

## تشخیص و بررسی فراوانی جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد

وحید پاژخ<sup>۱</sup>، دکتر فرهاد ذاکر<sup>۲</sup>، دکتر کامران علی مقدم<sup>۳</sup>، فرزانه آتش‌رزم<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

NPM1/نوکلئوسومین B23، یک فسفوپروتئین با میزان بیان بالا در سلول‌های در حال تکثیر است. بیماران AML با NPM1 به شکل شایعی دارای جهش‌های FLT3 ITD می‌باشند. هدف این تحقیق بررسی میزان فراوانی جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD در بیماران AML ایرانی و ارتباط این جهش‌ها با زیر گروه‌های AML در طبقه‌بندی FAB بود.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی مقطعی بود. نمونه‌های مغز استخوان یا خون محیطی ۱۳۱ بیمار AML به روش تصادفی جمع‌آوری و DNA آن‌ها استخراج شد. سپس قطعه مورد نظر از ژن NPM1 با آغازگرهای اختصاصی PCR شد و محصولات PCR با روش CSGE الکتروفورز شدند. نمونه‌های غربال شده برای تایید حضور جهش‌های NPM1 تعیین توالی شدند. برای بررسی میزان همبستگی در وقوع هم‌زمان جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD، از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

#### یافته‌ها

۲۳ مورد از ۱۳۱ بیمار (۱۷/۵۵٪، ۰/۲۴۴ - ۰/۱۰۷ = CI ۹۵٪) دارای جهش NPM1 شناخته شدند. بیشترین میزان وقوع این جهش‌ها در ساب تایپ‌های M4 (۳۰/۴٪)، M3 (۲۱/۷٪) و M5 (۱۳/۰۴٪) دیده شد. هم‌چنین ۲۱ نمونه (۱۶/۰۳٪، ۰/۲۲۹ - ۰/۰۹۲ = CI ۹۵٪) دارای جهش FLT3 ITD بودند که از این تعداد، ۸ نمونه دارای جهش NPM1 و ۱۳ نمونه دیگر فاقد جهش NPM1 بودند.

#### نتیجه‌گیری

جهش‌های ژن NPM1 فراوانی بالایی در زیر گروه‌های منوسیتی (M4، M5) دارند. وقوع این جهش‌ها در زیر گروه M3، هم‌چنین فراوانی بالای آلل جهش یافته D در همه زیر گروه‌ها و نیز میزان همراهی بالا در وقوع هم‌زمان جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD، از نکات جالب توجه این مطالعه‌اند (p=۰/۰۱۲).

**کلمات کلیدی:** لوسمی میلوئیدی حاد، PCR، ژل الکتروفورز

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۱۷

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشگاه علوم پزشکی ایران
- ۲- مؤلف مسؤل: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و مرکز انکوپاتولوژی - صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵
- ۳- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی
- ۴- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشگاه علوم پزشکی ایران

**مقدمه**

در سال‌های اخیر گسترش آنالیزهای مولکولی، شاخص‌های نوین و ارزشمندی برای تشخیص AML فراهم آورده‌اند. تضاعف‌های متوالی داخلی (ITD: Internal tandem duplication) در ژن FLT3 (fms-like tyrosine kinase-3) PTD (Parital tandem duplication)، در ژن MLL (Mixed Lineage Leukemia) و نیز بیان افزایش یافته فاکتور نسخه‌برداری (Ectopic virus integration site1)، همگی بیانگر پیش‌آگهی ضعیف هستند (۵-۱). در مقایسه، جهش در فاکتور نسخه‌برداری CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ )، با پاسخ مطلوب به درمان همراه بوده است (۶، ۷).

با روش‌های متداول کاریوتایپینگ، هیچ اختلال کروموزومی در ۴۰٪-۵۰٪ از بیماران AML قابل مشاهده نیست و تمایز بین زیر گروه‌های مختلف پروگنوستیک در این گروه از بیماران، با توجه به رویکردهای ژنتیک مولکولی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۹، ۸، ۴) در حال حاضر اکثر این موارد در طبقه‌بندی WHO تحت عنوان AML not otherwise characterized معرفی می‌گردند (۱۱).

