Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

غربالگری فاکتورهای پیش‌آگهی دهنده با استفاده از تکنیک Multiplex RT-PCR در رده‌های مختلف سلول‌های لوسمی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۹/۳۰

روشنک آهنی
پوپک درخشنده پیکر
رضا رئوفیان
منصور حیدری*

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵
email: mheidari@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در کودکان می‌باشد. لوسمی حاد لنفوسیتی T حدود ۱۵٪ لوسمی‌ها را در بر می‌گیرد. شناسایی تغییرات ژنتیکی مرتبط با لوسمی با توجه به پیشرفت‌های گسترده در زمینه سیتوژنتیک مولکولی و نیز به‌کارگیری تکنیک‌های ژنتیک مولکولی بهبود یافته است. تعیین این تغییرات ژنتیکی می‌تواند پیشگویی‌کنندهٔ دقیق نتایج بالینی باشد. این ملاحظات بر نیاز اساسی برای به‌کارگیری یک روش شناسایی سریع تغییرات ژنتیکی در این ناهنجاری‌ها تاکید می‌کنند. ***روش بررسی:*** در این مطالعه سیستم Multiplex (RT-PCR) Reverse Transcription برای غربالگری سه فاکتور رونویسی سرطان‌زا با نام‌های TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2, TAL1/SCL, که در لوسمی لنفوبلاستیک نوع T بسیار مهم می‌باشند، به‌کار گرفته شده است. ***یافته‌ها:*** با استفاده از تکنیک Multiplex RT-PCR در نمونه‌ای که حاوی مجموعه‌ای از cDNA سه رده سلولی HPB-ALL، Peer و K562 می‌باشد، شناسایی همزمان سه انکوژن TLX3/HOX11L2، TLX1/HOX11 و TAL1/SCL، که به‌ترتیب در رده‌های سلولی فوق بیان می‌شوند، صورت گرفت. ***نتیجه‌گیری:*** روش Multiplex RT-PCR را می‌توان به‌عنوان ابزار مهمی برای کامل کردن روش‌های سیتوژنتیک در غربالگری بیماران مبتلا به لوسمی حاد نوع T باشد و خصوصیات سلول‌های لوسمیک را با سرعت و کارایی بالایی و نیز هزینه‌ای بسیار کمتر تعیین نماید. برای این آزمایش نیازی به نمونه مغز استخوان نیست و از خون محیطی می‌توان استفاده کرد و روند پیشرفت درمان را با بررسی خون محیطی از نظر بیان این انکوژن‌ها بررسی کرد. علاوه بر این به متخصصین مربوطه این امکان را می‌دهد که نه تنها در حداقل زمان ممکن از وضعیت درمان آگاهی یابد بلکه عوارض جانبی را با به‌کارگیری درمان مناسب کاهش دهد.

کلمات کلیدی: Multiplex RT-PCR، T-ALL، انکوژن، لوسمی، سلول.

مقدمه

لوسمی‌ها (Leukemia) حدود ۳۰٪ از سرطان‌های کودکان را تشکیل می‌دهند. ۱۵٪ لوسمی‌ها، لوسمی حاد لمفوبلاستی Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) می‌باشد. لوسمی‌های لنفوبلاستی حاد عمدتاً از نوع سلول T (T-ALL) است.[۱] با پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های درمانی، توجه بیشتری نسبت به شناسایی مارکرهای پیش‌آگهی‌دهنده برای طبقه‌بندی بهتر بیماران صورت گرفته است.[۲] اگرچه بهترین نرخ بهبودی بیماران مبتلا به سرطان تا ۷۵ درصد مربوط به ALL بوده است اما نسبت بالایی از موارد آن هنوز کشنده هستند.[۳] علاوه بر این، روش‌های درمانی کنونی از قبیل شیمی‌درمانی عوارض ناخواسته و در برخی موارد عوارض جانبی شدیدی به‌همراه دارد. شایع‌ترین اهداف جابه‌جایی‌های کروموزومی در ALL، ژن‌های کدکننده فاکتورهای‌رونویسی از قبیلTLX1/HOX11، TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL هستند. این فاکتورهای رونویسی دارای دو عملکرد طبیعی و غیر طبیعی می‌باشند. برای مثال مطالعات مشخص نموده‌اند که عملکرد طبیعی TLX1/HOX11 و TAL1/SCL به‌ترتیب در شکل‌گیری و نمو طحال و در نمو و تمایز گویچه‌های خون دخالت دارند.[۴و۵] به‌نظر می‌رسد که بیان غیرطبیعی TLX1/HOX11 در سلول‌های T به‌خاطر وجود چنین ناهنجاری‌های ژنتیکی، یک مرحله مهم در تکامل لوسمی است. علی‌رغم این واقعیت که TLX1/HOX11 یکی از شایع‌ترین انکوژن‌های فعال‌شده در T-ALL می‌باشد، TLX3/HOX11L2 که یک عضو از خانواده

