

تشخیص فیوژن‌های ناشی از ترانس لوکاسیون‌های کروموزومی فیلادلفیا در بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن

دکتر سید حمیداله غفاری^۱، مرجان یغمایی^۲، دکتر کامران علی مقدم^۳، دکتر اردشیر قوام‌زاده^۴، دکتر محمد جهانی^۴، دکتر سید اسداله موسوی^۵، دکتر مسعود ابروانی^۵، دکتر بابک بهار^۵، دکتر عیسی بایبوردی^۵

چکیده

سابقه و هدف

ناهنجاری‌های کروموزومی مشخصی به نام کروموزوم فیلادلفیا که در بیش از ۹۰٪ بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) دیده می‌شود، ناشی از ترانس‌لوکاسیون دو طرفه بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد و باعث ایجاد فیوژن‌های BCR-ABL می‌گردد. مهم‌ترین و فراوان‌ترین فیوژن‌های BCR-ABL، b2a2 و b3a2 و e1a2 می‌باشند. فیوژن‌های دیگری که با فراوانی کمتر دیده می‌شوند شامل b3a3، b2a3 و e19a2 هستند. این مطالعه به منظور راه‌اندازی روش مولتیپلکس RT-PCR و تعیین فراوانی فیوژن‌های مختلف در بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. نمونه خون محیطی از ۷۵ بیمار CML جمع‌آوری و روش مولتیپلکس RT-PCR برای تشخیص انواع فیوژن‌های BCR/ABL حاصل از ترانس لوکاسیون ۹ و ۲۲ راه‌اندازی شد.

یافته‌ها

بیماران برای انواع مختلفی از این فیوژن‌ها مثبت بودند. در بیشتر بیماران فیوژن‌های b3a2 (۶۲٪) و b2a2 (۲۰٪) وجود داشت در حالی که در سایر بیماران فیوژن‌های b3a3، b2a3 و e1a2 و یا بیان هم زمان b3a2 و b2a2 دیده شد. میزان بیان هم زمان b3a2 و b2a2 در ۵٪ بیماران دیده شد.

نتیجه‌گیری

با روش مولتیپلکس می‌توان علاوه بر فیوژن‌های معمول b3a2 و b2a2، انواع فیوژن‌های نادر دیگر را در بیماران CML تشخیص داد. در بیماران CML ایرانی نسخه‌های b3a2 حدوداً ۳ برابر بیشتر از b2a2 می‌باشد که در مقایسه با نسبت گزارش شده توسط محققین دیگر بیشتر است. احتمالاً نوع فیوژن می‌تواند دارای اهمیت بالینی بوده و به ما در شناخت پاتوژنز سلول‌های لوکمیک دارای (22 : 9) t کمک کند.

کلمات کلیدی: لوسمی میلوئیدی مزمن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس چندگانه، کروموزوم فیلادلفیا

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۱۰

۱- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی - کارگر شمالی - کدپستی ۱۱۴۱۱

۲- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی

۳- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی

۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی

۵- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی

مقدمه

مشخصه اصلی بیماری لوسمی میلوئیدی مزمن، وجود ترانس لوکاسیون بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد. در این جا به جایی، ۳۰ قطعه از پروتوانکوژن c-abl بر روی کروموزوم ۹ در کنار ۵۰ قطعه از ژن bcr از کروموزوم ۲۲ قرار می‌گیرد (۱-۴). شکست‌ها در ژن c-abl معمولاً در اولین اینترون ایجاد می‌شود. شکست‌ها در ژن bcr معمولاً در یکی از ۳ ناحیه زیر اتفاق می‌افتد:

- ناحیه خوشه‌ای شکست اصلی (M-bcr)

- ناحیه خوشه‌ای شکست کوچک (m-bcr)

- ناحیه خوشه‌ای شکست میکرو (μ-bcr) (۵).