در مطالعه اخیر فالینی، جهش‌های آگزون ۱۲ ژن کدکننده پروتئین NPM1 در موقعیت کروموزومی 5q35، در ۳۵٪ از موارد Primary AML با بروز گسترده در کل زیر گروه‌های مورفولوژیک AML (بیشترین فراوانی در لوسمی‌های منوسیتیک)، فقدان مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز مثل CD34 و CD133، کاریوتایپ طبیعی و پاسخ‌دهی به شیمی‌درمانی دیده شده است (۱۰). چندین مطالعه تحقیقاتی نشان داده‌اند که جهش‌های NPM1، معرف یک مارکر پیش‌آگهی‌دهنده مستقل در بیماران جوان‌تر، به‌خصوص بدون ناهنجاری‌های سیتوژنتیک‌اند (۱۱).

NPM1/نوکلئوسمین/B23، یک فسفوپروتئین با میزان بیان بالا در سلول‌های در حال تکثیر و عضوی از خانواده پروتئینی نوکلئوپلاسمین (NPM) است که در حالت طبیعی عمدتاً در هستک لوکالیزه می‌شود (۱۳، ۱۲). فراوانی بالای جهش‌های NPM1 در موارد AML با کاریوتایپ طبیعی و

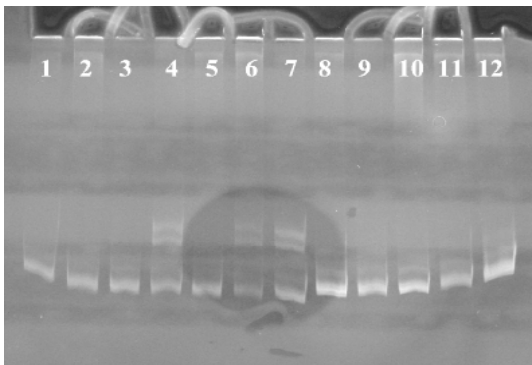
این حقیقت که NPM1 سیتوپلاسمیک (NPM1c) قادر به انجام عملکرد طبیعی خود، یعنی اتصال به پروتئین‌ها و انتقال آن‌ها نیست، منجر به شکل‌گیری این ایده شده که جهش در NPM1 می‌تواند یک رخداد اولیه در پدیده لوکموژن باشد (۱۴). چندین عملکرد برای پروتئین NPM1 شامل اتصال به اسیدهای نوکلئیک، تنظیم دوپلیکاسیون سنتوزوم و نیز عملکرد ریبوزومال توصیف شده‌اند (۱۷-۱۴). علاوه بر این، NPM1 به چندین پروتئین شامل p53 و هم‌چنین پروتئین‌هایی که با p53 واکنش داشته و آن را تنظیم می‌کنند [مثل Rb (رتینوبلاستوما)، P19<sup>ARF</sup> و HDM<sub>2</sub>] متصل می‌شود (۲۰-۱۸). لذا به نظر می‌رسد جهش‌های NPM1 منجر به کسب تغییرات ژنتیکی اضافی توسط سلول‌های لوسمیک AML گردند (۲۱).

از طرفی FLT3 یک گیرنده تیروزین کینازی است که نقش مهمی در حیات و تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز دارد. افزایش بیان و موتاسیون‌های فعال‌کننده این گیرنده، در پاتوفیزیولوژی چندین نوع از سلول‌های سرطانی دخالت دارند. تضاعف‌های داخلی متوالی در ژن FLT3 در حدود ۲۰٪ موارد AML و ۵٪ از سندرم‌های دیسپلاستیک دیده می‌شوند (۲۲). مطالعه‌های پیشین در ایران حاکی از فراوانی ۱۸٪ این جهش‌ها در بیماران AML ایرانی و به‌خصوص زیرگروه M3 است (۲۳).