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

TLX1/HOX11 است، در ۳۰ درصد موارد T-ALL در کودکان بیان می‌شود که می‌تواند ناشی از جابه‌جایی کروموزومی t(5;14)(q35;q32) و فعال شدن ژن از نظر رونویسی باشد.[۶-۸] تکنیک‌های سیتوژنتیک مولکولی مانند Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) نه‌تنها بسیار گران هستند بلکه در برخی موارد قادر به شناسایی جابه‌جایی کروموزومی t(5;14)(q35;q32) نمی‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که فعال شدن انکوپروتئین‌هایی مانند TLX1/HOX11 TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL زیر رده‌های متفاوت T-ALL را مشخص می‌کنند و نقش پیش‌آگهی-دهنده در کودکان دارند.[۹] در حال حاضر تشخیص لوسمی حاد از طریق به‌کارگیری علوم مختلف مانند بافت‌شناسی، ایمونولوژی و سیتوژنتیک به‌عنوان روش‌هایی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، انجام می‌یابد. ایمونوفنوتیپ و بافت‌شناسی نمی‌توانند به‌عنوان ابزارهایی برای مشخص کردن پیش‌آگهی در بیماران به‌کار روند. در حالی که بررسی سیتوژنتیک بیماران لوسمیک می‌تواند در مواردی پیش‌آگهی‌های خاصی را مشخص کند[۱۰] در این مقاله راه‌اندازی یک سیستم Multiplex RT-PCR توصیف شده است. این روش، شناسایی TLX1/HOX11، TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL که به‌صورت اختصاصی در رده‌های سلولی لوسمیک Peer, PB-ALL و K562 بیان می‌شوند، را آسان‌تر می‌نماید.

روش بررسی

این مطالعه از نوع علوم پایه (Experimental) بوده و در گروه ژنتیک پزشکی دانشکده پزشکی انجام گردیده است.

رده‌های سلولی و کشت سلول: رده‌های سلولی لوسمیک HPB-ALL, Peer و K562 از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت RPMI 1640 که با ده درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۰/۰۳ درصد LGlutamin (Roche-Germany) و یک درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (Roche-Germany) تکمیل شده بود در دمای ۳۷°C و CO_2 پنج درصد کشت داده شدند.

استخراج RNA: RNA تام سلول‌ها با استفاده از Tripure (Roche, Germany) استخراج شد. به‌صورت خلاصه ابتدا سلول‌های کشت داده شده توسط لام نئوبار شمارش گردیدند. تعداد پنج میلیون از سلول‌ها به‌مدت ۲۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. ۱ml از Tripure به رسوب سلولی اضافه و به‌وسیله پیپت کردن هموژنیزه شد. سپس تیوب به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده و به‌مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از اضافه کردن ۲۰۰µl کلروفرم، در دمای اتاق انکوبه و سپس در ۱۲۰۰۰xg به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ گردیدند. در این مرحله سه فاز تشکیل‌شده و فاز مایع رویی که حاوی RNA است به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید. به‌منظور رسوب دادن RNA ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰xg به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ می‌نماییم. به مایع رویی ۱ml اتانول ۷۵٪ اضافه نموده و در ۷۵۰۰xg سانتریفوژ شد. در نهایت آن RNA حاصله در DEPC treated RNase free water حل گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵°C قرار داده شد. RNA استخراج‌شده را به‌وسیله اسپکتروفتو-متر از نظر کمی اندازه‌گیری‌و در ۷۰°C- تا زمان استفاده نگهداری شد.