شکست‌هایی که در ناحیه M-bcr اتفاق می‌افتد شامل اینترون‌های ۱۳ یا ۱۴ می‌باشد که از ژن b2 (۱۳) هم نامیده می‌شود) به از ژن abl (a2) متصل شده به ترتیب فیلوژن‌های b2a2 و b3a2 را ایجاد می‌کند. این فیلوژن یک نسخه ۸/۵ Kb تولید می‌کند که پروتئین کایمر ۲۱۰ KD را ایجاد می‌نماید (۶، ۷). بیان هم زمان فیلوژن‌های b3a2 و b2a2 هم در نتیجه پردازش چند گانه می‌باشد (۸، ۹).

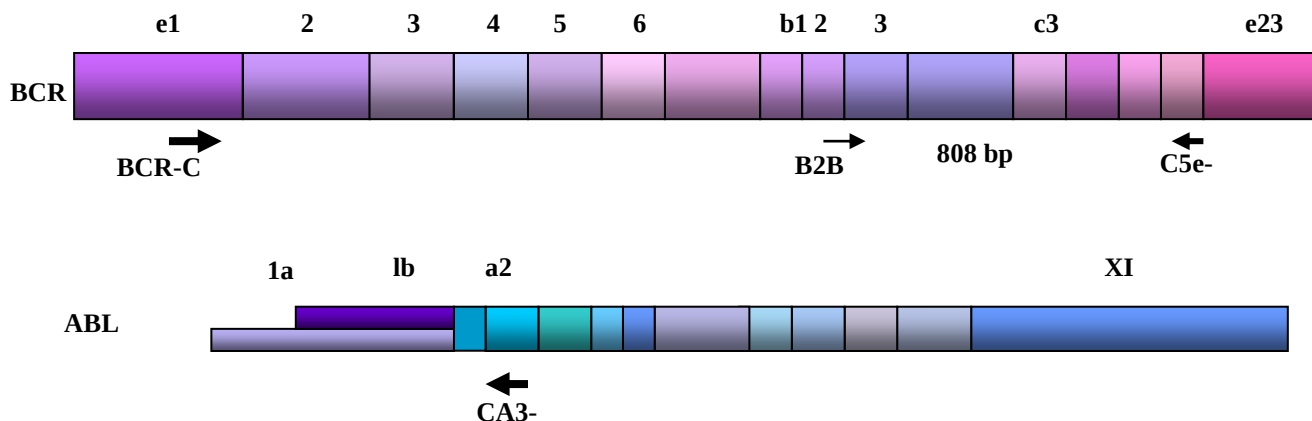
شکست در ناحیه m-bcr در اولین اینترون bcr است. از ژن ۱ (e1) به a2 متصل و فیلوژن کوچکتری به نام e1a2 را ایجاد می‌کند که پروتئین ۱۹۰ KD را کد می‌کند (۱۰). شکست‌ها در m-bcr در اینترون ۱۹ است که باعث اتصال از ژن ۱۹ (e19) از ژن bcr به a2 می‌شود (e19a2) و پروتئین ۲۳۰ KD را کد می‌کند (۱۱). اگر چه تمام فیلوژن پروتئین‌های bcr-abl دارای فعالیت تایروازین کینازی فعال می‌باشند ولی فرم P190 دارای پتانسیل ترانسفورم کنندگی بیشتری از فرم P210 در شرایط *in vitro* و *in vivo* است (۱۲-۱۴). بیشتر بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن فیلوژن‌های b3a2 و b2a2 دارند. فیلوژن e1a2 عمدتاً در بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد که دارای (۲۲ : ۹) هستند و بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن که در فاز بلاستیک هستند دیده می‌شود ولی به ندرت در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن در فاز مزمن نیز دیده می‌شود. فیلوژن نادر e19a2 بیشتر در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن که دارای بلوغ نوتروفیلی بالایی می‌باشند وجود دارد (۱۵). این نئوپلاسم‌های غیر معمول به وسیله بعضی محققین به

