پردیس علوم

دانشکده زیست شناسی

اندازه گیری مقدار بیان ژن hTERT توسط تکنیک Real-time PCR در بیماران مبتلا به لوکمی پرومیلوسایتیک حاد

نگارش

هاله نیک ضمیر

اساتید راهنما

دکتراشرف الدین سخن سنج _ دکتر حمید الله غفاری

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته

زیست شناسی سلولی ومولکولی

بهمن ۱۳۸٦

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

که پشتیبان و حامی من در تمام مراحل زندگیم

بودند.

با تشکر فراوان از استاد گرامی و ارجمندم
جناب آقای دکتر حمید اله غفاری که همچون معلمی
مهربان، مرا درپیمودن نخستین گامهای علمیم راهنمائی و
یاری نمودند.

ودر نهایت، با تشکر از آقایان و خانمها :
دکتر اشرف الدین سخن سنج_ دکتر مهدی زمانی_ دکتر نسرین معتمد_ شهربانو رستمی_ نیلوفر شایان_ لیلا خوانساری_ مرجان یغمایی_ نازنین گرایلی_ میترا یوسفی_ حمیده شاه حیدری و تمام کسانی که مرا در پیشبرد این طرح یاری دادند.

چکیده

الگوی بیان hTERT که ژن بیان کننده زیر واحد کاتالیتیک آنزیم تلومراز انسان است، یک شاخص محدود کننده سرعت در فعالیت تلومرازی این آنزیم می باشد.

در این مطالعه، هدف بررسی این نکته است که آیا سطح mRNA ژن hTERT ، با مراحل کلینیکی و یا پیش گویی این مراحل ارتباطی دارد یا خیر. در این بررسی از تکنیک Real-time PCR با متد Taq-Man برای اندازه گیری تعداد کپی hTERT mRNA استفاده شد.

در این تحقیق از ۳۰ نمونه بیمار مبتلا به APL در طول دوره بیماریشان استفاده شد.

سطح بیان hTERT mRNA به صورت یک کسرکه نسبتی از تعداد کپی hTERT mRNA به تعداد کپی mRNA یک ژن house keeping به نام abl بود، به دست آمد.

مقدار بیانhTERT mRNA به طور برجسته ای در مراحل تشخیص و عود نسبت به دوره درمان کامل افزایش نشان می دهد. سرعت و مدت دوره بهبود در این بیماران هیچ ارتباطی را با سطح بیان hTERT در مرحله تشخیص نشان نداد. ۶۷٪ از بیمارانی که در طول دوره بیماریشان عود کردند ۸-۴ ماه قبل از عود افزایش بیان ژن hTERT را از خود نشان دادند.

آنالیز کمی و سریالی مقدار بیان hTERT mRNA می تواند یک مارکر مفید برای سنجش بیماران مبتلا به APL و پیش گویی وقوع عود در این بیماران باشد.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱
۱-۱- تاریخچه بیماری لوکمی ۲
۱-۲- تقسیم بندی انواع لوکمی ۲
۱-۳- لوکمی پرومیلوسیتیک حاد(APL) ۲
۱-۳-۱- اپیدمیولوژیAPL ۳
۱-۳-۲- اتیولوژیAPL ۳
۱-۳-۳- سیتوژنتیک APL ٤
۱-۳-۴- بیولوژی مولکولی APL ٥
۱-۳-٤-۱- نقش بیولوژیکی RARα ٥
۱-۳-٤-۲- نقش بیولوژیکی PML ٦
۱-۳-٤-۳- PML/RARA در t(15;17) ٦
۱-۳-٤-٤- مناطق شکست درt(15;17) ٦
۱-۳-٥- پاتوفیزیولوژی APL ۷
۱-۳-٦- مشخصات سیتولوژیکی APL ۹
۱-۳-۷- تظاهرات بالینی بیماران مبتلا به APL ۹
۱-۳-۸- روشهای تشخیص APL ۹
۱-۳-۹- درمانAPL ۱۰
۱-۴- تلومر ۱۰
۱-٤-۱- تاریخچه تلومر ۱۰
۱-۴-۲- ساختار تلومر ۱۱
۱-۴-۳- لزوم وجود توالی تلومریک در انتهای کروموزوم ۱٥
۱-٥- تلومراز ۱٦
۱-٥-۱- ارتباط تلومراز با پیری و سرطان ۱۷
۱-٥-۲- نقش دوگانه تلومراز در جلوگیری و ایجاد سرطان ۲۰
۱-٦- تکنیک Real time RT- PCR ۲۱
۱-۶-۱- انواع متدهای Real – Time PCR ۲۱
۱-۶-۱-۱- Real Time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green I ۲۱
۱-٦-۱-۲- Real –Time PCR با استفاده ازHydrolysis Probes ۲۲

