دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۲۶۲ – ۲۵۴ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(3): 254-262

بررسی حضور رونوشت‌های ژن جوششی MLL-AF4 در بیماران لوسمی لنفوئیدی حاد مراجعه‌کننده به بیمارستان کودکان تبریز

امیر منفردان [۱]، سید محمود طباطبائی [۲*]، ناهیده کریمیان فتحی [۱]، عظیم رضامند [۳]

[۱] مرکز تحقیقات انکولوژی، بیمارستان بین‌المللی تبریز، ایران
[۲] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران
[۳] گروه هماتولوژی و انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۰/۸/۱۵- پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۲۲)

چکیده

زمینه: لوسمی‌های MLL-AF۴ مثبت در حدود ۷۰-۵۰ درصد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی کودکان و حدود ۵ درصد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی نوجوانان و بالغین را شامل می‌گردد. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در درمان بدخیمی‌های خونی کودکان به‌ویژه لوسمی لنفوسیتی حاد، به‌نظر می‌رسد نتایج ضعیفی از درمان این نوع بدخیمی حاصل می‌شود، شاید دلیل این نکته عدم شناخت کافی و مناسب از الگوی ژنتیکی پروتئین‌های نوترکیب ناشی از جابجائی‌های کروموزومی باشد. در این مطالعه سعی شده است از دیدگاهی خاص به بررسی اختلال شایع کروموزومی t(۴،۱۱) پرداخته شود: به‌علت نبود آمار دقیق این نوع جابجائی‌ها در کشور، آمار قابل قبول ارائه شود؛ درصد شیوع انواع ایزوفرم‌های درگیر در ژن نوترکیب MLL-AF۴ بیان گردد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مورد- شاهدی، از ۳۶ بیمار مبتلا به ALL در فاصله سنی ۴ ماه الی ۱۱ سال، نمونه‌گیری از خون پیرامونی به‌عمل آمد و RNA توتال استخراج و cDNA از آن تهیه گردید. آنگاه cDNA جهت تکثیر در دو مرحله وارد واکنش PCR و Nested PCR شد. پس از انجام الکتروفورز محصولات حاصل در کنار کنترل داخلی مقایسه و آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن نوترکیبMLL-AF۴ در محدوده‌ی سنی ۴ الی ۱۲ ماه بیشترین مقدار را در مرحله دوم و توسط (Nested PCR) داراست. همچنین بیشترین فراوانی ایزوفرم درگیر در ژن‌های نوترکیب در همان محدوده سنی، ایزوفرم e۴-e۱۱ با ۰/۱۳ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد بررسی اختلالات و جابجائی‌های کروموزومی با استفاده از روش‌های مولکولی مناسب‌ترین و دقیق‌ترین روش برای مشخص کردن ویژگی‌های کروموزومی بیماران مبتلا به لوسمی حاد به‌ویژه لوسمی حاد لنفوئیدی باشد.

واژگان کلیدی: لوسمی‌های حاد لنفوئیدی کودکان، ژن جوششی MLL-AF۴ ، Nested PCR

* تبریز، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

Email : smt@iaut.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

مقدمه

یکی از زیر گروه‌های رده‌ی B لوسمی لنفوئیدی حاد با پیش‌آگهی ضعیف، با جابجائی کروموزومی ژن mixed lineage leukemia(MLL) روی کروموزوم ۱۱q۲۳ مشخص می‌شود. این نوع جابجائی در ۳ تا ۶ درصد تمام لوسمی‌های لنفوئیدی حاد بالغین با ایمنوفنوتایپ CyIgM، CD10، +CD19 وجود داشته و معمولاً با بیان مارکرهای میلوئیدی به‌طور همزمان نیز همراه است (۳-۱) بررسی‌های اخیر نشان داده است که جابجائی ۱۱q۲۳ در بیشتر از ۸ درصد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی رده T نیز دیده می‌شود که در این موارد نیز با پیش‌آگهی بسیار ضعیفی همراه است (۴ و۵).

