آغازگرهای مربوط به تکثیر کدون ۶۱                                           | N61A:5'gacatactggatacagcggc3'<br>N61B:5'cctgtcctcaatgtattgggtc3'        | ۶۵ bp              |

دقیقه برای یک سیکل و سپس واسرشته‌سازی  $94^{\circ}\text{C}$ ،  $30$  ثانیه و دمای اتصال  $56^{\circ}\text{C}$ ،  $30$  ثانیه، دمای توسعه  $72^{\circ}\text{C}$ ،  $30$  ثانیه برای  $35$  سیکل و دمای توسعه نهایی  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $10$  دقیقه و برای یک سیکل. جهت تکثیر قطعه داخلی مربوط به کدون ۱۲ و ۱۳ از شرایط فوق و دمای اتصال  $62^{\circ}\text{C}$  و در مورد PCR مربوط به کدون ۶۱ از دمای اتصال  $60^{\circ}\text{C}$  استفاده گردید. پس از انجام PCR جهت اطمینان از تکثیر قطعات مورد بررسی، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ (سیگما، آلمان) الکتروفورز شدند. جهت هضم محصولات PCR مربوط به کدون‌های ۱۲ و ۱۳،  $5$  میکرولیتر از محصول PCR مربوط به کدون ۱۲ یا ۱۳،  $1/5$  میکرولیتر بافر  $10\times$  به همراه  $0/5$  میکرولیتر آنزیم HphI (بیولب، انگلستان) برای مدت  $12$  ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. در صورت وجود جهش، آنزیم قادر به برش محصول PCR ( $60\text{bp}$ ) مربوط به کدون ۱۲ و  $63\text{bp}$  مربوط به کدون ۱۳ نمی‌باشد و در صورت عدم وجود جهش در مورد کدون ۱۲ و ۱۳ آنزیم محصولات PCR را برش زده و به ترتیب منجر به ایجاد قطعات ( $14\text{bp}$  و  $46\text{bp}$  و ( $46\text{bp}$  و  $15\text{bp}$ ) می‌گردد (شکل‌های ۱ و ۲).

## بحث

جهش‌های نقطه‌ای در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS،  $p^{21RAS}$  را در حالت فعال متصل به GTP نگه داشته و با فعالیت پیوسته مسیر سیگنالینگ موجب القای ترانسفورماسیون می‌شوند (۱۴-۶). تحقیقات نشان داده که در ۱۵ تا ۳۰ درصد موارد در بیماران AML، در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ از ژن N-RAS جهش ایجاد شده و باعث AML می‌گردد (۹، ۵). بررسی ما از ۶۰ بیمار لوسمی میلویید حاد تازه تشخیص داده شده قبل از شیمی درمانی نشان داد ۱۵٪ بیماران در کدون ۱۲، ۱۱/۶٪ در کدون ۱۳ و ۵٪ در کدون ۶۱ دارای جهش هستند. مطالعه فار و همکاران در ۶۰ بیمار AML نشان داد ۳۴٪ بیماران در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS، ۲۷٪ در کدون ۱۲ و ۳/۸٪ در هر یک از کدون‌های ۱۳ و ۶۱ دارای جهش بودند (۶). مطالعه آهوجا و همکاران نشان داد ۲۵٪ بیماران AML دارای جهش N-RAS بودند (۱۰). بارلتا و همکاران جهش‌های ژن N-RAS را در ۲۷/۹٪ بیماران AML گزارش نمود (۱۱). این مطالعات نشان دهنده فراوانی بیشتری از جهش ژن N-RAS در مقایسه با مطالعه حاضر است، اما بوون و همکاران در بررسی ۴۴۷ بیمار AML، فراوانی جهش کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ را ۱۲٪ گزارش نمودند که کمتر از مطالعه ما می‌باشد (۱۴). در تحقیق حاضر، ۳ نفر (۵٪) از بیماران مورد مطالعه دارای جهش در کدون ۶۱ بودند اما در مطالعه بارلتا و همکاران در کدون ۶۱ جهشی شناسایی نشد (۱۱). در مطالعه فار و همکاران میزان جهش در کدون ۶۱، ۳/۴٪ گزارش گردید (۶). در بررسی حاضر فراوانی بیشتری از جهش این کدون در مقایسه با مطالعات دیگران دیده می‌شود. بیشتر بیماران دارای جهش در این تحقیق بالای ۴۰ سال بودند، در حالی که بیماران فاقد جهش میانگین سنی ۲۸ سال داشتند. در مطالعه بارلتا و همکاران میانگین سنی بیماران دارای جهش ۵۶/۶ سال و در مقایسه با بیماران فاقد جهش بالاتر بود (۱۱). این مساله حاکی از وقوع جهش‌های فوق در سنین نسبتاً بالا است. در تحقیق ما، از بین بیماران دارای جهش در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS، ۵۸/۳٪ بیماران را مرد و ۴۱/۷٪ را زن تشکیل می‌دادند و مردان

هضم محصولات PCR مربوط به کدون ۶۱ با آنزیم MscI مانند کدون‌های ۱۲ و ۱۳ انجام شد. در صورت وجود جهش، آنزیم قادر به برش محصول PCR (۶۵bp) نمی‌باشد و در صورت عدم وجود جهش، برش آنزیم باعث ایجاد قطعات (۲۱ bp و ۴۴ bp) می‌گردد (شکل ۳).