اهداف این تحقیق، بررسی میزان وقوع جهش‌های ژن NPM1 در بیماران AML ایرانی، میزان همراهی جهش‌های ژن FLT3 ITD با جهش‌های ژن NPM1، ارتباط این جهش‌ها با زیرگروه‌های AML در طبقه‌بندی FAB و نیز بررسی توالی آلل‌های جهش‌یافته ژن NPM1 می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

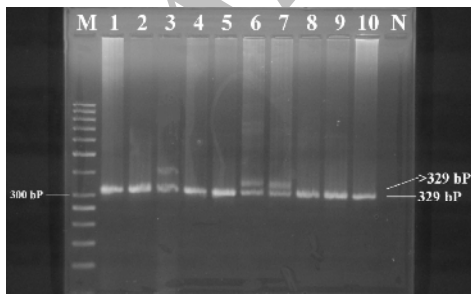
مطالعه انجام شده از نوع توصیفی مقطعی بود. به منظور ارزیابی جهش‌های ژن NPM1، نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان ۱۳۱ بیمار لوسمی میلوئیدی حاد (AML) با زیر گروه‌های مختلف و به صورت تصادفی با پراکندگی طبیعی از مرکز فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران، آزمایشگاه پاتوبیولوژی تخت طاووس و بیمارستان دکتر شریعتی تهران تهیه شد تا جهت استخراج DNA و بررسی



شکل ۱: نمونه های AML دارای ژن NPM1 جهش یافته در ژل CSGE (در نمونه های ۴، ۶ و ۷ باندهای مربوط به هترو دوپلکس مشاهده می شود)

محصولات PCR نمونه های غربال شده در روش CSGE پس از تخلیص به روش استاندارد (AccuPrep® PCR Purification Kit، بایونیر، کره) به همراه آغازگرهای جلو برنده (forward) و معکوس (reverse) به منظور تعیین توالی به شرکت لایبز - فرانسه ارسال شدند. روش تعیین توالی dideoxy chain termination و مدل دستگاه مربوطه 730XL DNA analyzer بود.

هم چنین تمامی نمونه ها با استفاده از آغازگرهای FLT3 ITD- F (5'- GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC- 3') و FLT3 ITD- R (5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC-3') PCR، در ناحیه ژن FLT3 شده و محصولات PCR آن ها به منظور غربال جهش های



شکل ۲: نمونه های AML دارای جهش FLT3 ITD در ژل آگارز ۲/۵٪

باند انتهایی مربوط به قطعه 329bp (آل wild type) و باند فوقانی در نمونه های ۷، ۶ و ۳ مربوط به قطعه بزرگ تر از 329bp است که بسته به میزان تکرار متوالی داخلی (internal tandem duplications) در ژن FLT3 از سه تا صد ها نوکلئوتید متغیر است.

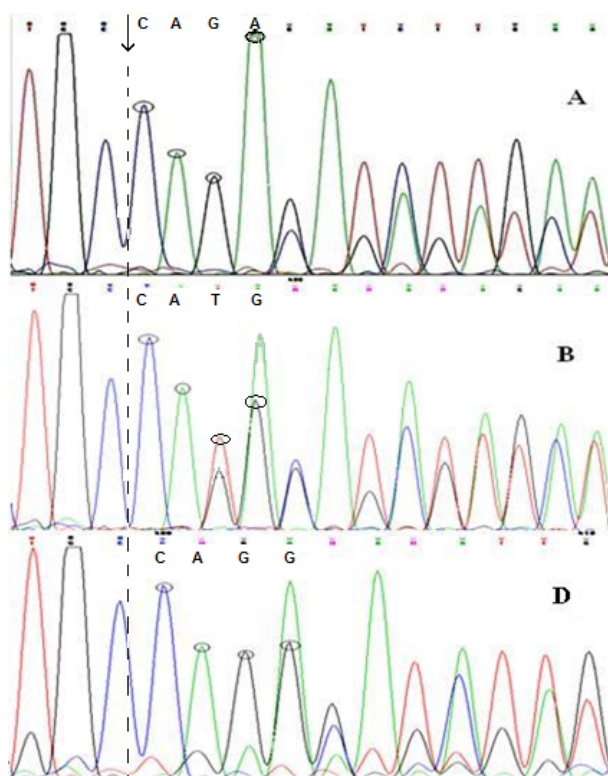
بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

نمونه های مذکور عمدتاً مغز استخوان (BM) و در تعداد محدودی از موارد خون محیطی (PB) بیماران مبتلا بود که پیش از آغاز شیمی درمانی، از بیماران جمع آوری شد. تشخیص موارد AML با توجه به مورفولوژی، سیتوشیمی و نیز بررسی ایمونوفنوتایپینگ توسط فلوسایتومتری انجام و بر اساس زیرگروه های طبقه بندی گروه FAB گزارش شدند. به منظور استخراج DNA این بیماران، از روش دستی فنل - کلروفرم استفاده گردید.