در مطالعات دیگر مشخص شده است که زیر گروه دیگری با جابجائی ژن MLL وجود دارد که با ایمنوفنوتایپ +CyIgM، -CD۱۰ و+CD۱۹ مشخص می‌شود (۶).

بررسی‌های مولکولی نشان داده است که (q۲۱;q۲۳) t(۴;۱۱) با درگیری ژن‌های (Htrx ،HRX)MLL و ۴ AF۴(FEL) همراه است (۷ و۸).

مطالعات دیگر نیز به اطلاعات تقریباً مشابهی دست یافته‌اند به‌گونه‌ای که مشخص شده است که لوسمی‌های MLL-AF۴ مثبت در حدود ۷۰-۵۰ درصد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی کودکان و حدود ۵ درصد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی نوجوانان و بالغین دیده می‌شود (۱۱-۹). حضور t(۴;۱۱)(q۲۱;q۲۳) اغلب با فنوتیپ Pro-B-ALL (-CD۲۴، -CD۱۰، +CD۱۹، +CyCD ۷۹a) همراه است (۱۵-۱۱).

t(۴;۱۱)(q۲۱;q۲۳) از اتصال ناحیه ´۵ MLL و ´۳ ژن AF۴ حاصل می‌شود (۱۱، ۲۱ و ۲۴).

جابجائی‌های کروموزومی که در لوسمی‌های لنفوئیدی کودکان و بزرگسالان دیده می‌شود، می‌تواند باعث تولید پروتئین‌های نوترکیب با خاصیت لوسمی‌زایی شود (۱ و ۲). زیرگروهی از این نوع جابجائی‌ها t(۹;۲۲)(q۳۴;q۱۱) است که با ریسک بالا در لوسمی لنفوئیدی حاد رده B همراه است و عملکرد خود را با تولید ژن نوترکیب و متعاقب آن پروتئین نوترکیب BCR-ABL به انجام می‌رساند (۳ و ۴).

مکانیسمی مشابه با این پروسه برای (q۲۱;q۲۳) t(۴;۱۱) نیز متصور است. این نوع جابجائی مشخص‌ترین جابجائی در لوسمی‌های لنفوئیدی حاد است و باعث تولید ژن نوترکیب MLL بر روی کروموزوم ۱۱ و AF۴ بر روی کروموزوم ۹ می‌شود (۲۱-۱۶).

حضور t(۴;۱۱) با شرایط بالینی نامناسبی نظیر، شمارش سلول‌های سفید خونی بالا (۲۲ و ۲۳) و پاسخ به درمان ضعیف (۲۷-۲۳) همراه است. ژن MLL پروتئینی را کد می‌کند که دارای همولوژی با ژن Drosophila trithorax است (۲۸و۲۹). این ژن حاوی چندین ناحیه و دومین (Domain) مختلف است: از جمله قلاب A-T و دومین مهارکننده‌ی رونویسی در ناحیه ´۵ ناحیه شکست MLL-AF۴، دومین دارای همولوژی با Zinc finger داخل ناحیه‌ی شکست و دومین فعال کننده رونویسی قرار گرفته در ´۳ ناحیه شکست MLL-AF۴ (۳۰ و ۳۱).

ژن AF۴ پروتئینی با نواحی غنی از سرین و پرولین کد می‌کند که این توالی‌های آمینواسیدی در نزدیکی محل شکست AF۴ قرار داشته و به‌عنوان ناحیه سیگنال رسانی هستند که در محل ´۳ ناحیه شکست قرار می‌گیرند. بنابراین جابجائی مابین MLL و AF۴

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

این فعالیت‌ها را مختل نموده و بیان این ژن‌ها و یا فعالیت رونویسی پروتئین‌های نوترکیب حاصل شده را با تغییر مواجه می‌کند.

علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در درمان بدخیمی‌های خونی کودکان به‌ویژه لوسمی لنفوسیتی حاد، به‌نظر می‌رسد نتایج ضعیفی از درمان این نوع بدخیمی حاصل می‌شود (۳۲ و۳۳). شاید دلیل این نکته عدم شناخت کافی و مناسب از الگوی ژنتیکی این پروتئین‌های نوترکیب باشد(۲۳).