نام لوسمی نوتروفیلیک مزمن نامیده شده‌اند (۱۶). این مطالعه به منظور راه‌اندازی روش مولتیپلکس RT-PCR و تعیین فراوانی فیلوژن‌های مختلف در بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن در مرکز هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. مجموعاً ۷۵ بیمار لوسمی میلوئیدی که از اردیبهشت ماه ۱۳۸۲ تا آبان ماه ۱۳۸۳ تحت درمان بوده و یا برای تشخیص بیماری مراجعه کرده بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص بیماری بر اساس یافته‌های بالینی و داده‌های مورفولوژیک بر روی نمونه‌های مغز استخوان و هم چنین تایید بیماری با روش سیتوژنتیک برای (۲۲: ۹) t و روش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس برای نسخه‌های BCR-ABL بود. سن متوسط بیماران ۴۰ سال بود (از ۵۵-۹ سال)، ۴۵٪ بیماران زن و ۵۵٪ مرد بودند. ۷ بیمار در فاز شتاب دهنده (Accelerated)، ۱۲ بیمار در فاز حاد و بقیه بیماران در فاز مزمن بودند. کلیه بیماران مورد مطالعه در بررسی سیتوژنتیکی دارای کروموزوم فیلادلفیا بودند.

سلول‌های تک هسته‌ای از ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی یا ۳-۱ میلی‌لیتر از مغز استخوان با روش سانتریفوژ بر روی گرادینت فایکول جدا شدند. RNA تام از حدود ۱۰^۶ سلول تک هسته‌ای به وسیله تریزول جدا شد (جیکو). قبل از واکنش نسخه‌برداری معکوس، کیفیت RNA با روش الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA، ابتدا غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری تعیین و سپس سنتز cDNA با کیت فرمتاز انجام گرفت. ۱ میکروگرم RNA با ۱۰ واحد در میلی‌لیتر MMLVRT (Moloney Murine leukemia virus Reverse Transcriptase)، ۱ x RT buffer، ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر آغازگر random hexamer، ۲۵ میکرومول dNTP، ۰/۰۱ مول DTT و ۲ واحد در میکرولیتر RNasin مورد نسخه‌برداری معکوس قرار گرفت. محصول cDNA با ۱ واحد در میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز، ۲۴۰ میکرومول از dNTP ۱/۸ مول از MgCl₂ و ۰/۶ میکرومول از



شکل ۱: تصویر شماتیک از موقعیت آغازگرهای ویژه آگزون‌های BCR و ABL به کار رفته در روش مولتیپلکس RT-PCR برای تشخیص بیشتر فیوژن‌ها در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن

یافته‌ها

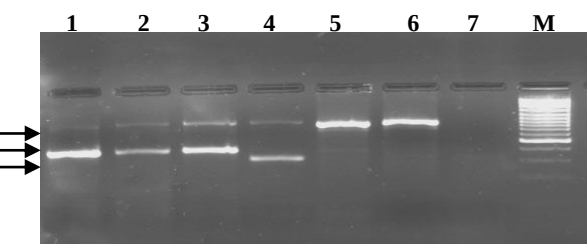
مجموعه آغازگرهایی که در روش مولتیپلکس RT-PCR استفاده می‌شوند امکان تشخیص هم زمان تمام انواع نسخه‌های BCR-ABL را در یک واکنش امکان‌پذیر می‌کنند. باندهای مورد نظر عبارت بودند از ۸۰۸ bp برای BCR نرمال، ۴۸۱ bp برای فیوژن e1a2، ۳۸۵ bp برای فیوژن b3a2، ۳۱۰ bp برای b2a2، ۲۰۹ bp برای b3a3، ۱۰۳ bp برای b2a3 (۱۷، ۱۸).

کیفیت RNA و بازده سنتز cDNA با تکثیر هم زمان ژن BCR به عنوان کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت. باند