سپس اگزون ۱۲ ژن NPM1 با استفاده از آغازگرهای NPM1-F (5'- TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA -3') و NPM1-R (5'- CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC -3')، چنانچه در مطالعه های قبلی بیان شده بود، PCR شد (۱۰). حجم کلی واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر و شامل حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، dNTPs هر کدام ۰/۲ میکرومول، ۱/۵ میلی مول  $MgCl_2$ ، واحد Prime Taq polymerase و Reaction buffer (ژنت بایو - کره) و  $ddH_2O$  تعیین شد. نمونه ها مطابق برنامه زیر PCR شدند، ۵ دقیقه  $95^{\circ}C$ ، ۴۰ سیکل (۳۰ ثانیه  $94^{\circ}C$ ، ۱ دقیقه  $55^{\circ}C$ ، ۱ دقیقه  $72^{\circ}C$ ). پس از انجام PCR، برای اطمینان از تکثیر شدن قطعه مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲٪، به همراه مارکر مناسب الکتروفورز شدند (۲۴).

قطعه تکثیر شده همان طور که با رجوع به اطلاعات بانک جهانی انتظار می رفت، طولی معادل ۵۶۰ bp داشت. سپس نمونه ها در برنامه CSGE به شکل زیر قرار گرفتند: ۵ دقیقه  $95^{\circ}C$  (دناچوریشن)، ۳۰ دقیقه  $65^{\circ}C$  (آنیلینگ). هم چنین به منظور شناسایی نمونه های احتمالی حامل جهش هموزیگوت در CSGE، نمونه ها به صورت دو به دو نیز مخلوط و در برنامه CSGE قرار گرفتند. در مرحله بعد همه محصولات روی ژل ۱۰٪ CSGE در ولتاژ ۳۵۰ ولت به مدت چهار ساعت الکتروفورز شدند (۲۵). در نهایت ژل CSGE با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و زیر نور UV نمونه های دارای جهش که تشکیل هترو دوپلکس داده و در نتیجه باند الکتروفوریتیک متمایز داشتند، غربال شدند (شکل ۱).

گزارش شده بودند. از ۲۳ نمونه دارای ژن NPM1 جهش یافته، ۸ مورد (۳۴/۷۸٪) دارای جهش FLT3 ITD بودند، در حالی که از ۱۰۸ نمونه بدون جهش در ژن NPM1 تنها ۱۳ مورد (۱۲/۰۳٪) دارای جهش FLT3 ITD بودند (جدول ۲).



شکل ۳: نتایج تعیین توالی در بیماران AML غربال شده دارای جهش NPM1

- A: توالی بیماری با آلل جهش یافته A  
B: توالی بیماری با آلل جهش یافته B  
D: توالی بیماری با آلل جهش یافته D

جدول ۱: نوکلئوتیدهای تغییر یافته در موارد جهش‌های اگزون ۱۲ ژن NPM1

A	A	G	T	T	C	T	A	G	A	G	A	C	C	G	T	آلل طبیعی
T	C	T	A	G	A	G	A	C	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	C	G	T	آلل جهش یافته A
T	C	T	A	G	A	G	A	C	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	C	G	T	آلل جهش یافته B
T	C	T	A	G	A	G	A	C	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	C	G	T	آلل جهش یافته D

FLT3 ITD روی ژل آگارز ۲/۵٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند (۲۶). در نهایت ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و زیر نور UV از آن عکس‌برداری شد (شکل ۲).

برای بررسی میزان همبستگی در وقوع هم زمان جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD، از آزمون آماری Fisher's Exact Test استفاده شد.