در این مطالعه سعی شده است از دیدگاهی خاص به بررسی اختلال شایع کروموزومی t(۴;۱۱) پرداخته شود: اول اینکه به‌علت عدم وجود آمار دقیق این نوع جابجائی‌ها در کشور، آمار قابل قبول ارائه شود؛ دوم درصد شیوع انواع ایزوفرم‌های درگیر در ژن نوترکیب MLL-AF۴ بیان گردد.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA

از ۳۶ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان کودکان تبریز با تشخیص ALL در فاصله سنی ۴ ماه الی ۱۱ سال، پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خونگیری ساده به‌عمل آمد و با به کار بردن کیت استخراج توتال RNA شرکت کیاژن به شماره کاتالوگ ۵۲۳۰۴، توتال RNA استخراج شده و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند، پس از به‌دست آمدن نمونه‌های مد نظر (۳۶ نمونه با تشخیص ALL) پروتوکول لازم برای تهیه cDNA مربوطه طبق روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز با شماره کاتالوگ K۱۶۲۲ با تغییرات جزئی طبق روش زیر، انجام شد:

ساخت cDNA: جهت نائل شدن به این هدف ۱۰ میکروگرم از RNA توتال (معادل ۱ میکرولیتر از RNA توتال با غلظت ۱۰ میکروگرم/ میکرولیتر) با ۸ میکرولیتر از DEPC و ۱ میکرولیتر از پرایمر random hexamer با غلظت۱۰ میکرولیتر/ میکرولیتر مخلوط می‌شود، مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه گردید.

بعد از اتمام این زمان، مخلوط حرارت دیده بلافاصله در داخل یخ قرار داده شد.

روی یخ داخل مخلوط مد نظر ترکیبات زیرا اضافه گردید:

۴ میکرولیتر از بافر RT به همراه $MgCl_2$

۱ میکرولیتر آنزیم RT (MMLV)

۱ میکرولیتر از آنزیم RNAsin

۲ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی با غلظت ۱۰ میلی‌مول بر میکرولیتر

حجم به‌دست آمده با اضافه کردن ۲ میکرولیتر DEPC water معادل ۲۰ میکرولیتر در برنامه‌ی دمائی زیر قرار داده می‌شود:

C^o ۲۵ به‌مدت ۵ دقیقه

C^o ۴۲ به‌مدت ۶۰ دقیقه

C^o ۷۲ به‌مدت ۱۰ دقیقه

بعد از اتمام ۳۵ سیکل دمائی، cDNA جهت انجام PCR نهایی وارد واکنش زیر شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم cDNA در محیط حاوی ۱۰ میلی‌مول مخلوط dNTP (شرکت تاکارای ژاپن) ۷ پیکومول از پرایمرهای تکثیر دهندهٔ قطعهٔ cDNA مدنظر شامل پرایمر Mll-۱ و Mll-۲، Bac-۱ و Bac-۲ (جدول ۱)، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (تاکارای ژاپن با شماره کاتالوگ A۶۱۰۱A)، ۲/۵

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

میکرولیتر از بافر ۱۰X محتوی KCl mg/ml sperm/۲۵ activated salmon و ۱/۲۵ میکرولیتر از ۲۵۰mM MgCl و ۸۰ نانوگرم DNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

پرایمرهای Bac-۱ و Bac-۲ جهت تکثیر قسمتی از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

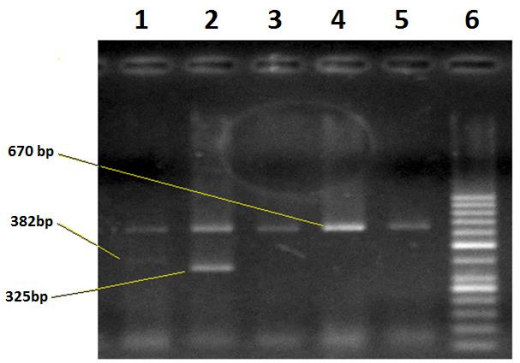
جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در Nested RT-PCR برای تشخیص حضور ژن نوترکیب MLL-AF۴

