



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

امیر منفردان<sup>۱</sup>، سید محمود طباطبائی<sup>۲\*</sup>، ناهیده کریمیان فتحی<sup>۱</sup>، عظیم رضامند<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات انکولوژی، بیمارستان بین‌المللی تبریز، ایران

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

<sup>۳</sup> 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-AF4 مثبت در حدود ۵۰-۷۰ 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 لنفوئیدی 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 جابجایی‌های کروموزومی باشد. در این مطالعه سعی شده است از دیدگاهی خاص به بررسی اختلال شایع کروموزومی (۱۱،۲۱) t پرداخته شود؛ به علت نبود آمار دقیق این نوع جابجایی‌ها در کشور، آمار قابل قبول ارائه شود؛ درصد شیوع انواع ایزوفرم‌های درگیر در ژن نوترکیب MLL-AF4 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 به عمل 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 نوترکیب MLL-AF4 در محدوده 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 e11 با ۱۳٪ e4 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بهنظر می‌رسد بررسی اختلالات و جابجایی‌های 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 Nested PCR، MLL-AF4

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

## مقدمه

جابجائي‌های کروموزومی که در لوسومی‌های لنفوئیدی کودکان و بزرگسالان دیده می‌شود، می‌تواند باعث تولید پروتئین‌های نوترکیب با خاصیت لوسومی‌زاپی شود (۱ و ۲). زیرگروهی از این نوع جابجائي‌ها (q11;q22) است که با ریسک بالا در لوسومی لنفوئیدی حاد رده B همراه است و عملکرد خود را با تولید ژن نوترکیب و متعاقب آن پروتئین نوترکیب LNC-AFL به انجام می‌رساند (۳ و ۴). مکانیسمی مشابه با این پروسه برای (q21;q23) (۴;11) نیز متصور است. این نوع جابجائي مشخص‌ترین جابجائي در لوسومی‌های لنفوئیدی حاد است و باعث تولید ژن نوترکیب MLL بر روی کروموزوم ۱۱ و AF4 بر روی کروموزوم ۹ می‌شود (۱۶-۲۱).

حضور (۱۱;۴) با شرایط بالینی نامناسبی نظیر، شمارش سلول‌های سفید خونی بالا (۲۲ و ۲۳) و پاسخ به درمان ضعیف (۲۳-۲۷) همراه است. ژن MLL پروتئینی را کد می‌کند که دارای همولوژی با ژن Drosophila trithorax است (۲۸ و ۲۹). این ژن حاوی چندین ناحیه و دومین (Domain) مختلف است: از جمله قلاب A-T و دومین مهارکننده MLL-AF4 رونویسی در ناحیه ۵ ناحیه شکست Zinc finger دارای همولوژی با Zinc finger داخل ناحیه شکست و دومین فعال کننده رونویسی قرار گرفته در ناحیه شکست MLL-AF4 (۳۰ و ۳۱).

ژن AF4 پروتئینی با نواحی غنی از سرین و پروولین کد می‌کند که این توالی‌های آمینواسیدی در نزدیکی محل شکست AF4 قرار داشته و به عنوان ناحیه سیگنال رسانی هستند که در محل ۳ ناحیه شکست AF4 قرار می‌گیرند. بنابراین جابجائي مابین MLL و

یکی از زیر گروههای ردهی B لوسومی لنفوئیدی حاد با پیش‌آگهی ضعیف، با جابجائي کروموزومی ژن mixed lineage leukemia(MLL) روی کروموزوم ۱۱q23 مشخص می‌شود. این نوع جابجائي در ۳ تا ۶ درصد تمام لوسومی‌های لنفوئیدی حاد بالغین با ایمنوفوتایپ CD10+, CD19+, CyIgM وجود داشته و معمولاً با بیان مارکرهای میلوئیدی بهطور همزمان نیز همراه است (۱-۳) بررسی‌های اخیر نشان داده است که جابجائي ۱۱q23 در بیشتر از ۸ درصد لوسومی‌های حاد لنفوئیدی رده T نیز دیده می‌شود که در این موارد نیز با پیش‌آگهی بسیار ضعیفی همراه است (۴ و ۵).

