

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

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 پیشگویی‌کننده دقیق نتایج بالینی باشد. این ملاحظات بر نیاز اساسی برای به‌کارگیری یک روش شناسایی سریع تغییرات ژنتیکی در این ناهنجاری‌ها تاکید می‌کند. **روش بررسی:** در این مطالعه سیستم Multiplex (RT-PCR) Reverse Transcription برای غربالگری سه فاکتور رونویسی سرطان‌زا با نام‌های TLX3/HOX11L2, TLX1/HOX11 و 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 لوسمی 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.

روشنک آهني
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

مقدمه

شدیدی به‌همراه دارد. شایع‌ترین اهداف جابه‌جایی‌های کروموزومی در ALL، ژن‌های کدکننده فاکتورهای رونویسی از قبیل TLX1/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.^۱ 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

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 پیش‌آگهی دهنده 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

کردن هموژنیزه شد. سپس تیوب به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از اضافه کردن ۲۰۰ μl کلروفرم، در دمای اتاق انکوبه و سپس در ۱۲۰۰۰xg به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ گردیدند. در این مرحله سه فاز تشکیل شده و فاز مایع رویی که حاوی RNA است به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید. به منظور رسوب دادن RNA ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و نمونه به مدت 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 به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵°C قرار داده شد. RNA استخراج شده را به وسیله اسپکتروفتو-متر از نظر کمی اندازه‌گیری و در ۷۰°C تا زمان استفاده نگهداری شد. RT-PCR: برای ساختن cDNA، ۱ μg از RNA تا ۰/۲ μg از رندوم پرایمر ۱۱ μl از آب دوبار تقطیر، ۴۰ μl مهارکننده ریبونوکلاز و ۰/۵mM dNTP به مدت 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 به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲°C درجه انکوبه و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C و cDNA تا زمان مورد نیاز در ۷۰°C 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 به وسیله برنامه Blast چک شدند. این پرایمرها به گونه‌ای انتخاب شدند که شرایط تقریباً یکسانی برای Multiplex RT-PCR 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

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) نه تنها 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 و 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 انستیتویاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت RPMI 1640 که با ده درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۰/۰۳ درصد L-Glutamin (Roche-Germany) و یک درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Roche-Germany) تکمیل شده بود در دمای ۳۷°C و CO₂ 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 به مدت ۲۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. ۱ml از Tripure به رسوب سلولی اضافه و به‌وسیله پیپت

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 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 TLX1/HOX11 و TLX3/HOX11L2 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 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 ذکر شده، سه جفت پرایمر طراحی

Split out RT- آنها را بیان می‌کردند، آزمایش شدند. این آزمایش به 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: چرخه‌های حرارتی 95°C به پنج دقیقه یک سیکل، 95°C درجه سانتی‌گراد 30°C به مدت 30°C ثانیه و 72°C درجه سانتی‌گراد 40°C ثانیه و طی 30°C سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی هفت دقیقه.

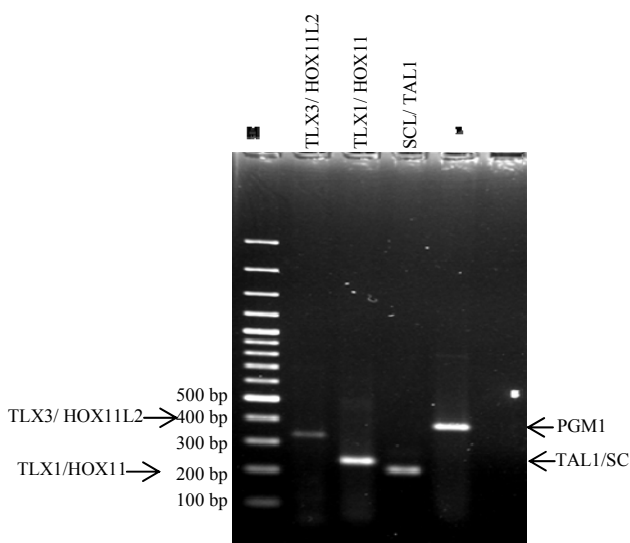
TA Cloning: ژن‌های TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL بعد از تکثیر به‌روش RT-PCR و خالص‌سازی از ژل آگاروز با استفاده از کیت TA-Cloning (Fermentas, Litvania) و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