نام	ترادف
Mll-۱	CCGCCTCAGCCACCTAC
Mll-۲	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG
Mll-۳	AGGACCGCCAAGAAAAGA
Mll-۴	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG
Bac-۱	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
Bac-۲	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

برنامه دمائی استفاده شده برای انجام این واکنش برای بررسی حضور بیان ژن نوترکیب MLL-AF۴ در مرحله‌ی اول PCR به‌ترتیب زیر بود:

۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل به‌ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه. زمان Extension نهایی در این PCR لحاظ نگردید. جهت انجام Nested-PCR مخلوط واکنش شبیه مرحله‌ی اول بود، با این تفاوت که در مرحله‌ی دوم PCR شروع واکنش با استفاده از روش Hot-Start اعمال شد و ۱µl از محصول واکنش اول به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب پرایمرهای این مرحله مخلوطی ۵pmol از پرایمرهای Mll-۳ و Mll-۴ بود.

پس از اتمام مراحل واکنش‌های اول و دوم، محصولات به‌دست آمده بر روی ژل آگاروز ۳ درصد و با ولتاژ ۱۰ ولت به‌ازای هر سانتی‌متر ژل، الکتروفورز گردید و نتایج حاصل ثبت شد (شکل ۱).



شکل۱) مقایسه حضور ژن نوترکیب در بیماران، در کنار کنترل داخلی: ۱) مرحله اولPCR نوع ایزوفرم e۵–e۹. ۲) مرحله دومPCR نوع ایزوفرم e۵–e۹. ۳ و ۵) نمونه‌های منفی برای ژن جوششی MLL-AF۴. ۴) کنترل داخلی با اندازه ۶۷۰ جفت باز. ۶) سایز مارکر ۵۰ جفت بازی

یافته‌ها

نتایج نشان داد که نحوه بیان ژن نوترکیب MLL-AF۴ در محدوده‌ی سنی ۴ الی ۱۲ ماه بیشترین مقدار را در مرحله دوم و توسط (Nested)PCR داراست (جدول ۲). همچنین بیشترین فراوانی ایزوفرم درگیر در ژن‌های نوترکیب در همان محدوده ایزوفرم e۱۱–e۴ می‌باشد (جدول ۳). شکل ۱ حضور ژن نوترکیب و مقایسه آن با کنترل داخلی را نشان می‌دهد.

جدول ۲) نحوه بیان ژن نوترکیب MLL-AF۴ در بیماران مراجعه کننده در مقایسه با سنین بیماران

گروه بیمار	تعداد	حالت مثبت در مرحله اول PCR	حالت مثبت در مرحله دومPCR (Nested)
محدوده‌ی سنی ۴ ماه الی ۱۲ ماه	۱۲	۰	۴
محدوده‌ی سنی ۱۲ ماه الی ۲۴ماه	۴	۱	۱
محدوده‌ی سنی ۲۴ ماه الی ۴۸ماه	۱۱	۲	۲
محدوده‌ی سنی ۴۸ ماه الی ۱۱ سال	۹	۰	۰

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

جدول ۳) فراوانی ایزوفرم‌های درگیر در ژن‌های نوترکیب شناخته شده

گروه بیمار	تعداد	e11-e4	e11-e5	e11-e6	e10-e4	e10-e5	e10-e6	e9-e4	e9-e5	e8-e4	e8-e7
محدوده‌ی سنی ۴ ماه الی ۱۲ ماه	۱۲	۳	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
محدوده‌ی سنی ۱۲ ماه الی ۲۴ ماه	۴	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
محدوده‌ی سنی ۲۴ ماه الی ۴۸ ماه	۱۱	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
محدوده‌ی سنی ۴۸ ماه الی ۱۱ سال	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

بیشترین مقدار فراوانی مشاهده شده برای ایزوفرم‌های درگیر در ژن‌های نوترکیب شناخته شده در بیماران با لوسمی لنفوبلاستیک حاد را ایزوفرم e۱۱–e۴ با ۰/۱۳ به خود اختصاص می دهد (جدول ۴)