RT-PCR: برای ساختن cDNA، ۱µg از RNA تام ۰/۲µg از رندوم پرایمر ۱۱µl از آب دوبار تقطیر، ۴۰µl مهارکننده ریبونوکلئاز و ۰/۵mM dNTP به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شدند، سپس ۲۰۰ واحد آنزیم Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Fermentas Litvania) (MMLV RT) اضافه شده و محلول حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوبه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C و cDNA تا زمان مورد نیاز در ۷۰- قرار داده شد.

کنترل کردن cDNA برای تایید کیفیت: برای چک کردن تمامیت و صحت cDNA ساخته شده از پرایمرهای ژن خانه‌دار (Housekeeping) Phosphoglucomutase 1 (PGM1) استفاده شد. پرایمرهای این ژن ناحیه ۱۷۱۸ تا ۲۱۰۴ (از اگزون شماره ۱۰ تا اگزون شماره ۱۱) PGM1 را تحت پوشش قرار می‌دهند. تمام پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار تحت وب Primer3 طراحی شدند و برای اختصاصی بودن در مورد اهدافشان به‌وسیله برنامه Blast چک شدند. این پرایمرها به گونه‌ای انتخاب شدند که شرایط تقریباً یکسانی برای Multiplex RT-PCR را فراهم آورند. از جمله می‌توان به T_m (Melting Temperature) تقریباً یکسان آنها اشاره کرد. جدول ۱ خصوصیات پرایمرها را نشان می‌دهد قبل از اینکه این پرایمرها برای Multiplex RT-PCR مورد استفاده قرار گیرند، ابتدا جفت پرایمرهای اختصاصی انکوژن‌های مورد مطالعه در واکنش‌های PCR مجزا، با به‌کارگیری نمونه cDNA از سلول‌هایی که

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

آنها را بیان می‌کردند، آزمایش شدند. این آزمایش به Split out RT-PCR معروف است. برای هر جفت پرایمر گرادینت RT-PCR دمایی انجام شد که در نهایت منجر به انتخاب بهترین T_m مشترک برای هر سه پرایمر گردید. از سوی دیگر بیشترین زمان مورد استفاده برای تکثیر طولانی‌ترین Amplicon به‌عنوان زمان Extension در واکنش Multiplex RT-PCR انتخاب گردید. PCR طبق برنامه‌زیر انجام شد: چرخه‌های‌حرارتی ۹۵^{oc} به پنج دقیقه یک سیکل، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۸^{oc} به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و طی ۳۰ سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی هفت دقیقه.

TA Cloning: ژن‌های TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL بعد از تکثیر به‌روش RT- PCR و خالص‌سازی از ژل آگاروز با استفاده از کیت TA-Cloning (Fermentas, Litvania) و طبق دستورالعمل‌آن انجام‌شد.