#### یافته‌ها

تعداد ۲۳ مورد از ۱۳۱ بیمار (۱۷/۵۵٪) (۰/۲۴۴ - ۰/۱۰۷ = CI ۹۵٪) دارای جهش در ژن NPM1 شناخته و حضور جهش‌ها در نتایج تعیین توالی تأیید شدند. نتایج این تحقیق از وقوع جهش‌های NPM1 در اکثر زیر گروه‌های FAB حکایت دارد. از ۲۳ مورد جهش یافت شده در بیماران AML، یک مورد M0 (۴/۳۴٪)، یک مورد M2 (۴/۳۴٪)، چهار مورد M3 (۱۷/۴٪)، یک مورد M3v (۴/۳۴٪)، هفت مورد M4 (۳۰/۴٪)، سه مورد M5 (۱۳/۰۴٪)، یک مورد M6 (۴/۳۴٪) و پنج مورد هم بنا به اطلاعات به دست آمده Non M3 AMLs (۲۱/۷٪) گزارش شدند. در زیرگروه‌های M1 و M7 هیچ جهشی یافت نشد (جدول ۲). در میان ۲۳ بیمار دارای ژن NPM1 جهش‌یافته، ۱۴ مورد دارای آلل جهش یافته A (۶۰/۸٪)، پنج مورد دارای آلل جهش یافته D (۲۱/۷٪) و چهار بیمار دارای آلل جهش یافته B (۱۷/۴٪) بودند (شکل ۳ و جدول ۱).

هم چنین از ۱۳۱ نمونه، ۲۱ عدد (۱۶/۰۳٪) (۰/۲۲۹ - ۰/۰۹۲ = CI ۹۵٪) دارای جهش FLT3 ITD بودند که از این تعداد ۱ مورد M1 (۴/۷۶٪)، ۲ مورد M2 (۹/۵۲٪)، ۶ مورد M3 (۲۸/۵۷٪)، ۱ مورد M3v (۴/۷۶٪)، ۵ مورد M4 (۲۳/۸٪)، ۱ مورد M6 (۴/۷۶٪) و ۵ مورد Non M3 (۲۳/۸٪)

جدول ۲: توزیع بیماران AML بر اساس طبقه‌بندی FAB و فراوانی جهش‌های NPM1 و FLT3 ITD در آن‌ها

طبقه‌بندی FAB	تعداد نمونه‌ها (%)	نمونه‌های با جهش NPM1 (%)	نمونه‌های با جهش FLT3 ITD (%)	NPM1 + / FLT3 + ITD (%)
M0	۳ (۲/۲)	۱ (۴/۳۴)	۰	۰
M1	۹ (۶/۸۷)	۰	۱ (۴/۷۶)	۰
M2	۲۶ (۱۹/۸۴)	۱ (۴/۳۴)	۲ (۹/۵۲)	۰
M3	۳۰ (۲۲/۹)	۴ (۱۷/۴)	۶ (۲۸/۵۷)	۲ (۲۵)
M3v	۱ (۰/۷۶)	۱ (۴/۳۴)	۱ (۴/۷۶)	۰
M4	۲۹ (۲۲/۱۳)	۷ (۳۰/۴)	۵ (۲۳/۸)	۳ (۳۷/۵)
M5	۸ (۶/۱)	۳ (۱۳/۰۴)	۰	۱ (۱۲/۵)
M6	۱ (۰/۷۶)	۱ (۴/۳۴)	۱ (۴/۷۶)	۰
M7	۱ (۰/۷۶)	۰	۰	۰
Non M3	۲۳ (۱۷/۵۵)	۵ (۲۱/۷)	۵ (۲۳/۸)	۲ (۲۵)
Total	۱۳۱	۲۳	۲۱	۸

### بحث

کاریوتایپ نرمال، ۴ مورد دارای جهش در NPM1 بودند (۱۴/۳٪) (۲۹). البته نتایج دیگری نیز در این باب به دست آمده‌اند (مثلاً ۲۴/۹٪ در کل موارد AML، ۷۴/۳٪ در NK-AML و یا ۵۲/۹٪ در NK-AML) که به طور کلی نشان می‌دهد علی‌رغم اختلافات نسبی در فراوانی این جهش، همه مطالعه‌ها بر فراوانی بسیار بالاتر این جهش در موارد AML با کاریوتایپ نرمال حکایت دارند (۳۱، ۳۰، ۱۱).