جدول ۴) فراوانی انواع ایزوفرم‌های درگیر در ژن‌های نوترکیب شناخته شده در بیماران با لوسمی لنفوبلاستیک حاد

ایزوفرم	تعداد	فراوانی مشاهده شده	CI ۹۵ درصد
e۱۱–e۴	۵	۰/۱۳	۰/۷۰–۰/۷۸
e۱۰–e۴	۲	۰/۰۵	۰/۰۴۵ –۰/۳۳
e۹–e۵	۱	۰/۰۲۵	۰/۰۲۳–۰/۳۷

بحث

ژن MLL از ۳۷ اگزون با حجمی به‌اندازه ۱MB تشکیل شده است. پروتئین MLL حاوی نواحی، قلاب A-T است که قابلیت اتصال با شیار کوچکDNA را دارد. ناحیه‌ای با توانایی باند شدن با DNAی همی‌متیله که در ناحیه‌ی ٥َ پروتئین کد شده توسط اگزون ۸ قرار دارد و دومین Zinc finger که توسط اگزون‌های ۱۱ تا ۱۶ کد می‌شود(۳۴–۳۲).

ژن MLL با حدود ۳۰ نوع جابجائی مختلف کروموزومی شرکت می‌کند که در مورد ۲۰ نوع آن‌ها ژن همراهی کننده‌ی این جابجائی‌ها شناخته شده است (۳۴). ژن‌های نوترکیبی که MLL در شکل‌گیری آنها شرکت می‌کند در لوسمی حاد لنفوئیدی پیش‌سازهای سلول B، لوسمی میلوئیدی حاد، سندرم‌های میلودیسپلاستیک، برخی موارد لوسمی حاد لنفوئیدی سلول‌های T و لوسمی‌های ثانویه مشاهده شده است (۴۱–۳۵).

ژن AF۴ از ۲۰ اگزون شکل گرفته است که پروتئینی غنی از سرین و پرولین کد می‌کنند (۴۲ و ۴۳). نقش اصلی و دقیق این پروتئین هنوز به روشنی مشخص نشده است و نواحی عملکردی این پروتئین‌ها هنوز به‌درستی طبقه‌بندی نشده‌اند. حضور ژن نوترکیب MLL-AF۴ در تمام موارد t(۴;۱۱) و مواردی که با سیتوژنتیک روتین قابل تشخیص نیست، به اثبات رسیده است (۱۵). جابجائی متوازن MLL-AF۴ به‌طور همزمان در ۷۰ درصد موراد نیز مشخص شده است (۱۵). برخلاف t(۸;۲۱) یا t(۱۲;۲۱) که در آن‌ها یک یا حداکثر ۲ ایزوفرم برای جابجائی‌های کروموزومی مشخص شده است، در مورد t(۴;۱۱) حداقل ۱۰ ژن نوترکیب MLL-AF۴ وجود دارد که ناشی از نواحی شکست مختلف اینترونیک است.

ناحیه‌ی شکست اصلی ژن MLL از نظر مشخصات کلی به‌خوبی بررسی شده است. این ناحیه شکست ۶/۵ کیلوبازی مابین اگزون‌های ۸ و ۱۲ قرار دارد. نواحی شکست در نوع لوسیم‌های مختلف با درگیری رده‌های مختلف سنی الگویی تقریباً متفاوت دارد،

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

به‌گونه‌ای که این شکست در مورد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی نوجوانان و بالغین بیشتر در انترون‌های ۹ و ۱۰ و در مورد لوسمی لنفوئیدی حاد کودکان در انترون ۱۱ اتفاق می‌افتد (۴۴). ناحیه‌ی شکست ژن AF۴ حجم وسیع ۴۰ کیلوبازی را به خود اختصاص می‌دهد. شایع‌ترین محل ممزوج شدن ژن نوترکیب MLL-AF۴ از اگزون ۴ است. ژن نوترکیب MLL-AF۴ به‌عنوان فاکتور پیش‌آگهی بد از طرف چندین گروه مطالعاتی بیان شده است (۷، ۱۱، ۴۵ و ۴۶). با وجود اینکه این نوع پیش‌آگهی در بالغین و نوجوانان نیز تقریباً صادق است، اما یک مطالعه به نتیجه جالبی دست پیدا کرده است و آن اینکه دوز بالای سیتوزین آرابینوزید در القای بهبودی لوسمی لنفوئیدی حاد بزرگسالان MLL-AF۴ مثبت تأثیرگذارتر است (۱۲).