یافته‌ها

برای انجام این پروژه سلول‌های مورد مطالعه طبق توضیحاتی که در بخش مواد و روش‌ها ذکر گردید RNA تام استخراج گردید. شکل ۱ نمایش Total RNA استخراج‌شده را نشان می‌دهند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بعد از ساخت cDNA کیفیت و صحت آن به‌وسیله پرایمرهای‌خاص ژن PGM به‌وسیله RT-PCR آزمایش گردید. غربالگری رده‌های سلولی لوسمیک برای بیان ژن‌های TLX1/HOX11 TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL مشخص شده است که بیان این سه انکوژن باعث پیشرفت T-ALL می‌شود پس ما ابتدا بیان این ژن‌ها را به‌وسیله RT-PCR و سپس به‌وسیله Multiplex RT-PCR بررسی‌کردیم. غربالگری رده سلولی Peer برای بیان ژن TLX1/HOX11: شرایط برای تشخیص TLX1/HOX11 بهینه شد و قسمتی از ناحیه کد کننده TLX1/HOX11 (۱۸۰bp برای راند اول و ۱۴۹bp برای راند دوم) از TLX1/HOX11 انسانی به‌وسیله Semi-nested RT-PCR با استفاده از cDNA مربوط به رده لوسمیک peer انجام شد. شکل ۱ محصولات مربوط به این RT-PCR را نشان می‌دهد. cDNA مربوط به ژن TLX1/HOX11 قبلاً در وکتور باکتریایی pGEX-6p-1 کلون شده بود.

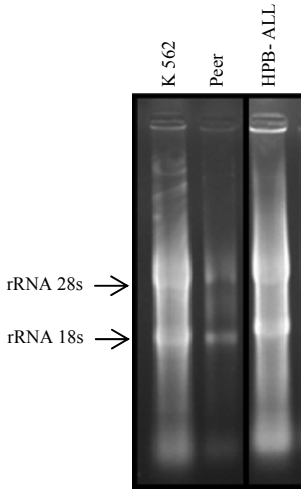
غربالگری رده سلولی HPB-ALL برای بیان ژن TLX3/HOX11L2: قسمت‌هایی از ناحیه کد کننده TLX3/HOX11L2 شامل ۳۲۸bp در راند اول و ۱۴۹bp در راند دوم از این ژن تکثیر یافتند و شکل ۲ نتایج حاصل از Semi-nested Multiplex RT-PCR را نشان می‌دهد. محصول PCR راند دو در یک وکتور TA- cloning کلون گردید. شکل ۲ نتیجه PCR تکی را که با استفاده از وکتور نوترکیب به‌عنوان الگو به‌کار رفته است را نشان می‌دهد. ما نتایج PCRهایی را که در آنها الگوی PCR از RNA تام رده سلولی مربوطه بوده را با وکتور نوترکیب حاوی TLX3/HOX11L2 و TLX1/HOX11 در شکل ۲ با یکدیگر مقایسه کرده‌ایم. هدف اصلی از این آزمایش، ساختن یک کنترل مثبت به‌جای استفاده از رده سلولی مربوطه برای مطالعات بیشتر از جمله به‌کار بردن این کلون در هنگامی که محقق سعی در انجام RT-PCR و یا Multiplex RT-PCR بر روی نمونه‌های بالینی دارد، می‌باشد.

غربالگری برای بیان ژن TAL1/SCL: با تکنیک Semi- nested RT-PCR دو قطعه ۲۵۴bp و ۱۶۹bp و رده سلولی K562 تکثیر شدند. شکل ۳ موقعیت باندهای PCR را برای هر دور تکثیر نشان می‌دهد. محصول PCR راند دوم در یک وکتور TA cloning کلون گردید. غربالگری TLX1/HOX11، TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL با استفاده از تکنیک Multiplex RT-PCR: برای انجام این آزمایش برای شناسایی سه فاکتور رونویسی سرطان‌زای ذکـر شده، سه جفت پرایـمر طراحی

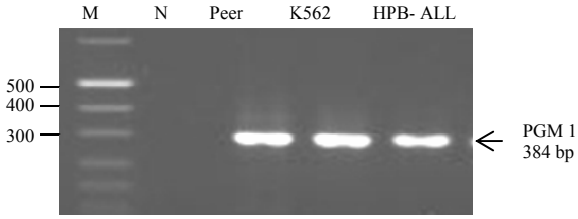
جدول-۱: ترادف پرایمرهای مورد استفاده در Multiplex Rt-PCR