یافته‌ها

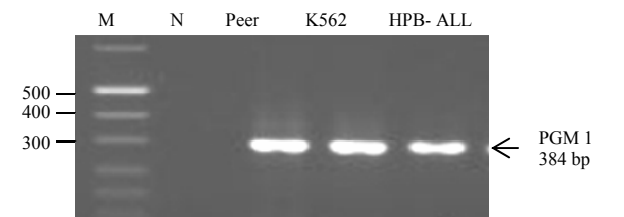
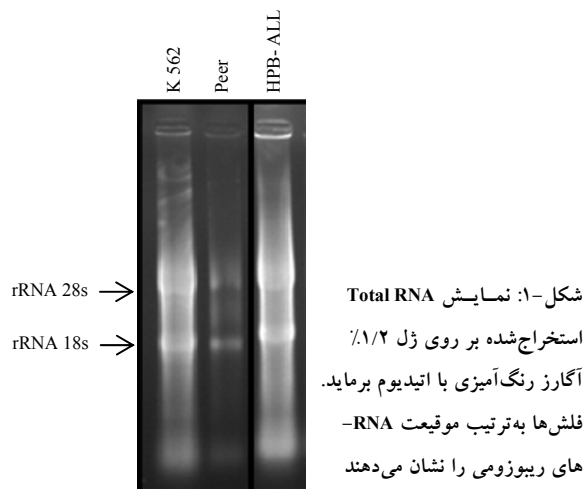
برای انجام این پروژه سلول‌های مورد مطالعه طبق توضیحاتی که در بخش مواد و روش‌ها ذکر گردید RNA تام استخراج گردید. شکل ۱ نمایش Total RNA استخراج شده را نشان می‌دهند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بعد از ساخت cDNA کیفیت و صحت آن به‌وسیله پرایمرهای خاص ژن PGM به‌وسیله RT-PCR آزمایش گردید. غربالگری رده‌های سلولی لوسمیک برای بیان ژن‌های TLX1/HOX11 و 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 بررسی کردیم. غربالگری رده سلولی Peer برای بیان ژن TLX1/HOX11: شرایط برای تشخیص TLX1/HOX11 بهینه شد و قسمتی از ناحیه کد کننده

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

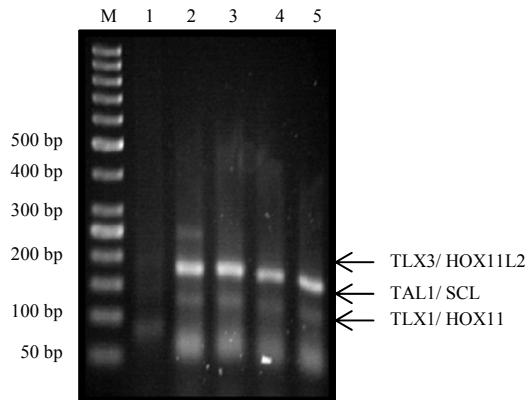
پرایمر	فاکتور ترانسکریپشن انکوژنی	پرایمرهای راند اول	پرایمرهای راند دوم
TLX3F TLX3R1 TLX3R2	TLX3/HOX11L2	5'-CAGTGTGAACCTGAGCCTAGC-3' 5'-CGTGCGGGCTTCTTAC-3'	5'-CAGTGTGAACCTGAGCCTAGC-3'
TAL1F TAL1R1 TAL1R2	TAL1/SCL	5'-CATGGTGCAGCTGAGTCTC-3' 5'-GGGGAAGTCTCCTTTCAC-3'	5'-CGATGGAAGCGCTTTTCCA-3' 5'-CATGGTGCAGCTGAGTCTC-3'
HOF HOR1 HOR2	TLX1/HOX11	5'-TCCCCTGGATGGAGAGTAAC-3' 5'-AGGTACTTCTGGCGGTGGA-3'	5'-CCGGCTGTGGTGAAGATAC-3' 5'-TCCCCTGGATGGAGAGTAAC-3'
PGMF PGMR	PGM1	5'-GCCCGCAGGTCCTTTCCTCACA-3' 5'-TCCGACTGAGCGGCACTGGGAGTGC-3'	5'-GCATCGGTCATTTGAGC-3'