بررسی اختلالات کروموزومی و ژنتیکی که در لوسمی‌های حاد رخ می‌دهد در ارائه فاکتورهای پیش‌آگهی کننده‌ی بسیار حائز اهمیت است و این فاکتورها، اهمیتی بالقوه برای طراحی پروتوکول‌های درمانی مبتنی بر میزان ریسک بیماری دارند. علاوه‌بر این موضوع، توافق جهانی برای پیش‌آگهی‌های نامناسب چند اختلال کروموزومی مانند: جابجائی‌های کروموزومی ۹ با ۲۲ و ۴ با ۱۱ وجود دارد، اهمیت پیش‌آگهی کننده جابجائی‌های کروموزومی دیگر در لوسمی‌های حاد، در هاله‌ای از ابهام است. در دو دهه اخیر مدارک زیادی دال بر ارزشمند بودن بررسی‌های مولکولی برای پیدا کردن اختلالات کروموزومی، در مواردی که کاریوتایپ‌های روتین با شکست مواجه می‌شود، به‌دست آمده است (۴۷ و ۴۸).

بنابراین به‌نظر می‌رسد، بررسی اختلالات و جابجائی‌های کروموزومی با استفاده از روش‌های مولکولی مناسب‌ترین و دقیق‌ترین روش برای مشخص کردن ویژگی‌های کروموزومی بیماران مبتلا به لوسمی حاد به ویژه لوسمی حاد لنفوئیدی باشد.

در این مطالعه سعی شده است از دیدگاهی جدید به بررسی این اختلال شایع کروموزومی t(۴;۱۱) تأکید شود این نحوه‌ی بررسی الگویی جدید در مطالعات انجام شده است به گونه‌ای که هدفی که برای این بررسی متصور هستیم، ارائه درصدی از نوع ایزوفرم‌های درگیر در ژن نوترکیب نام برده شده است و رسیدن به این مورد که کدام نوع ایزوفرم در ژن نوترکیب MLL-AF۴ درجه شیوع بیشتری در گروه مورد مطالعه دارد. عدم حضور نمونه‌های بالینی در دسترس، باعث می‌شود حجم نمونه پائینی مورد بررسی قرار گیرد. با بالاتر رفتن نمونه‌های بالینی مورد مطالعه می‌توان به داده‌های دقیق‌تری در این مورد دست یافت. از طرف دیگر این مطالعه نشان داد بررسی جابجائی‌های کروموزمی کمتر شایع نیز می‌تواند در روند تشخیصی همکاران محترم قرار گیرد.

سپاس و قدردانی

این مقاله با استفاده از امکانات و تجهیزات آزمایشگاه تشخیص طبی پلاسمای تبریز انجام یافته است، بدین‌وسیله از همکاری مسئولین محترم آزمایشگاه مذکور که در اجرای این پژوهش ما را مورد لطف قرار دادند، کمال تشکر به‌عمل می‌آید.

References:

1.Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukaemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. Blood 2002; 92: 1898-909.