## یافته‌ها

به طور کلی جهش‌های ژن N-RAS در ۲۰٪ (۱۲/۶۰) بیماران شناسایی شد. جهش‌های شناسایی شده همگی هتروزیگوت بودند و هیچ جهش هموزیگوتی مشاهده نگردید. ۷ نفر از بیماران دارای جهش، مرد و ۵ نفر زن بودند. ۸ نفر از بیماران دارای جهش بالاتر از ۴۰ سال و ۲ نفر کمتر از ۴۰ سال سن داشتند. فراوانی جهش برای کدون ۱۲، ۱۵٪، کدون ۱۳، ۱۱/۶٪ و کدون ۶۱، ۵٪ به دست آمد. ۵ بیمار هم زمان در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ دارای جهش بودند. ۲ نفر نیز به طور هم زمان در کدون‌های ۱۲ و ۶۱ دارای جهش بودند (جدول ۲). ۴۱/۶٪ جهش‌ها در بیماران از زیر گروه AML-M4 و ۱۶/۷٪ به طور مساوی در زیر گروه‌های AML-M2، AML-M3 و ۲۵٪ جهش در بیماران با زیر گروه AML-M3 شناسایی شد. در زیر گروه‌های AML-M1، AML-M6 و AML-M7 جهش شناسایی نشد.

جدول ۲: مشخصات بیماران دارای جهش در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ ژن N-RAS

| شماره بیمار | تشخیص زیر گروه FAB AML | سن (سال) | جنس | موتاسیون کدون ۱۲ | موتاسیون کدون ۱۳ | موتاسیون کدون ۶۱ |
|-------------|------------------------|----------|-----|------------------|------------------|------------------|
| ۱           | AML-M3                 | ۴۲       | مرد |                  | +                |                  |
| ۲           | AML-M3                 | ۴۲       | مرد |                  | +                |                  |
| ۳           | AML-M5                 | ۴۳       | مرد | +                |                  | +                |
| ۴           | AML-M2                 | ۴۹       | مرد |                  | +                | +                |
| ۵           | AML-M2                 | ۴۰       | مرد |                  | +                |                  |
| ۶           | AML-M4                 | ۴۰       | مرد |                  |                  | +                |
| ۷           | AML-M4                 | ۴۰       | مرد | +                |                  |                  |
| ۸           | AML-M4                 | ۳۱       | زن  |                  | +                |                  |
| ۹           | AML-M5                 | ۴۷       | زن  |                  | +                |                  |
| ۱۰          | AML-M5                 | ۴۱       | زن  |                  | +                |                  |
| ۱۱          | AML-M4                 | ۱۹       | زن  |                  | +                |                  |
| ۱۲          | AML-M4                 | ۵۶       | زن  |                  | +                |                  |

علت پایین بودن جهش‌های ژن N-RAS در زیر گروه‌های AML-M1، AML-M6، AML-M7 می‌تواند وقوع پایین این زیر گروه‌ها و تعداد کم آن‌ها در این مطالعه در مقایسه با زیر گروه‌های دیگر باشد. لذا استفاده از تعداد مساوی از این زیر گروه‌ها در تحقیقات آینده، بررسی تعداد بیشتری از بیماران، تعداد برابری از دو جنس و توزیع پراکندگی سنی بیشتری در مطالعات مشابه، می‌تواند نتایج معتبرتری را فراهم سازد.

#### نتیجه‌گیری

هر چند میزان کلی جهش به دست آمده در این مطالعه با نتیجه مطالعات دیگران هم‌خوانی دارد اما استفاده هم‌زمان از روش‌های تعیین توالی مستقیم ژن و PCR-RFLP می‌تواند در پیدا کردن تعداد بیشتری جهش در ژن N-RAS کمک کننده باشد.

#### تشکر و قدردانی

در خاتمه لازم می‌دانیم از خانم‌ها امامی، رستمی و آقای چاردرولی، کارکنان مرکز تحقیقات خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی قدردانی نماییم.

نسبت به زنان فراوانی بیشتری از جهش را دارا بودند. البته این نتیجه می‌تواند به علت وجود تعداد بیشتر بیماران مذکر در مقایسه با جنس مؤنث باشد. در مطالعه بارلتا میزان جهش در مردان ۳۴/۵٪ و زنان ۲۴/۴٪ گزارش شده که جهش را بیشتر در مردان شناسایی نموده است (۱۱). در تحقیق ما بررسی‌های دیگری به منظور یافتن ارتباط بین زیر گروه‌های FAB و جهش‌های ژن N-RAS صورت گرفت، این بررسی نشان داد بین وقوع جهش‌های ژن N-RAS از زیر گروه AML-M4 ارتباط وجود دارد. ۴ نفر (۳۳/۳٪) از بیماران دارای جهش ژن N-RAS از زیر گروه AML-M4، ۳ نفر (۲۵٪) از زیر گروه AML-M2، ۳ نفر از زیر گروه AML-M5 و ۲ نفر (۱۶/۷٪) از زیر گروه AML-M3 بودند. در زیر گروه‌های AML-M1، AML-M6 و AML-M7 جهش شناسایی نشد، در حالی که ۵۴٪ بیماران فاقد جهش از زیر گروه AML-M3 بودند. مطالعه ما با بررسی فار و همکاران که بیشتر بیماران آن‌ها (۵۶٪) دارای جهش از زیر گروه AML-M4 بودند مطابقت دارد (۶). هم چنین در تحقیقات ناکاگاو و همکاران نشان داده شد که جهش‌های N-RAS، بیشتر در زیر گروه‌های AML-M4 و AML-M5 رخ می‌دهند (۱۳).