شکل-۳: Split out RT-PCR. ژل آگارز (۲٪) رنگ آمیزی شده توسط اتیدیوم بروماید نشان دهنده تکثیر *TAL1/SCL*، *TLX1/HOX11* و *TLX3/HOX11L2* انسانی که به ترتیب از روی cDNA به دست آمده از رده های سلولی *HPB-ALL*، *Peer* و *K562* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی را نشان می دهد. ردیف اول نشان دهنده مارکر DNA 100bp، ردیف های ۲، ۳، و ۴ به ترتیب نشان دهنده Split out از *TLX3/HOX11L2* (۳۲8)، *TAL1/SCL*(254bp) و *TLX1/HOX11* (180) می باشند. ردیف ۵ نشان دهنده کنترل مثبت و ردیف ۶ کنترل منفی آزمایش می باشند.



شکل-۲: ژل آگارز (۲٪) رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید نشان دهنده 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 PGM1 چهار رده سلولی *Peer* و *k562* و *HPB-ALL* را نشان داده است. باندهای مربوط به اندازه قطعه DNA تکثیر یافته PGM1 نشان داده شده اند.



شکل-۴: نتایج Semi- Nested Multiplex RT-PCR برای تشخیص همزمان آنکوژن های *TLX3/HOX11L2*، *TLX1/HOX11* و *TAL1/SCL*. ژل آگارز (۲٪) رنگ آمیزی شده توسط اتیدیوم بروماید نشان دهنده محصولات Semi-Nested Multiplex RT-PCR حاصل از تکثیر همزمان مرحله دوم آنکوژن های (169bp) *TAL1/SCL*، *TLX1/HOX11* (149bp) و *TLX3/HOX11L2* (254bp) انسانی به ترتیب به دست آمده از روی مخلوط مساوی از رده های سلولی *HPB-ALL*، *Peer* و *K562* با پرایمرهای اختصاصی است. ردیف اول نشان دهنده مارکر 50bp DNA، ردیف اول نشان دهنده کنترل منفی و ردیف های ۲، ۳، و ۴ به ترتیب مرحله دوم Semi-Nested Multiplex RT-PCR با غلظت های مختلف پرایمرهای اختصاصی شامل غلظت های 2.5pM، 5pM، 10pM، 12pM را نشان می دهند.

شد که دمای هم سرشته سازی آنها تقریباً مساوی بود و در عین حال Amplicon هایی با طول های متفاوت ایجاد می کردند. محصولات PCR با اندازه متفاوتشان بر روی ژل آگارز قابل تشخیص بودند (شکل ۴).

بحث

شناسایی جابه جایی های کروموزومی خاص یک ابزار کلیدی برای تشخیص و طبقه بندی کردن ریسک و پروگنوز در کودکان مبتلا به T-ALL است. روش های درمانی کنونی از روش های مختلف با شدت های متفاوت بر اساس گروه ریسک، به بهبود نرخ زندگی بچه های مبتلا به T-ALL تا حدود ۸۰٪ در برخی از مراکز کمک کرده اند.^{۱۱} نتایجی که در این مقاله ارائه شده اند، توصیف کننده تلاش های ما برای بهینه سازی یک سیستم تحلیلی Semi-nested Multiplex RT-PCR

هدف آنها مشخص کردن بازآرایی‌های ژن‌های TCR و Ig 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 Amplicon، 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 قطعاتی از cDNA ژن‌های TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2 و TAL1/SCL بودند، انجام دادیم. اگرچه شرایط Multiplex PCR با استفاده از نمونه‌های بالینی می‌تواند متفاوت از این 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 این مقاله ارائه شده‌اند، اولین گزارشی هستند که سه فاکتور پیش‌آگهی-دهنده مهم را در کودکان مبتلا به T-ALL با روش Semi-nested Multiplex RT-PCR شناسایی می‌کنند. RT-PCR برای شناسایی هر mRNA کدکننده 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.

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 کاربوتیپ 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.^{۱۱} Pallisgaard, Multiplex RT-PCR را برای شناسایی ۲۹ جابه‌جایی کروموزومی و 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 بهینه-سازی 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 ناهنجاری‌ها بین یافته‌های متفاوت این روش‌های مختلف است. برخی نسخه‌های ترکیبی مخفی (پنج درصد) نمی‌توانند به‌وسیله کاربوتیپ 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.

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.

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.

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

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

Abstract

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

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

Background: Leukemia is one of the most common pediatric malignancies. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) accounts for 15% of hematopoietic 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 *TALI/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