در مطالعه حاضر جهش‌های ژن NPM1 در ۲۳ مورد از ۱۳۱ نمونه AML مورد آزمایش دیده شدند که معادل حدود ۱۷/۵۵٪ کل بیماران است. البته با توجه به عدم دسترسی به اطلاعات کاریوتایپ بیماران، نتیجه‌گیری در مورد فراوانی این جهش‌ها در موارد AML با کاریوتایپ نرمال یا غیر طبیعی ممکن نیست.

از نظر فراوانی در زیر گروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB، در مطالعه فالینی و همکاران این جهش‌ها در همه زیر گروه‌ها به جز M3، M4Eo و M7 دیده شدند (۱۰). بیشترین فراوانی مربوط به زیرگروه M5b (۸۷٪) و کمترین مربوط به M0 (۱۳/۶٪) بوده است. در مطالعه ورهاک و همکاران، بر شیوع بالا در زیر گروه M5 و M6 و مشاهده در سایر زیرگروه‌ها من جمله M3 تأکید شده ولی هیچ موردی در زیر گروه M0 گزارش نشده است (۱۴). هم

جهش‌های NPM1 به دلیل فراوانی بالایی که در بیماران AML دارند، حایز اهمیت هستند. تاکنون روش‌های مختلف و متنوعی برای غربالگری و بررسی جهش‌های ژن NPM1 از جمله استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال و روش ایمونوهیستوشیمی یا روش DHPLC (Denaturing High Performance Chromatography) توصیف شده‌اند (۲۷، ۱۰). در تحقیق حاضر با توجه به ارزان و در دسترس بودن روش CSGE (Conformation - Sensitive Gel Electrophoresis)، هم چنین حساسیت کافی و نیز این که هیچ گزارشی مبنی بر غربالگری جهش‌های ژن NPM1 توسط این روش موجود نیست، از این روش غربالگری استفاده شد.

در مطالعه فالینی و همکاران، از کل نمونه‌های AML مورد مطالعه، ۳۸٪ کاریوتایپ نرمال داشتند که از این تعداد ۶۱/۷٪ آن‌ها از نظر جهش‌های ژن NPM1 مثبت گزارش شدند. فراوانی کلی این جهش‌ها در کل موارد AML در این مطالعه ۳۵/۲٪ بوده است (۱۰).

در مطالعه تیده و همکاران نیز فراوانی این جهش‌ها در کل موارد AML، ۲۷/۴٪ گزارش شده است (۲۸). در تحقیقات ژانگ و همکاران، از ۲۸ بیمار primary AML با

جهش‌های FLT3 ITD در بیماران NPM1c+AML، دو برابر بیشتر از بیماران NPM1c-AML دیده شدند که بیانگر ارتباط مکانیسمی بین جهش‌های FLT3 و NPM1 است. در مطالعه حاضر همراهی بسیار زیادی بین جهش در ژن‌های FLT3 ITD و NPM1 دیده شد، به طوری که جهش‌های FLT3 ITD در موارد AML همراه با ژن NPM1 جهش یافته (۳۴/۷۸٪)، سه برابر بیشتر از موارد AML بدون جهش در NPM1 (۱۲/۰۳٪) رخ داده‌اند (۰/۱۲). (p=)

### نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج این مطالعه حاکی از فراوانی بالای جهش در ژن‌های FLT3 ITD و NPM1 در بیماران AML ایرانی و همراهی بسیار زیاد این جهش‌ها می‌باشد. وفور این جهش‌ها در زیر گروه M3، هم چنین فراوانی بالای آلل جهش یافته D در همه زیر گروه‌ها و نیز میزان همبستگی بالا در وقوع جهش‌های FLT3 ITD و NPM1 به طور هم زمان از نکات جالب توجه این مطالعه‌اند. هم چنین روش ساده، ارزان و در دسترس CSGE، برای غربال موارد AML دارای ژن NPM1 جهش یافته مناسب به نظر می‌رسد. لزوم انجام مطالعه‌های بیشتر و بررسی ارتباط وضعیت این جهش‌ها در بیماران AML و شرایط بالینی آن‌ها در جمعیت ایرانی کاملاً احساس می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاران گروه هماتولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، هم چنین بخش خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی تهران و بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران و همکاران آزمایشگاه پاتوبیولوژی تخت طاووس تشکر و قدردانی می‌نمایند.