در مطالعات دیگر مشخص شده است که زیر گروه دیگری با جابجائي ژن MLL وجود دارد که با ایمنوفوتایپ CD19+ CD10-, CyIgM+ مشخص می‌شود (۶).

بررسی‌های مولکولی نشان داده است که (q21;q23) (۱۱;۴) با درگیری ژن‌های Htrx, Htrx ۴ MLL(HRX) و AF4(FEL) همراه است (۷ و ۸).

مطالعات دیگر نیز به اطلاعات تقریباً مشابهی دست یافته‌اند به‌گونه‌ای که مشخص شده است که لوسومی‌های MLL-AF4 مثبت در حدود ۵۰-۷۰ درصد لوسومی‌های حاد لنفوئیدی کودکان و حدود ۵ درصد لوسومی‌های حاد لنفوئیدی نوجوانان و بالغین دیده می‌شود (۹-۱۱). حضور (q21;q23) (۱۱;۴) اغلب با فنتوتایپ Pro-B-ALL (CD10-, CD24-)، CD19+, CyCD79a+, CD19+ از اتصال ناحیه ۵ MLL و ۳ ژن AF4 حاصل می‌شود (۱۱، ۲۱ و ۲۴).

**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 میکرولیتر مخلوط می‌شود، مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه گردید. بعد از اتمام این زمان، مخلوط حرارت دیده بلا فاصله در داخل یخ قرار داده شد.

روی یخ داخل مخلوط مد نظر ترکیبات زیرا اضافه گردید:  
 ۴ میکرولیتر از بافر RT به همراه MgCl<sub>۲</sub>  
 ۱ میکرولیتر آنزیم MMLV RT  
 ۱ میکرولیتر از آنزیم RNAsin  
 ۲ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی با غلظت ۱۰ میلی مول بر میکرولیتر

حجم به‌دست آمده با اضافه کردن ۲ میکرولیتر دمایی زیر قرار داده می‌شود:

۲۵ C° به‌مدت ۵ دقیقه  
 ۴۲ C° به‌مدت ۶۰ دقیقه  
 ۷۲ C° به‌مدت ۱۰ دقیقه

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

### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم cDNA در محیط حاوی ۱۰ میلی مول مخلوط dNTP (شرکت تاکارای ژاپن) ۷ پیکومول از پرایمرهای تکثیر دهنده قطعه cDNA مدنظر شامل پرایمر Bac-۲ و Bac-۱ و Mll-۲ و Mll-۱ (جدول ۱)، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase (تاکارای ژاپن با شماره کاتالوگ A6101A)، ۲/۵

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

على‌رغم پیشرفت‌های اخیر در درمان بدخیمی‌های خونی کودکان به‌ویژه لوسیتی لغوشیتی حاد، به‌نظر می‌رسد نتایج ضعیفی از درمان این نوع بدخیمی حاصل می‌شود (۳۲ و ۳۳). شاید دلیل این نکته عدم شناخت کافی و مناسب از الگوی ژنتیکی این پروتئین‌های نوترکیب باشد (۲۳).

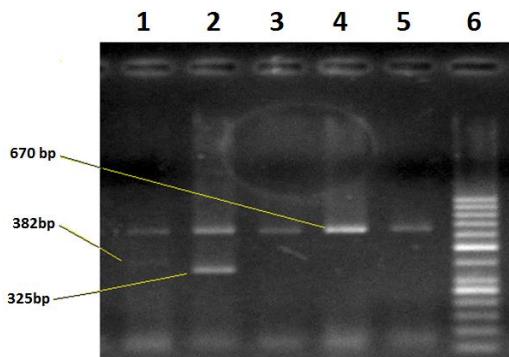
در این مطالعه سعی شده است از دیدگاهی خاص به بررسی اختلال شایع کروموزومی (۱۱؛ ۴) پرداخته شود: اول اینکه به‌علت عدم وجود آمار دقیق این نوع جایجایی‌ها در کشور، آمار قابل قبول ارائه شود؛ دوم درصد شیوع انواع ایزوفرم‌های درگیر در ژن نوترکیب MLL-AF4 بیان گردد.