آغازگرهای CA3، C5e، BCR-C و B2B تکثیر شد. روش مولتیپلکس RT-PCR با دستگاه PCR Hybaid با برنامه ۱۰ ثانیه در ۱۰۰°C، ۱ دقیقه در ۹۶°C، ۳ دقیقه در ۶۰°C، ۲ دقیقه در ۷۲°C، ۱۰ ثانیه در ۱۰۰°C، ۲۰ ثانیه در ۹۷°C، ۲۵ ثانیه در ۵۸°C، ۲۵ ثانیه در ۶۰°C، ۱۰ ثانیه در ۷۸°C، ۵۰ ثانیه در ۷۳°C و سپس تکرار ۳۱ بار از مرحله ۵ و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۳°C تکثیر شد. سکانس آغازگرهای الیگونوکلوئیدی که در این PCR برای فیوژن‌های BCR-ABL به عنوان ژن هدف و نسخه‌های BCR به عنوان کنترل داخلی به کار می‌روند در جدول ۱ نشان داده شده است. در فرآیند PCR، سنتز cDNA از سلول‌های K562 (b3a2) و از بیماران دارای فیوژن b2a2 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل و دیونیزه به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نسخه BCR طبیعی به عنوان داخلی استفاده شد. برای آنالیز محصولات PCR از ژل آگارز ۲٪ که با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده استفاده گردید.

جدول ۱: سکانس الیگونوکلوئیدی آغازگرهای روش مولتیپلکس RT-PCR برای فیوژن‌های BCR-ABL و ژن BCR به عنوان کنترل داخلی

C5e-	5' ATAGGATCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3'
B2B	5' ACAGAATTCCGCTGACCATCAATAAG 3'
BCR-C	5' ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG 3'
CA3-	5' TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'



شکل ۲: نتایج ژل مولتیپلکس RT-PCR: ستون ۱، K562 به عنوان رده سلولی کنترل مثبت برای فیوژن b3a2، ستون ۲ و ۳ از بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن که فیوژن b3a2 را بیان می‌کنند، ستون ۴ از بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن که فیوژن b2a2 را بیان می‌کنند، ستون ۵ از بیمار لوسمی میلوئیدی مزمن در فاز رمیسون که نتیجه آن بعد از پیوند مغز استخوان منفی بوده است، ستون ۶ فرد نرمال و ستون ۷ آب به عنوان کنترل منفی می‌باشد. در ستون ۷-۱ باند ۸۰۸bp که محصول ژن نرمال BCR است به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و نشان دهنده کیفیت RNA می‌باشد.

جدول ۲: اطلاعات بالینی بیماران دارای فیوژن‌های مختلف BCR-ABL

Rearrangement BCR/ABL	Case(%)	سن متوسط	جنسیت (زن/مرد)	WBC($10^9/l$)	PLTS($10^9/l$)
B2a2	(۲۰)۱۵	۳۲	۶/۹	(۱۷-۸۰)۲۰۰	(۱۸-۹۰)۴۱۳
B3a2	(۶۲/۶)۴۷	۳۸	۳۰/۱۷	(۲۱-۷۷)۲۱۵	(۱۰۰-۱۲۰)۴۸۱
B3a2/b2a2	(۲/۶)۲	۲۵	۲/۰	(۱۱۰-۲۰۷)۱۴۸	(۳۶۴-۵۷۰)۴۶۷
Ela2	(۱/۴)۱	۲۸	۱/۰	۴۰۰	۷۰۰
B3a3/b2a3	(۹/۴)۷	۴۲	۴/۳	(۳۴۰-۴۶۲)۳۹۹	(۳۵۰-۱۵۰۰)۶۹۰
el9a2	(۴)۳	۴۹	۲/۱	(۲۴۰-۴۰۰)۳۲۰	(۸۴۰-۱۰۹۰)۸۶۵

۸۰۸ bp مربوط به ژن BCR تنها باند قابل تشخیص در بیمارانی بود که BCR-ABL آن‌ها منفی بود و اگر این باند دیده نمی‌شد، نشان‌دهنده عدم موفقیت در روش کار بود. نتایج مولتیپلکس RT-PCR برای تعدادی از بیماران در شکل ۲ نشان داده شده است. با این روش توانستیم علاوه بر فیوژن‌های معمول b3a2 و b2a2، انواع فیوژن‌های نادر دیگری هم که فاقد آگزون 2a ژن ABL (مانند b2a3 و b3a3) و یا ela2 هستند را در ۷۵ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن مورد بررسی قرار دهیم.