چنین در مطالعه دونر و همکاران، بیشترین فراوانی در زیرگروه‌های M4 و M5 گزارش شده است (۲۴٪). تیده و همکاران این جهش‌ها را عمدتاً در بیماران M5a , M2 و M5b و به مقدار کمتر در M0 , M4Eo , M6 و M7 و هیچ موردی در زیر گروه M3 گزارش نکرده‌اند (۲۸٪). جالب این که در مطالعه‌های سوزوکی و همکاران نیز هیچ مورد جهش NPM1 در زیرگروه M3 یافت نشده است (۳۰٪).

از نکات جالب توجه این نتایج، فراوانی بالای این جهش‌ها در زیرگروه M3 (۱۷/۴٪) است که در اکثر مطالعه‌های پیشین فراوانی پایین یا صفر گزارش شده است. ولی وقوع بیشترین فراوانی این جهش‌ها در زیرگروه‌های منوسیتی (۴۳/۴٪ = M4 , M5) در هماهنگی کامل با نتایج به دست آمده از مطالعه‌های سایر گروه‌هاست.

همه جهش‌هایی که تا به حال در این ناحیه شناسایی شده‌اند از نوع حذف و اضافه شدن (Insertion/Deletion) بوده و نهایتاً منجر به طولی‌تر شدن چهار تا پنج نوکلئوتیدی این ناحیه نسبت به حالت وحشی و تغییر قالب خواندن (Frame shift) در c-ترمینال پروتئین می‌گردند. در تمام این حالت‌ها حداقل یکی از دو بنیان تریپتوفان (W) در جایگاه‌های ۲۸۸ و ۲۹۰ (WQWRKSL) که برای لوکالیزاسیون هسته‌ای NPM1 ضروری‌اند، به بنیان‌های آمینو اسیدی دیگر تبدیل می‌گردند (۲۸٪). آلل‌های جهش یافته A و B بترتیب ۷۸٪ و ۱۲٪ از میزان بروز کل جهش‌های تا به حال یافت شده را به خود اختصاص داده‌اند (۳۲٪). هر ۲۳ مورد بیمار غربال شده دارای ژن NPM1 جهش یافته، مانند نتایج مطالعه‌های پیشین، هتروزیگوت بودند. نتایج حاکی از شیوع بالای آلل D ژن NPM1 جهش یافته (۲۱/۷٪) در بیماران AML ایرانی است.

جهش‌های NPM1 اغلب همراه با جهش‌های FLT3 ITD رخ می‌دهند. در مطالعه‌های فالینی و همکاران (۲۰۰۵)،

## References :

- 1- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100(5): 1532-42.
- 2- Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 2003; 17(9): 1738-52.
- 3- Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W, *et al.* Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* 2002; 16(2): 196-202.
- 4- Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, *et al.* Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20(15): 3254-61.
- 5- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, *et al.* High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101(3): 837-45.
- 6- Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, Botton S, *et al.* Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100(8): 2717-23.
- 7- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, *et al.* Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 2003; 4(1): 31-40.
- 8- Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100(13): 4372-80.
- 9- Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, *et al.* CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22(4): 624-33.
- 10- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 254-66.
- 11- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106(12): 3733-9.
- 12- Chang JH, Dumbar TS, Olson MO. cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. *J Biol Chem* 1988; 263(26): 12824-7.
- 13- Mamrack MD, Olson MO, Busch H. Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. *Biochemistry* 1979; 18(15): 3381-6.
- 14- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hugens W, *et al.* Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106(12): 3747-54.
- 15- Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 1989; 28(24): 9495-501.
- 16- Tarapore P, Okuda M, Fukasawa K. A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle* 2002; 1(1): 75-81.
- 17- Sipos K, Olson MO. Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177(2): 673-8.
- 18- Takemura M, Ohoka F, Perpelescu M, Ogawa M, Matsushita H, Takaba T, *et al.* Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res* 2002; 276(2): 233-41.
- 19- Wu MH, Yung BY. UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 48234-40.
- 20- Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju T, Ojala P, Meek D, *et al.* Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 2004; 5(5): 465-75.
- 21- Grisendi S, Pandolfi PP. NPM mutations in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 291-2.
- 22- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which cause constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; 12(9): 1333-7.
- 23- Zaker F, Mohammadi M, Kazemi A. Incidence of FLT-3 mutations in Iranian adult patients with different subtypes of acute myeloid leukemia. *Proceedings of the 12th Congress of the European Hematology Association; 2007 June 7-10; Vienna, Austria. Haematologica* 2007;92(2): 443.
- 24- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106(12): 3740-6.
- 25- Theophilus BD, Rapley R. PCR mutation detection protocols. Totowa: Humana Press Inc; 2002. p. 137-50.
- 26- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, *et al.* Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 1999; 93(9): 3074-80.
- 27- Roti G, Rosati R, Bonasso R, Gorello P, Diverio D, Martelli M, *et al.* Denaturing High-Performance Liquid