## References:

- 1- Dahr R, Ellis RW, Shin TY, Oroszlan S, Shapro B, *et al.* Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science* 1982; 217: 934-7.
- 2- Toksoz D. RAS genes and acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology* 1989; 71: 1-6.
- 3- Yunis J, Boot JM, Mayer MG, Bos JL. Mechanisms of ras mutation in myelodysplastic syndrome. *Oncogene* 1989; 4: 609-14.
- 4- Kalakonda N, Roithwell GD, Scarffe H, Norton JD. Detection of N-RAS mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation. *Blood* 2001; 95: 1555-60.
- 5- Appelbaum F, Row J, Radich J, Dick J. Acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 62: 86.
- 6- Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Medical Sciences* 1988; 85: 1629-33.
- 7- 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* 1989; 327: 430-2.
- 8- Bos JL, Toksoz D, Marshall 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.
- 9- Hirsch - Ginsberg C, LeMaistre A, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich E, *et al.* RAS mutations are rarer events in Philadelphia chromosome negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1990; 76: 1214.
- 10- 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.
- 11- Barletta E, Gorini G, Vineis P, Miligi L, Davico L, Mugnai G, *et al.* RAS gene mutations in patients with acute myeloid leukemia and exposure to chemical agents. *Carcinogenesis* 2004; 25: 749-55.
- 12- Coghlan D, Morley A, Matthews J, Bishop J. Incidence and prognostic significance of mutations in codon 13 of N-ras gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 1682-7.
- 13- Nakagawa T, Saiton S, Imoto S, Tsutsumi M, Hikiji K, Nakamura H, *et al.* Multiple point mutation of N-ras and K-ras oncogenes in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Oncology* 1992; 49: 114-22.
- 14- Bowen DT, Frew ME, Rollinson S, Roddam PL, Dring A, Smith MT, *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: 2770-4.

## Detection of N-RAS gene mutations in codons 12, 13 and 61 in patients with acute myeloid leukemia

Mortazavi Y.<sup>1</sup>(PhD), Behzadi Fard M.<sup>2</sup>(MS), Pourfathollah A.A.<sup>2</sup>(PhD), Kaviani S.<sup>2</sup>(PhD), Feizi A.A.<sup>1</sup>(MD)

<sup>1</sup>Zanjan University of Medical Sciences

<sup>2</sup>Tarbiat Modarres University

### Abstract

#### Background and Objectives

Acute myeloid leukemia (AML) comprises a heterogenic group of malignant disorders involving cell maturation arrest at an undifferentiated stage in bone marrow. Activation of N-RAS proto-oncogene due to point mutations plays a major role in AML malignancy. Since there was no report on the frequency of N-RAS gene mutations in Iranian AML patients, therefore, we decided to determine its frequency and compare the results with age, sex and FAB subtypes.

#### Materials and Methods

In this descriptive study, 60 *de novo* AML patients from Tehran Shariati hospital, hematology-oncology and bone marrow transplantation center were screened for the mutations of N-RAS gene at codons 12, 13 and 61. DNA was extracted from peripheral blood samples before the start of chemotherapy. The above mentioned codons were amplified by PCR and analyzed by restriction endonuclease enzymes.

#### Results

We were able to detect mutations in 12 out of 60 (20%) patients. Most of the mutations were detected in men with an age over 40 years old. The frequency of mutations for codons 12, 13 and 61 were 15%, 11.6% and 5% respectively. Most of the mutations (33.3%) were found to happen in AML-M4 FAB subtype. We could not detect any mutation in AML-MO, M6 and M7.

#### Conclusions

We detected mutations in 20% of our AML patients. In general, the frequency of the mutations we found was in agreement with the results of other studies. However, a study with more patients and a wider range of age using a combination of PCR-RFLP and direct gene sequencing is highly recommended.

**Key words:** Acute myelocytic leukemia, Mutation. PCR  
*SJIBTO* 2007; 4(1): 11-17

Received: 2 Sept. 2006

Accepted: 9 Apr. 2007

Correspondence: Mortazavi Y., PhD of Hematology. Zanjan University of Medical Sciences. Shahrak-e-Karmandan. Postal code: 4513956111, Zanjan, Iran. Tel: (+98241)4240301-3; Fax: (+98241)4249553. E-mail: Ymort@yahoo.com