e1 e14 a2	a11	P210	b3a2 (62.6%)
e1 a2	a11	P19	e1a2 (1.4%)
e1 e13 a2	a11	P210	b2a2 (20%)
e1 e13/e14 a3	a11	P203	b3a3/b2a3 (9.4%)
e1 e13/e14 a2	a11	P210	b3a3/b2a2 (2.6%)
e1 e19 a2	a11	P230	el9a2 (4%)

شکل ۳: دیاگرام چندین فیوژن BCR-ABL همراه با درصد شیوع آن‌ها در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن ایرانی

در شکل ۳ دیاگرام چندین فیوژن BCR-ABL با فراوانی‌های آن‌ها نشان داده شده است. با روش مولتیپلکس RT-PCR بیشتر بیماران (۸۲/۶٪) یکی از دو فیوژن b3a2 یا b2a2 را بیان کردند. در جدول ۲ اطلاعات بالینی برای بیماران بر اساس نوع فیوژن BCR/ABL در آن‌ها نشان داده شده است. فراوانی فیوژن‌های مختلف با روش RT-PCR عبارت بودند از: b3a2 ۶۲/۶٪، b2a2 ۲۰٪، ela2 ۱/۴٪ و

انواع فیوژن‌های نادر ۱۶٪. سن متوسط بیماران ۳۷/۵ سال بود در حالی که برای بیمارانی که هر دو فیوژن b3a2 و b2a2 را بیان می‌کردند، سن متوسط ۲۵ سال بود. معمولاً یک و گاهی دو نوع mRNA ممکن است در یک بیمار دیده شود. برای مثال یکی از بیماران ما هر دو فیوژن b3a2 یا b2a2 را داشت و بیمار دیگر هم زمان ۳ فیوژن b3a2 یا b2a2 و هم چنین b3a3 (P203) را نشان داد. این بیماران CML در فاز کرونیک بوده ولی علاوه بر (۲۲: ۹) سایر ناهنجاری‌های سیتوژنتیکی همراه با علائم بالینی با ریسک بالا را داشتند. در ۹/۴٪ از بیماران آگزون a2 بیان نشده و به جای آن آگزون a3 جایگزین شده و منجر به بیان b2a3 و b3a3 شده است. حساسیت روش با استفاده از غلظت‌های سلولی تهیه شده از رده سلولی K ۵۶۲ از ۱ تا ۱۰^۵ سلول به دست آمد و مشاهده گردید با استفاده از این روش PCR، حدود ۱ سلول در زمینه ۱۰^۴ سلول تشخیص داده می‌شود. ویژگی روش با آزمایش بر روی ۱۰ آغازگر بیمار غیر CML تعیین شد. در این حالت با این مجموعه آغازگرها سیگنالی دیده نشد. تمامیت RNA در نمونه‌های بیماران با تکثیر هم زمان ژن BCR مورد تایید قرار گرفتند.

بحث

با راه‌اندازی روش مولتیپلکس RT-PCR در مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی، این امکان فراهم آمد که بتوانیم انواع مختلف ژن‌های ترکیبی BCR-ABL را به طور ویژه بر روی نمونه cDNA بیماران CML تشخیص دهیم. یکی از

در پیگیری بیماران و تشخیص سلول‌های لوکمیک باقیمانده، از روش Nested RT-PCR استفاده شد.

حساسیت ترکیب آغازگرهایی که در روش مولتیپلکس RT-PCR به کار می‌رود معادل 10^{-3} تا 10^{-4} را نشان می‌دهد، ولی از مزایای بسیار مهم این روش این است که می‌تواند همه انواع فیوژن‌های قابل تشخیص در این بیماران را در یک واکنش PCR مشخص کند. علاوه بر فیوژن‌های معمول در بیماران CML مانند b3a2 یا b2a2، انواع فیوژن‌های غیر معمول و نادر دیگری مانند b2a3 و b3a3 که فاقد اگزون ۲ در ژن ABL می‌باشند و حتی نسخه‌هایی که شکست در ژن BCR خارج از ناحیه M-bcr مثل el2 یا e6a2 دارند، با این روش قابل تشخیص هستند.