- Chromatography A Valid Approach for Identifying NPM1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Mol Diagn* 2006; 8(2): 254-9.
- 28- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Leuk Res* 2007; 31(1): 109-11.
- 29- Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia Research* 2007; 31(1): 109-11.
- 30- Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, *et al.* Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106(8): 2854-61.
- 31- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, *et al.* Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc\_AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem cell maintenance. *Blood* 2005; 106(3): 899-902.
- 32- Scholl S, Mügge L, Landt O, Loncarevic I, Kunert C, Clement J, *et al.* Rapid screening and sensitive detection of NPM1(nucleophosmin) exon 12 mutations in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2007; 31(9): 1205-11.

Archive of SID



*Original Article*

## Detection and assessment of the frequency of NPM1 and FLT3 ITD mutations in acute myeloid leukemia patients

Pazhakh V.<sup>1</sup>(MS), Zaker F.<sup>1</sup>(PhD), Ali Moghaddam K.<sup>2</sup>(MD), Atashrazm F.<sup>1</sup>(MS)

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Hematology, Oncology and BMT Research Center, Shariati Hospital, Tehran, Iran

### Abstract

#### **Background and Objectives**

NPM1/Nucleophismin/B23 is a phosphoprotein with high expression in the proliferating cells. NPM1+AMLs are also frequently associated with FLT3 ITD mutations. The purposes of this study were to assess the frequency of NPM1 and FLT3 ITD mutations among Iranian AML patients and their correlation with FAB subtypes of AML.

#### **Materials and Methods**

Bone marrow and peripheral blood samples of 131 AML patients were randomly collected, and their DNA was then extracted. Afterwards, PCR was applied to the fragment of NPM1 gene with specific primers. PCR products were electrophoresed using CSGE method. In the end, the positive samples were sequenced to confirm the presence of NPM1 mutations. Furthermore, FLT3 ITD positive cases were screened using PCR and 2.5% agarose gel electrophoresis.

#### **Results**

Out of 131 patients, 23 (17.55%) (CI 95% = 0.107-0.244) were known to have NPM1 gene mutations. The highest frequency was among the subtypes of M4 (30.4%), M3 (21.7%), and M5 (13%). Also, 21 samples (16.03%) (CI 95% = 0.092-0.229) had FLT3 ITD mutations with 8 cases being NPM1 positive and other 13 NPM1 negative.

#### **Conclusions**

NPM1 mutations are more frequent in monocytic subtypes (M4, M5). High frequency rates of NPM1 in M3 subtypes and allele D mutations in all subtypes together with the high degree of association between occurrence of NPM1 and FLT3 ITD mutations could be considered as interesting findings of the study ( $p=0.012$ ).

**Key words:** Leukemia, Myeloid, Acute, PCR, Electrophoresis, Agar Gel

*Sci J Iran Blood Transfus Org 2009; 6(3): 199-207*

Received: 14 Mar 2009

Accepted: 8 Nov 2009

Correspondence: Zaker F., PhD of Hematology. Associate Professor of Cellular and Molecular Research Center and Oncopathology Center of Iran University of Medical Sciences.

P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88054357-8; Fax : (+9821) 88054355

E-mail: Farhadz20@yahoo.co.uk