پرایمر	فاکتور ترانسکریپشن انکوژنی	پرایمرهای راند اول	پرایمرهای راند دوم
TLX3F	TLX3/HOX11L2	5’-CAGTGTGAACCTGAGCCTAGC-3’	5’-CAGTGTGAACCTGAGCCTAGC-3’
TLX3R1		5’-CGTGCGCGGCTTCTTAC-3’	
TLX3R2			5'-CGATGGAAGCGCTTTTCCA-3'
TAL1F	TAL1/SCL	5’-CATGGTGCAGCTGAGTCCT-3’	5’-CATGGTGCAGCTGAGTCCT-3’
TAL1R1		5’-GGGGAAGGTCTCCTCTTCAC-3’	
TAL1R2			5’-CCGGCTGTTGGTGAAGATAC-3’
HOF	TLX1/HOX11	5’-TCCCCTGGATGGAGAGTAAC-3’	5’-TCCCCTGGATGGAGAGTAAC-3’
HOR1		5’-AGGTACTTCTGGCGGTGGA-3’	
HOR2			5’-GCATCGGTCATTTTGAGC-3’
PGMF	PGM1	5'-GCCCGCAGGTCCTCTTTCCCTCACA-3'	
PGMR		5'-TCCGACTGAGCGGCACTGGGAGTGC-3'	

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017



شکل-۱: نمایش Total RNA استخراج‌شده بر روی ژل ۱/۲٪ آگارز رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید. فلش‌ها به‌ترتیب موقعیت RNA-های ریبوزومی را نشان می‌دهند

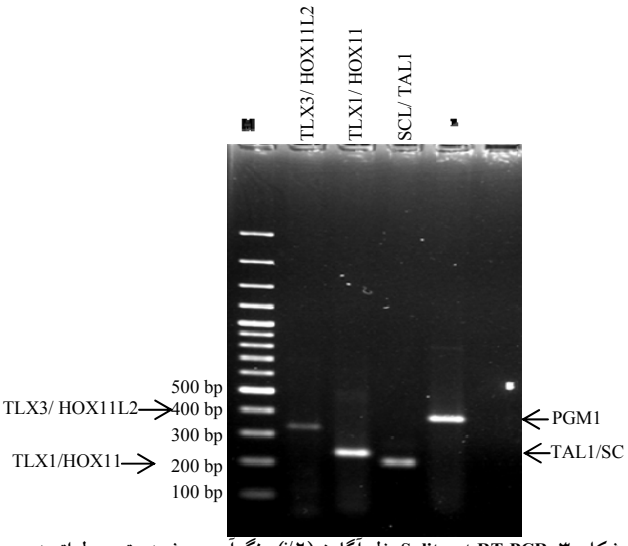


شکل-۲: ژل آگارز ۱/۲٪ رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم برومایـد نشان‌دهنده محصولات RT-PCR برای تعیین کیفیت cDNA. از چپ به راست اولین ردیف مربوط به مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی است. محصولات RT-PCR مربوط به PGM چهار رده سلولی peer و k562 و HPB-ALL را نشان داده است. باندهای مربوط به اندازه قطعه DNA تکثیر یافته PGM نشان داده شده‌اند.

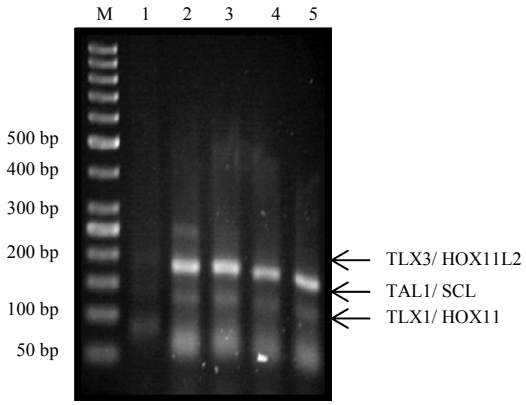
شد که دمای هم سرشته‌سازی آنها تقریباً مساوی بود و در عین حال Ampliconهایی با طول‌های متفاوت ایجاد می‌کردند. محصولات PCR با اندازه متفاوتشان بر روی ژل آگارز قابل تشخیص بودند (شکل ۴).