مطالعه بازآرایی‌های BCR/ABL در ۷۵ بیمار CML ایرانی دارای کروموزوم فیلادلفیا نشان داد که فراوانی نسخه‌های b2a2 و b3a2 به ترتیب ۲۰/۴٪ و ۶۲٪ می‌باشند. در مطالعه‌ای که توسط ریترو و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد، شیوع نسخه‌های b2a2 و b3a2 در بیماران CML فیلادلفیا مثبت به ترتیب ۳۱/۶٪ و ۶۸/۴٪ گزارش شد (۱۹). مشابه همین مطالعه توسط لی و همکاران در سال ۱۹۹۶ انجام شد و فراوانی b2a2 و b3a2 به ترتیب ۳۰/۲٪ و ۶۷/۹٪ گزارش گردید (۲۰). بنابراین در بیماران CML ایرانی نسخه‌های b3a2 حدوداً ۳ برابر بیشتر از b2a2 می‌باشد، که در مقایسه با نسبت گزارش شده محققین ذکر شده بیشتر است. اگر چه مطالعات اندکی راجع به با اهمیت دانستن فیوژن‌های BCR/ABL وجود دارد، اما گزارش‌های مهمی هم نشان می‌دهند که نوع فیوژن می‌تواند دارای اهمیت بالینی بوده و به ما در فهم پاتوژنز سلول‌های لوکمیک داری (۲۲: ۹) کمک کند. مثلاً پرگو و همکاران نشان دادند که بیماران CML دارای فیوژن b3a2، میزان پلاکت بالاتری از بیماران CML دارای فیوژن b2a2 دارند (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط پریزنر بر روی بیماران CML در فاز مزمن انجام شد دیده شد که بیماران دارای فیوژن b3a2 دارای بقای بیشتری از بیماران دارای فیوژن b2a2 بودند (۲۲). اما در مطالعه‌ای که انجام شد، ارتباط مهمی بین نوع فیوژن و یافته‌های بالینی حاصل نگردید. به علاوه هیچ تفاوتی هم در پیش‌آگهی بیماران

مشکلاتی که در استفاده از DNA ژنومیک برای تشخیص بیماران CML وجود داشت این بود که نواحی شکست بر روی DNA در فواصل دوری از هم قرار گرفته‌اند. لذا امکان تکثیر مستقیم ژن ترکیبی BCR-ABL به وسیله یک PCR امکان‌پذیر نبود. اما اگزون‌هایی که از کنار هم قرار گرفتن ژن‌های BCR و ABL به وجود می‌آیند و ممکن است در سطح DNA از هم فاصله زیادی داشته باشند، با حذف اینترون‌های اضافه طی فرآیند RNA Splicing در سطح RNA در کنار هم قرار می‌گیرند و با به کار بردن cDNA به عنوان الگو، با عمل نسخه‌برداری معکوس از روی RNA و انجام یک PCR قابل تشخیص بودند. با استفاده از این روش RT-PCR، به طور هم زمان با استفاده از آغازگرهای طراحی شده تمام انواع فیوژن‌های موجود در این بیماران از جمله فیوژن‌های معمول مانند b2a2 یا b3a2، انواع فیوژن‌های نادر دیگر مانند b2a3، b3a3، el2، e6a2 و ... هم چنین ژن bcr به عنوان کنترل داخلی برای اطمینان از صحت سنتز RNA و cDNA تشخیص داده شد. در بیشتر موارد معمولاً از ژن β -actin به عنوان کنترل استفاده می‌شود، اما علت استفاده از ژن bcr در مطالعه حاضر این بود که اولاً β -actin در سلول‌ها دارای بیان بالایی است و از طرفی میزان ژن‌های کاذب آن زیاد است، البته مشکلی که در استفاده از ژن bcr به عنوان کنترل داخلی وجود داشت این بود که به علت وجود اثر رقابتی آن با ژن BCR-ABL، اکثراً باند مربوط به آن به صورت ضعیف مشاهده می‌شود. با توجه به این که این روش واکنش یک مرحله‌ای PCR بود لذا حساسیت این روش برای تشخیص MRD در این بیماران نسبتاً پایین بود، لذا با استفاده از این روش تنها می‌توان به شناسایی و تشخیص فیوژن‌های بیمارانی پرداخت که یا در وضعیت تشخیص اولیه بوده (قبل از پیوند)، یا بعد از درمان بودند، یا در افرادی که بعد از پیوند مغز استخوان بیماری در آن‌ها به شدت عود کرده بود و یا این که دارای سیتوژنتیک مشکوک بودند. لذا محدودیت اصلی این روش حساسیت نسبتاً پایین آن است. با توجه به این که برای بررسی حداقل بیماری باقیمانده جزیی در بیماران بعد از پیوند نیاز به روشی با حساسیت بسیار بالا می‌باشد، برای این منظور