2.Charrin C, Magaud JP, Sebban D, et al. Cytogenetic abnormalities in adult acute

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome. A Collaborative Study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. Blood 2003; 87: 3135-42.
3.Moorman AV, Hagemeijer A, Charrin C, et al. Secker-Walker LM on behalf of the European 11q23 Workshop participants. The translocation, t(11;19)(q23;p13.1) and t(11;19)(q23;p13.3): a cytogenetic and clinical profile of 53 patients. Leukemia 2003; 12: 805-10.
4.Hayette S, Tigaud I, Maguer-Satta V, et al. Recurrent involvement of the MLL gene in adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99: 4647-9.
5.Moorman AV, Richards S, Harrison C. Involvement of the MLL gene in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 100: 2273-4.
6.Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, et al. CD10_ pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adultALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for AdultALL (GMALL). Blood 2005; 106: 4054-6.
7.Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblasic leukemia. New Engl J Med 2005; 339: 605-15.
8.Gu Y, Nakamura T, Alder H, et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to the AF-4 gene. Cell 2002; 71: 701-8.
9.Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, et al. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. Blood 2000; 81: 1124-31.
10.Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, et al. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11) (q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 90: 7884-8.
11.Pui CH, Kane JR, Crist WM. Biology and treatment of infant leukemias. Leukemia 2005; 9: 762-9.
12.Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. Blood 2007; 92: 1898-909.
13.Hagemeijer A, Van Dongen JJ, Slater RM, et al. Characterization of the blast cells in acute leukemia with translocation (4;11): report of eight additional cases and of one case with a variant translocation. Leukemia 1987; 1: 24-31.
14.Borowitz MJ, Shuster J, Land V, et al. Myeloid antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. New Engl J Med 2006; 325: 1378-82.
15.Griesinger F, Elfers H, Ludwig WD, et al. Detection of HRX-FEL fusion transcripts in pre-pre-B-ALL with and without cytogenetic demonstration of t(4;11). Leukemia 2007; 8: 542-8.
16.Look AT, Kirsch IR. Molecular basis of childhood cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG, edithors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007: p. 37
17.Margolin JF, Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG, edithors. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007: p. 409
18.Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood 1986; 67: 415-20.
19.Ribeiro RC, Abromowitch M, Raimondi SC, et al. Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1987; 70: 948-53.
20.Cimino G, Moir DT, Canaani O, et al. Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. Cancer Res 1991; 51: 6712-4.
21.Gu Y, Cimino G, Alder H, et al. The (4;11) (q21;q23) chromosome translocations in acute leukemias involve the VDJ recombinase. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 10464-8.
22.Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R, et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: Identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 9358-62.
23.Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, et al. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. Blood 2005; 81: 1124-31.
24.Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, et al. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11) (q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 7884-8.
25.Ridge SA, Wiedemann LM. Chromosome 11q23 abnormalities in leukaemia. Leuk Lymphoma 2004; 14: 11-7.
26.Downing JR, Head DR, Raimondi SC, et al. The der(11) encoded MLL/AF4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23) containing acute lymphoblastic leukemia. Blood 2003; 83: 330-41.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