بحث

شناسایی جابه‌جایی‌های کروموزومی خاص یک ابزار کلیدی برای تشخیص و طبقه‌بندی کردن ریسک و پروگنوز در کودکان مبتلا به T-ALL است. روش‌های درمانی کنونی از روش‌های مختلف با شدت های متفاوت بر اساس گروه ریسک، به بهبود نرخ زندگی بچه‌های مبتلا به T-ALL تا حدود ۸۰٪ در برخی از مراکز کمک کرده‌اند.[۱۱] نتایجی که در این مقاله ارائه شده‌اند، توصیف‌کننده تلاش‌های ما برای بهینه‌سازی یک سیستم تحلیلی Semi-nested Multiplex RT-PCR



شکل-۳: Split out RT-PCR. ژل آگارز (۲٪) رنگ‌آمیزی‌شده توسط اتیدیوم برومایـد نشان‌دهنده تکثیر TAL1/SCL، TLX1/HOX11 و TLX3/HOX11L2 انسانی که به‌ترتیب از روی cDNA به‌دست آمده از رده‌های سلولی HBP-ALL، Peer و K562 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی را نشان می‌دهد. ردیف اول نشان دهنده مارکر DNA 100bp، ردیف‌های ۲، ۳، و ۴ به ترتیب نشان دهنده Split out از (۳۷۸) TLX3/HOX11L2 (254bp) TAL1/SCL، (180) TLX1/HOX11 می‌باشند. ردیف ۵ نشان‌دهنده کنترل‌مثبت و ردیف ۶ کنترل‌منفی آزمایش‌می‌باشند.



شکل-۴: نتایج Semi- Nested Multiplex RT-PCR برای تشخیص همزمان انکوژن‌های TLX3/HOX11L2، TLX1/HOX11 و TAL1/SCL. ژل آگارز (۲٪) رنگ‌آمیزی‌شده توسط اتیدیوم برومایـد نشان‌دهنده محصولات Semi-Nested Multiplex RT-PCR حاصل از تکثیر همزمان مرحله دوم آنکوژن‌های (169bp) TAL1/SCL، (149bp) TLX1/HOX11 و (254bp) TLX3/HOX11L2 انسانی به ترتیب به‌دست آمده از روی cDNA مخلوط مساوی از رده‌های‌سلولی HBP-ALL، Peer و K562 با پرایمرهای اختصاصی است. ردیف اول نشان‌دهنده مارکر 50bp DNA، ردیف اول نشان‌دهنده کنترل منفی و ردیف‌های ۲، ۳، و ۴ به‌ترتیب مرحله دوم Semi-Nested Multiplex RT-PCR با غلظت‌های مختلف پرایمرهای اختصاصی شامل غلظت‌های 12pM، 10pM، 5pM و 2.5pM را نشان می‌دهند.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