دارای فیوژن b3a2 و b2a2 وجود نداشت.

در این مطالعه، تعداد کمی از بیماران (حدود ۵٪) بیش از یک نوع mRNA بیان می‌کردند. مثلاً یکی از بیماران بیان هم زمان b3a2 و b2a2 و بیمار دیگر بیان هم زمان b3a2، b2a2 و b3a3 را نشان داد. در نتایج تحقیق مشابهی که توسط گه و همکاران بر روی ۵۴۸ بیمار CML در کره با همین روش صورت گرفت، بیان هم زمان این فیوژن‌ها با فراوانی ۲٪ را نشان داد (۲۳). بیان هم زمان بیش از یک نوع فیوژن در این بیماران می‌تواند به علت پردازش‌های متمایز (Alternative Splicing) و یا برای فیوژن‌های نادر وجود چندین رده سلول لوکمیک با بیان‌های متفاوتی از

BCR/ABL باشد.

نتیجه گیری

راه اندازی این روش مولتیپلکس می تواند علاوه بر فیوژن های معمول b3a2 ، b2a2 انواع فیوژن های نادر دیگر را در بیماران CML تشخیص دهد. در بیماران CML ایرانی نسخه های b3a2 حدوداً ۳ برابر بیشتر از b2a2 می باشد که در مقایسه با نسبت گزارش شده محققین دیگر

بیشتر می باشد. احتمالاً نوع فیوژن می تواند دارای اهمیت بالینی بوده و به ما در فهم پاتوژنز سلول های لوکمیک دارای (۹:۲۲) t کمک کند.

References :

- 1- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
- 2- de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, *et al.* A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1982;300:765-7.
- 3- Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64(24 Suppl 15):S4-9.
- 4- Kantarjian HM, Deisseroth A, Kuzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood* 1993;82:691-703.
- 5- Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88:2375-84.
- 6- Maru Y. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2001;73(3):308-22.
- 7- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of the bcr abl hybrid gene. *Science* 1986;233:212-4.
- 8- Burmeister T, Schwartz S, Taubald A, Jost E, Lipp T, Schneller F, *et al.* Atypical BCR-ABL mRNA transcripts in adult Acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2007; 92:1699-702.
- 9- Lichty BD, Keating A, Callum J, Yee K, Croxford R, Corpus G, *et al.* Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1998;103(3):711-5.
- 10- Ko BS, Tang JL, Lee FY, Liu MC, Tsai W, Chen YC, *et al.* Additional chromosomal abnormalities and variability of BCR breakpoints in Philadelphia chromosome/BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Am J Hematol* 2002;71(4):291-9.
- 11- Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, *et al.* New type of BCR/ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990;76: 1819-1824.
- 12- Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* 1999;189(9):1399-412.
- 13- Ling X, Ma G, Sun T, Liu J, Arlinghaus RB. Bcr and Abl interaction: oncogenic activation of c-Abl by sequestering Bcr. *Cancer Res* 2003;63(2):298-303.
- 14- Hemmeryckx B, Reichert A, Watanabe M. BCR/ABL P190 transgenic mice develop leukemia in the absence of Crkl. *Oncogene* 2002;21(20):3225-31.
- 15- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, *editors.* Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization: Lyon, France;2001:20-6.
- 16- Verstovsek S, Lin H, Kantarjian H, Saglio G. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable BCR/ABL protein may predict an indolent course. *Cancer* 2002 1;94(9):2416-25.
- 17- Otazú IB, Tavares Rde C, Hassan R. Estimations of BCR-ABL/ABL transcripts by quantitative PCR in chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation and donor lymphocyte infusion. *Leuk Res* 2002;26(2):129-41.
- 18- Burmeister T, Maurer J, Aivado M, Elmaagacli AH, Grünebach F, Held KR, *et al.* Quality assurance in RT-PCR-based BCR/ABL diagnostic-results of an interlaboratory test and a standardization approach. *Leukemia* 2000;14(10):1850-6.
- 19- Hashmi K, Khan B, Ahmed P, Hussain I. Allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia- 2 1/2 year experience. *J Pak Med Assoc* 2005;55(11):478-82.
- 20- Verschraegen CF, Kantarjian HM, Hirsch-Ginsberg C, Lee MS, O'Brien S, Rios MB, *et al.* The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia; clinical laboratory, and prognostic correlations. *Cancer* 1995; 76(6):992-7.
- 21- Perego RA, Costantini M, Cornacchini G, Gargantini L, Bianchi C, Pungolino E, *et al.* The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Eur J Cancer* 2000;36:1395-401.
- 22- Prejzner W. Relationship of the BCR gene breakpoint and the type of BCR/ABL transcript to clinical course, prognostic indexes and survival in patients with chronic myeloid leukemia. *Med Sci Monit* 2002;8: BR191-BR197.
- 23- Goh HG, Hwang JY, Kim SH, Lee YH, Kim YL, Kim DW. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl Res* 2006;148(5):249-56.