27.Heerema NA, Palmer CG, Baehner RL. Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1998; 17: 165-72.
28.Reaman GH, Sposto R, Sensel MG, et al. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on consecutive trials of the Children's Cancer Group. J Clin Oncol 2001; 3: 143-55.
29.Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11) (q21;q23) A collaborative study of 40 cases. Blood 1991; 77: 440-7.
30.Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, et al. Molecular analysis of infant acute lymphoblastic leukemia: MLL gene rearrangement and reverse transcriptase polymerase chain reaction for t(4; 11) (q21; q23). Blood 1995; 86: 3876-82.
31.Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. Blood 2004; 87: 2870-7.
32.Felix CA, Lange BJ. Leukemia in infants. Oncologist 2007; 4: 225-40.
33.Reaman GH, Sposto R, Sensel MG, et al. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the childrens cancer group. J Clin Oncol 2006; 17: 445-55.
34.Harrison CJ, Cuneo A, Clark R, et al. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. Leukemia 1998; 12: 811-22.
35.Blutters-Sawatzki R, Borkhardt A, Grathwohl J, et al. Secondary acute myeloid leukemia with translocation (4; 11) and MLL/AF4 rearrangement in a 15-year-old boy treated for common acute lymphoblastic leukemia 11 years earlier. Ann Hematol 1995; 70: 31-5.
36.Johansson B, Moorman AV, Haas OA, et al. Hematologic malignancies with t(4;11) (q21;q23) a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop. Leukemia 1998; 12: 779-87.
37.Martineau M, Berger R, Lillington DM, et al. The t(6;11) (q27;q23) translocation in acute leukemia: a laboratory and clinical study of 30 cases. EU Concerted Action 11q23 Workshop. Leukemia 1998; 12: 788-91.
38.Swansbury GJ, Slater R, Bain BJ, et al. Hematological malignancies with t(9;11) (p21–22;q23) a laboratory and clinical study of 125 cases. European 11q23 Workshop. Leukemia 2008; 12: 792-800.
39.Lillington DM, Young BD, Berger R, et al. The t(10;11) (p12;q23) translocation in acute leukaemia: a cytogenetic and clinical study of 20 patients. European 11q23 Workshop. Leukemia 1998; 12: 801-4.
40.Moorman AV, Hagemeijer A, Charrin C, et al. The translocations, t(11;19) (q23;p13.1) and t(11;19) (q23;p13.3) a cytogenetic and clinical profile of 53 patients. European 11q23 Workshop. Leukemia 1998; 12: 805-10.
41.Secker-Walker LM, Moorman AV, Bain BJ, et al. Secondary acute leukemia and myelodysplastic syndrome with 11q23 abnormalities. EU Concerted Action 11q23 Workshop. Leukemia 2000; 12: 840-4.
42.Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, et al. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. Blood 1993; 81: 1124-31.
43.Nilson I, Reichel M, Ennas MG, et al. Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukemia. Br J Haematol 2007; 98: 157-69.
44.Felix CA, Hosler MR, Slater DJ, et al. MLL genomic breakpoint distribution within the breakpoint cluster region in de novo leukemia in childeren. J Pediatr Hematol Oncol 1998; 20: 299-308.
45.Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 prodominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood 2002; 81: 2386-93.
46.Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia,a Pediatric Oncology Group study. Blood 2004; 84: 570-3.
47.Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. Semin Hematol 1999; 36: 373-89.
48.Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 2001; 13: 868-73.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

ISMJ 2014; 17(3): 254-262

Orginal Article

MLL-AF4 fusion transcripts in Acute Lymphocytic Leukemia patientsin Children hospital of Tabriz

A Monfaredan [1],S.M Tabatabaei [2], N Karimian Fathi [1], A Rezamand [3]*

[1] Research center of Oncology, Tabriz International Hospital, Tabriz, IRAN
[2] Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, IRAN
[3] Department of Heamatology & oncology, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, IRAN

(Received 6 Nov, 2011 Accepted 12 Agu, 2012)

Abstract

Background: MLL-AF4 positive Leukemias comprise about 50-70% of acute lymphoid leukemias in children and about 5% of adolescents and adults Despite recent advances in the treatment of hematologic malignancies of children with ALL in particular, but it seems that poor results are obtained from treating this type of malignancy. Perhaps it is due to the lack of enough knowledge about the expression pattern of the fusion gene induced by chromosomal translocations. This study aims to consider several aspects of the common chromosomal disorder, t (4; 11): due to lack of accurate statistical results for this type of translocation in our country, acceptable results are provided; Sprevalence of isoforms of recombinant genes involved in MLL-AF4 are explained.

Materials and methods: Of 36 patients with ALL between 4 months -11 years of age, peripheral blood sampling was done and total RNA extracted and cDNA was made. Then cDNA was amplified in two steps with the PCR and Nested PCR reactions. After electrophoresis the products were compared and analyzed in comparison with the internal control.

Results: The results showed that MLL-AF4 recombinant gene expression in the age between 4 to 12 months range is maximum in the second stage by Nested PCR. Also the highest frequency of fusion isoforms of the gene involved in the same age range is e11-e4 isoform with the frequency of 0.13.

Conclusion: It seems that investigation of translocation and chromosomal abnormalities using molecular techniques is one of the most accurate and suitable methods for identifying chromosomal characteristics in patients with acute leukemia, particularly ALL.

Keywords: Pediatric ALL, MLL-AF4 fusion gene, Nested PCR

*****Address for correspondence*: Department of Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, IRAN. Email: smt@iaut.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]