## 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 به عمل 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 مذکور (۳۶ نمونه با تشخیص ALL) پرتوکول لازم برای تهیه cDNA مربوطه طبق روش پیشنهادی شرکت فرمتاز با شماره کاتالوگ K16۲۲ با تغییرات جزئی طبق روش زیر، انجام شد:

و با ولتاژ ۱۰ ولت بهازای هر سانتی‌متر ژل، الکتروفورز گردید و نتایج حاصل ثبت شد (شکل ۱).



شکل ۱) مقایسه حضور ژن نوترکیب در بیماران، در کنار کنترل داخلی: ۱) مرحله اول PCR نوع ایزوفرم (۲، e9-e5) مرحله دوم PCR نوع ایزوفرم (۳، e9-e5) و (۵) نمونه‌های منفی برای ژن جوششی ۴) MLL-AF4 کنترل داخلی با اندازه ۶۷۰ جفت باز. ۶) سایز مارکر ۵۰ بازی

### یافته‌ها

نتایج نشان داد که نحوه بیان ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup> در محدوده 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 e4-e11 می‌باشد (جدول ۳). شکل ۱ حضور ژن نوترکیب و مقایسه آن با کنترل داخلی را نشان می‌دهد.

جدول ۲) نحوه بیان ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup> در بیماران مراجعة کننده در مقایسه با سنین بیماران

سال	پیمار	نماید	PCR اول	کنترل	PCR دوم (Nested)	میث در PCR	میث در PCR
محدوده سنی ۴ ماه الی ۱۲ ماه	۱۲	.	۴				
محدوده سنی ۱۲ ماه الی ۲۴ ماه	۴	۱	۱				
محدوده سنی ۲۴ ماه الی ۴۸ ماه	۱۱	۲					
محدوده سنی ۴۸ ماه الی ۱۱ سال	۱۱	۹	.	.			

میکرولیتر از بافر ۱۰X محتوى mg/ml و ۱/۲۵ activated salmon sperm/۲۵ میکرولیتر از ۸۰ نانوگرم DNA در حجم ۲۵۰mM MgCl<sub>2</sub> در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

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

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده در برای تشخیص حضور ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup>

نام	تارaf
CCGCCTCAGCCACCTAC	MII-۱
TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	MII-۲
AGGACCGCCAAGAAAAGA	MII-۳
CGTCCCTGCTGAGAATTG	MII-۴
CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	Bac-۱
CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	Bac-۲

برنامه دمائی استفاده شده برای انجام این واکنش برای بررسی حضور بیان ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup> در مرحله اول PCR به ترتیب زیر بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه. زمان Extension نهایی در این PCR لحظه نگردید. جهت انجام Nested-PCR مخلوط واکنش شبیه مرحله اول بود، با این تفاوت که در مرحله دوم PCR شروع واکنش با استفاده از روش Hot-Start اعمال شد و ۱ μl از محصول واکنش اول به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب پرایمرهای این مرحله مخلوطی ۵pmol از پرایمرهای MII-۳ و MII-۴ بود. پس از اتمام مراحل واکنش‌های اول و دوم، محصولات به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۳ درصد

جدول ۳) فراوانی ایزوفرم‌های درگیر در ژن‌های نوترکیب شناخته شده

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

B. لوسومی میلوبئیدی حاد، سندروم‌های میلودیسپلاستیک، برخی موارد لوسومی حاد لنفوئیدی سلول‌های T و لوسومی‌های ثانویه مشاهده شده است (۴۱-۳۵).

ژن AF<sup>4</sup> 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 به درستی طبقه‌بندی نشده‌اند. حضور ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup> در تمام موارد (۱۱؛ ۴) t و مواردی که با سیتوزنیک روتین قابل تشخیص نیست، به اثبات رسیده است (۱۵). جابجایی متوازن MLL-AF<sup>4</sup> به طور همزمان در ۷۰ درصد موراد نیز مشخص شده است (۱۵). برخلاف (۲۱؛ ۸؛ ۲۱) t یا (۱۱؛ ۴) t که در آن‌ها یک یا حداقل ۲ ایزوفرم برای جابجایی‌های کروموزومی مشخص شده است، در مورد (۱۱؛ ۴) t حداقل ۱۰ ژن نوترکیب MLL-AF<sup>4</sup> وجود دارد که ناشی از نواحی شکست مختلف ایترنونیک است.