BCR-ABL fusion transcript detection in Iranian patients with chronic myeloid leukemia

Ghaffari S.H.¹(PhD), Yaghmaie M.¹(MS), Alimoghaddam K.¹(MD), Ghavamzadeh A.¹(MD), Jahani M.¹(MD), Mousavi S.A.¹(MD), Irvani M.¹(MD), Bahar B.¹(MD), Baibordi E.¹(MD)

¹Hematology, Oncology and BMT Research Center of Shariati Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

A specific chromosomal abnormality, the Philadelphia chromosome (Ph), is present in more than 90% of CML patients. The aberration results from a reciprocal translocation between chromosome 9 and 22, creating a BCR-ABL fusion gene. Major forms of BCR-ABL fusion are b3a2, b2a2, and e1a2. Less common fusion genes are b3a3 or b2a3 (p203) and e19a2 (p230). The aim of this study was to set up a multiplex RT-PCR assay and determine the frequency of different fusion genes in 75 Iranian patients with CML.

Materials and Methods

In this experimental study, peripheral blood samples from 75 adult Iranian CML patients were analyzed by multiplex RT-PCR to detect different types of BCR-ABL transcripts of the t(9;22).

Results

All of the examined cases were positive for some type of BCR/ABL rearrangement. The majority of patients (82.6%) expressed one of the P210 BCR-ABL transcripts (b3a2, 62% and b2a2, 20%), while the remaining showed either one of the transcripts of b3a3, b2a3, e1a2 or coexpression of b3a2 and b2a2. The rate of coexpression of the b3a2 and b2a2 was 5%.

Conclusions

It is possible to detect rare fusions other than common ones through multiplex method. In Iranian CML patients, b3a2 was three times more frequent than b2a2 shown to be higher as compared with other studies. Probably, the kind of fusion is of clinical importance and helps us in understanding t(9;22) leukemic cells pathogenesis.

Key words: Chronic myeloid leukemia, RT-PCR, Philadelphia chromosome
SJIBTO 2008; 5(2): 109-116

Received: 13 Aug 2007

Accepted: 29 Apr 2008

Correspondence: Ghaffari S.H., PhD of Genetics, Assistant professor of Hematolog, Oncology and BMT Research Center of Shariati Hospital. North Kargar St., Tehran, Iran.
Postal code:14114. Tel: (+9821)884902638; Fax : (+9821)88004140
E-mail: shghaffari2000@yahoo.com