۱-۶-۳- Real –Time PCR با استفاده ازHybridization Probes ۲۳
۱-۶-۴- Real –Time PCR با استفاده از روش Molecular beacons ۲٤
۱-۶-۲- انواع اندازه گیریها در تکنیک Real-time PCR ۲٥
۱-۶-۳- مزایای روش Real Time PCR ۲٦
۱-٦-٤- مفاهیم مهم در Real –Time PCR ۲٦
۱-٦-٤-۱-(Threshold) Crossing line ۲٦
۱-٦-٤-۲- Crossing Point=(CP) Or (Cycle thereshold) = (Ct) ۲۷
۱-۶-۴-۳-Standard Curve ۲۷
۱-۷- مروری بر مطالعات مشابه ۲۷
۱-۸- هدف از تحقیق ۲۹
فصل دوم : روشها و ابزارها ۳۱
۲-۱- گردآوری نمونه ۳۲
۲-۱-۱- خونگیری از افراد سالم ۳۲
۲-۱-۲- معیارهای ورود به مطالعه ۳۲
۲-۱-۳- ملاحظات اخلاقی ۳۲
۲-۲- جداسازی سلولهای تک هستهای از خون ۳۲
۲-۳- استخراج RNA ۳٤
۲-۳-۱- تهیه نمونه سلولی هموژن ۳٤
۲-۳-۲- جدا سازی RNA ۳٤
۲-۳-۳- رسوب دادن RNA ۳٤
۲-۳-٤- شستشویRNA ۳٥
۲-۳-٥- خشک کردن رسوبRNA ۳٥
۲-٤- سنتز cDNA از RNA های استخراج شده ۳٥
۲-٥- انجام PCR بر روی نمونه های cDNA ۳٦
۲-٥-۱- طراحی پرایمرها برای انجام PCR ۳٦
۲-٥-۲- دمای اتصال پرایمرها به DNA ۳۷
۲-٥-۳- رقیق کردن پرایمرها ۳۸
۲-٥-۴- تنظیم (set up) شرایط مناسب جهت انجام PCR ژنهای tert وabl ۳۸
۲-٦- الکتروفورزبرروی ژل آگارز ٤۱
۲-٦-۱- مواد و وسایل مورد نیازبرای ساخت ژل آگارز ٤۱

۲-٦-۲- الکتروفورز ٤٢
۲-٦-۲-۱- تهیه ژل آگارز ٤٢
۲-٦-۲-۲- Load کردن محصول PCR ٤٢
۲-٦-۲-۳- بررسی نتیجه PCR بوسیله UV ٤٢
۲-۷- کلون کردن (Cloning) ٤٣
۲-۷-۱- خالص سازی محصول PCR ٤٣
۲-۷-۲- آماده سازی محیط کشت ٤٤
۲-۷-۲-۱- آماده سازی محیط LB-agar ٤٤
۲-۷-۲-۲- آماده سازی محیط LB-broth ٤٥
۲-۷-۲-۳- آماده سازی محیط کشتLB-agar حاویX-Gal،Ampicilin, IPTG ٤٥
۲-۷-۳- کشت باکتری E.coli بر روی محیط LB–agar ٤٥
۲-۷-۴- متصل کردن محصول PCR با وکتور پلاسمیدی ٤٦
۲-۷-۵- تولید باکتریهای مستعد(competent)وانتقال(Transformation)پلاسمیدها به آنها ٤٨
۲-۷-٦- انتخاب کلونی های مثبت ٤٩
۲-۷-۷- استخراج پلاسمید ٤٩
۲-۸- محاسبه تعداد کپی پلاسمید ٥١
۲-۹- Real-time RT-PCR ٥٣
۲-۹-۱- توالی پرایمرها وپروبهای استفاده شده درReal time PCR ٥٣
۲-۹-۲- نکاتی در مورد طراحی پروب Taq man ٥٣
۲-۹-۳- تنظیم(set up) مواد مورد نیاز و برنامه زمانی دستگاه برای اندازه گیری کمی مقدار mRNA ژن tert وabl
توسط دستگاه (Roche) Light cycler ٥٤
۲-۹-۴- طرز تهیه Mix و آماده کردن نمونه ها ٥٦
۲-۹-۵- طریقه به دست آوردن مقادیر اولیه cDNA ژنهای tert وabl در نمونه های بیماران ٥٨
۲-۱۰- استفاده از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی و انجام double cloning جهت تائید نتایج به دست
آمده ٦٠
۲-۱۰-۱- طراحی پرایمرها و پروب جهت انجام PCR معمولی و Real-time PCR ژن GAPDH ٦١
۲-۱۰-۲- تنظیم(Set up) مواد و شرایط مناسب برای انجام PCR معمولی و Real-time PCR ژن GAPDH ٦١
۲-۱۰-۳- کلونینگ ژنهایTERT وGAPDH ٦٣
۲-۱۰-۳-۱- برش پلاسمید حاویhTERT و پلاسمید حاوی GAPDH با آنزیمهای برش دهنده ٦٣
۲-۱۰-۳-۲- اتصال دو ژن TERT وGAPDH به یکدیگر ٦٤