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

بیشترین مقدار فراوانی مشاهده شده برای ایزوفرم‌های درگیر در ژن‌های نوترکیب شناخته شده در بیماران با لوسومی لنفوبلاستیک حاد را ایزوفرم e11-e4 با ۰/۱۳ تعداد (جدول ۴) به خود اختصاص می دهد (جدول ۴)

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

CI ۹۵ درصد	فراوانی مشاهده شده	تعداد	ایزوفرم
۰/۷۰-۰/۷۸	۰/۱۳	۵	e11-e4
۰/۰۴۵-۰/۰۳۳	۰/۰۵	۲	e10-e4
۰/۰۲۳-۰/۰۳۷	۰/۰۲۵	۱	e9-e5

## بحث

ژن MLL از ۳۷ اگزون با حجمی به اندازه ۱MB تشکیل شده است. پروتئین MLL حاوی نواحی، قلاب A-T است که قابلیت اتصال با شیار کوچک DNA را دارد. ناحیه‌ای با توانایی باند شدن با DNA همی‌متیله که در ناحیه‌ی ۵ پروتئین کد شده Zinc finger توسط اگزون ۸ قرار دارد و دومین که توسط اگزون‌های ۱۱ تا ۱۶ کد می‌شود (۳۲-۳۴).

ژن MLL با حدود ۳۰ نوع جابجایی مختلف کروموزومی شرکت می‌کند که در مورد ۲۰ نوع آن‌ها ژن همراهی کننده‌ی این جابجایی‌ها شناخته شده است (۳۴). ژن‌های نوترکیبی که MLL در شکل گیری آنها شرکت می‌کند در لوسومی حاد لنفوئیدی پیش‌سازهای سلول

می‌شود، به دست آمده است (۴۷ و ۴۸). بنابراین به نظر می‌رسد، بررسی اختلالات و جابجایی‌های 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 (۱۱؛ ۴؛ t) تأکید شود این نحوه 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-AF4 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 جابجایی‌های کروموزومی 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 به عمل می‌آید.

### References:

- Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukaemia:

به گونه‌ای که این شکست در مورد لوسمی‌های حاد لنفوئیدی نوجوانان و بالغین بیشتر در انtron‌های ۹ و ۱۰ و در مورد لوسمی لنفوئیدی حاد کودکان در انtron ۱۱ اتفاق می‌افتد (۴۴). ناحیه‌ی شکست ژن AF4 حجم وسیع ۴۰ کیلوبازی را به خود اختصاص می‌دهد. شایع‌ترین محل ممزوج شدن ژن نوترکیب MLL-AF4 از اگزون ۴ است. ژن نوترکیب MLL-AF4 به عنوان فاکتور پیش‌آگهی بد از طرف چندین گروه مطالعاتی بیان شده است (۱۱، ۷ و ۴۵). 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 آرایینوزید در القای بهبودی لوسمی لنفوئیدی حاد بزرگسالان MLL-AF4 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 پروتوكول‌های درمانی مبتنی بر میزان ریسک بیماری دارند. علاوه‌بر این موضوع، توافق جهانی برای پیش‌آگهی‌های نامناسب چند اختلال کروموزومی مانند: جابجایی‌های کروموزومی ۹ با ۲۲ و ۴ با ۱۱ وجود دارد، اهمیت پیش‌آگهی کننده جابجایی‌های 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

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

- 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 adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood* 2005; 106: 4054-6.
  7. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic 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; 355: 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, editors. *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, editors. *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.

- 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.Blitters-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 children. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 299-308.
- 45.Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate 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.

Orginal Article

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

A Monfaredan <sup>1</sup>, S.M Tabatabaei <sup>2\*</sup>, N Karimian Fathi <sup>1</sup>, A Rezamand <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research center of Oncology, Tabriz International Hospital, Tabriz, IRAN

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, IRAN

<sup>3</sup> 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