می‌باشد که شناسایی TLX1/HOX11، TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL را که به‌صورت اختصاصی در رده‌های سلولی Peer، HPB-ALL و K562 بیان می‌شوند را تسهیل می‌کند. این تکنیک می‌تواند ابزار مهمی برای کامل کردن آنالیز سیتوژنتیک در غربالگری بیماران مبتلا به لوسمی حاد باشد و از سوی دیگر می‌تواند یک روش سریع و کارآمد برای تعیین خصوصیات سلول‌های لوسمیک باشد. اگرچه روش معمول کاریوتیپ یکی از مهم‌ترین ابزارها برای شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی در T-ALL است، با این وجود روشی مشکل و وقت‌گیر بوده و labor intensive می‌باشد و در اغلب موارد منجر به نتایج منفی کاذب می‌شود.[۱۲] Pallisgaard، Multiplex RT-PCR را برای شناسایی ۲۹ جابه‌جایی کروموزومی‌و ناهنجاری‌های کروموزومی شامل بیش از ۸۰ واریانت پیرایش با استفاده از هشت PCR موازی به‌کار برده‌اند.[۱۳] در مطالعه دیگری، روش Multiplex RT-PCR برای غربالگری ناهنجاری‌های ژنتیکی مانند MLL/AF4, MLL/ENL بهینه‌سازی شد. نتایج این آزمایشات پیشنهاد کردند که غربالگری مولکولی به‌اندازه سیتوژنتیک موفق بوده است.[۱۴] اخیراً یک مطالعه با استفاده از روش Nested multiplex RT-PCR برای شناسایی ۲۹ رونوشت ترکیبی در بیماران مبتلا به ALL انجام گرفته است. این مطالعه ۱۸۰ مورد ALL را برای ناهنجاری‌های ژنتیکی با استفاده از Nested multiplex RT-PCR و تکنیک‌های سیتوژنتیک مورد بررسی قرار داده است. نتایج مبتنی بر این مطالعه نشان‌دهنده برخی ناهمخوانی‌ها بین یافته‌های متفاوت این روش‌های مختلف است. برخی نسخه‌های ترکیبی مخفی (پنج درصد) نمی‌توانند به‌وسیله کاریوتیپ شناسایی شوند.[۱۵] یکی از مهم‌ترین کاربردهای Multiplex RT-PCR به‌وسیله Henze توصیف شده است. آنها به‌صورت موفقیت‌آمیزی روش Multiplex RT-PCR را برای ۴۳۸ کودک مبتلا به ALL به‌کار بردند. هدف آنها مشخص کردن بازآرایی‌های ژن‌های Ig و TCR به‌عنوان مارکر کلونال و تشخیص Minimal Residual Disease (MRD) بود.[۱۶] برای انجام Semi-nested multiplex RT-PCR جهت تعیین فاکتورهای رونویسی‌کننده TLX3/HOX11L2, TLX1/HOX11 و TAL1/SCL سه جفت پرایمر اختصاصی با دماهای هم سرشته‌سازی تقریباً مساوی و طول متفاوت Ampliconها، طراحی شدند. Multiplex RT-PCR یکی از ارزشمندترین روش‌ها برای غربالگری تعداد زیادی از بیماران مبتلا به ALL به‌صورت همزمان است. برای تایید انجام شدن Multiplex RT-PCR و بررسی روش تشخیص از نظر صحت، نیاز به کنترل‌های مثبت و منفی می‌باشد. در این بررسی ما سه انکوژنی را که مکرراً در T-ALL بیان می‌شوند، با استفاده از رده‌های سلولی لوسمیک که به‌صورت اختصاصی این سه انکوژن را بیان (overexpress) می‌نمایند کلون کردیم. ما یک Multiplex RT-PCR را با استفاده از یک cocktail از سه‌حامل حاصله که دارای قطعاتی‌از cDNA ژن‌های TLX1/HOX11، TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL بودند، انجام دادیم. اگرچه شرایط Multiplex PCR با استفاده از نمونه‌های بالینی می‌تواند متفاوت از Multiplex PCR با استفاده از سیستم cocktail باشد، استفاده از این حامل‌ها می‌تواند کنترل مثبت مناسبی باشد برای محققینی که مایل به استفاده از این سیستم هستند. بر اساس تحقیقات ما، نتایجی که در این‌مقاله ارائه شده‌اند، اولین‌گزارشی هستند که سه فاکتور پیش‌آگهی‌دهنده مهم را در کودکان مبتلا به T-ALL با روش Semi-nested Multiplex RT-PCR شناسایی می‌کنند. RT-PCR برای شناسایی هر mRNA کد کننده فاکتور رونویسی انکوژن در ALL وقت‌گیر، وابسته به‌مواد و تقریباً امکان‌پذیر نیست. در حال حاضر Multiplex RT-PCR مطمئن‌ترین و تکرارشونده‌ترین تکنیک برای تشخیص آسان و کم‌هزینه و سریع در بیماران سرطانی می‌باشد.

References

1. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* 1988; 42: 511-20.
2. Gottardo NG, Jacoby PA, Sather HN, Reaman GH, Baker DL, Kees UR. Significance of HOX11L2/TLX3 expression in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on Children's Cancer Group protocols. *Leukemia* 2005; 19: 1705-8.
3. Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* 2002; 324: 283-7.
4. Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature* 1994; 368: 747-9.
5. Dear TN, Colledge WH, Carlton MB, Lavenir I, Larson T, Smith AJ, et al. The Hox11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development* 1995; 121: 2909-15.
6. Salvati PD, Ranford PR, Ford J, Kees UR. HOX11 expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with T-cell phenotype. *Oncogene* 1995; 11: 1333-8.
7. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75-87.
8. Su XY, Della-Valle V, Andre-Schmutz I, Lemercier C, Radford-Weiss I, Ballerini P, et al. HOX11L2/TLX3 is transcriptionally activated through T-cell regulatory elements downstream of BCL11B as a result of the t(5;14)(q35;q32). *Blood* 2006; 108: 4198-201.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

9. Masson N, Greene WK, Rabbitts TH. Optimal activation of an endogenous gene by HOX11 requires the NH2-terminal 50 amino acids. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3502-8.
10. Alizadeh A, Eisen M, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Probing lymphocyte biology by genomic-scale gene expression analysis. *J Clin Immunol* 1998; 18: 373-9.
11. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3616-22.
12. Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10128-32.
13. Pallisgaard N, Hokland P, Riishøj DC, Pedersen B, Jørgensen P. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 574-88.
14. Elia L, Mancini M, Moleti L, Meloni G, Buffolino S, Krampera M, et al. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 275-9.
15. Meyer-Monard S, Parlier V, Passweg J, Mühlematter D, Hess U, Bargetzi M, et al. Combination of broad molecular screening and cytogenetic analysis for genetic risk assignment and diagnosis in patients with acute leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 247-53.
16. Seeger K, Taube T, Eckert C, Hanel C, Pogodda M, Henze G. Unusual T-cell receptor-delta gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukaemia by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2001; 113: 318-22.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 1, Apr 2009: 42-48

Screening of prognostic factors using multiplex RT-PCR technique on different leukemic cell lines

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 5:38 IRST on Wednesday November 22nd 2017

Ahani R.
Derakhshandeh Peykar P.
Raoofian R.
Heidari M.*

Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences

Received: August 11, 2008 Accepted: December 20, 2008

Abstract

Background: Leukemia is one of the most common pediatric malignancies. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) accounts for 15% of hematopoetic cancers. It has been well understood that identification of genetic alterations associated with leukemias is very critical. The molecular genetic techniques have promoted the identification of leukemia-associated genetic changes that may characterize the most accurate predictors of clinical outcome. These considerations reinforce the requirement for rapid identification of the abnormalities.

Methods: Multiplex RT-PCR, a highly sensitive and specific method applied to screen simultaneously three most frequent transcription factors, *TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2* and *TAL1/SCL* which are associated with T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL).

Results: We describe here our efforts to establish a multiplex RT-PCR analysis system that facilitates the detection of these transcription factors which are specifically expressed in Peer, HPB-ALL and K562 cell lines, respectively.

Conclusion: The multiplex RT-PCR technique is a sensitive, valuable and cost-effective diagnostic tool which could improve our ability to accurately and rapidly risk-stratification of patients with childhood T-ALL. In order to perform multiplex RT-PCR technique researchers do not need bone marrow samples and they can employ this method using peripheral blood samples. Therefore, the status of treatment could be followed by assessment of the level of mRNA expression of oncogenic transcriptional factor using peripheral blood sample. Use of this procedure not only provides the best results in short term for specialist, but also clinicians could have opportunities to choose suitable treatment strategies with decrement of drug side effects.

Keywords: Multiplex RT-PCR, T-ALL, oncogene, leukemia, cell.

* Corresponding author: Dept. of Medical Genetics, Tehran University of Medical Sciences, Poursina Ave., Ghods St., Keshavarz Blvd., Tehran, IRAN
Tel: +98-21-88953005
email: mheidari@sina.tums.ac.ir