۲-۱۰-۳-۳- PCR قطعه Ligate شده با ۴ ترکیب پرایمری ٦٤
۲-۱۰-۳-۴- Ligation قطعه حاوی TERT و GAPDH با وکتور پلاسمیدی ٦٥
۲-۱۰-۳-۵- Transformation پلاسمید به درون باکتری ٦٦
۲-۱۰-۳-۶- گزینش باکتریهای مثبت ٦٧
۲-۱۰-۳-۷- استخراج پلاسمید ٦٧
۲-۱۰-۳-۸- تعیین تعداد کپی پلاسمید ٦٧
..... ٦٨
فصل سوم : نتایج ٦٨
۳-۱- نتیجه حاصل از الکتروفورز RNA های استخراج شده ٦٩
۳-۲- نتایج حاصل الکتروفورز محصول PCR ژنهای tert و abl ٦٩
۳-۳- نتایج حاصل از بریدن پلاسمیدهای حاوی ژنهای TERT و GAPDH ٧١
۳-٤- نتایج حاصل از PCR قطعات حاوی ژنهای TERT و GAPDH متصل شده به یکدیگر ٧١
۳- ۵- طرح شماتیک از مراحل ساخت پلاسمید دارای ژن TERT و GAPDH ٧٢
۳-۶- نتیجه حاصل از کشت باکتریهای ترانسفورم شده با پلاسمیدهای نوترکیب بر روی محیط کشت آگار حاوی آمپی سیلین ٧٣
۳-۷- نتایج حاصل از PCR باکتریهای ترانسفورم شده، جهت بررسی وجود ژنهای tert و abl ٧٣
۳-۸- نتایج حاصل از استخراج پلاسمیدهای حاوی بخشی از ژن tert و abl ٧٤
۳-۹- نتیجه PCR پلاسمیدهای استخراج شده حاوی GAPDH و hTERT ٧٥
۳-۱۰- نتایج حاصل از رسم منحنی استاندارد برای دو ژن tert و abl ٧٥
۳-۱۱- نتایج حاصل از رسم منحنی استاندارد توسط پلاسمید حاوی hTERT و GAPDH ٧٧
۳-۱۲- نتایج آماری به دست آمده از Real-time PCR نمونه های بیماران ٧٨
۳-۱۲-۱- نتایج به دست آمده از بررسی نمونه بیماران در زمان تشخیص(Diagnosis) ٧٩
۳-۱۲-۲- نتایج به دست آمده از بررسی نمونه بیماران در زمان عود(Relapse) ٧٩
۳-۱۲-۳- مقایسه بین مقدار بیان ژن hTERT در دو مرحله تشخیص و عود بیماری توسط برنامه آماری SPSS ٨٠
۳-۱۲-۴- نتایج به دست آمده از بررسی نمونه بیماران در زمان بهبودی کامل ومقایسه آن با دو مرحله تشخیص و عود بیماری توسط نرم افزار SPSS ٨١
۳-۱۲-۵- بررسی متوالی(Follow up) بیماران مبتلا به APL ٨٢
فصل چهارم : بحث ٨٤
۴-۱- set up تکنیک Real-time RT-PCR در اندازه گیری مقدار کمی mRNA hTERT در بیماران مبتلا به APL ٨٦

٤-١-١) Set up تکنیک Real-time PCR برای بیماران APL با تکنیک Probe Taqman.....۸۸
۴-۲- بررسی نمونه بیماران با روش Real-Time PCR ۹۰
۴-۳- نگاهی به آینده ۹۲
فصل پنجم : منابع ۹۳

فصل اول

۱-۱- تاریخچه بیماری لوکمی

بیماری لوکمی در میان رشته های طب داخلی، هماتولوژی و انکولوژی دارای جذابیت خاصی است، چرا که علیرغم دسترسی آسان به خون و ارگانهای خونساز، ابهامات فراوانی در زمینه های تشخیص و به خصوص درمان بیماریهای مربوط به آن باقیمانده است.

لوکمی به عنوان یک پدیده کلینیکی مجزا برای اولین بار توسط Bennet ، Craigine و Wichow در سال ۱۸٤٥ میلادی توصیف شد. واژه لوکمیا[1] به معنی خون سفید نخستین بار برای نامگذاری این بیماری به کار برده شد و در واقع این نامگذاری از آن جا ناشی می شود که در جریان بیماری، تعداد زیادی سلولهای سفید خون[2] در خون تجمع پیدا می کند.

لوکمی با یک سیرحاد، نخستین بار در سال ۱۸۵۷ میلادی توصیف شد و در سال ۱۸۷۰ به عنوان یک بیماری درگیرکننده مغز استخوان عنوان شد. در سال ۱۹۰۰ میلادی میلوبلاستها تشخیص داده شدند ودر نهایت تا سال۱۹۳۰، انواع مرفولوژیک لوکمی حاد و مزمن به خوبی مشخص شدند. (Best R, et al, 2000).

۱-۲- تقسیم بندی انواع لوکمی

لوکمی ها بر اساس سیر بیماری به دو دسته حاد و مزمن تقسیم بندی می شوند. از مشخصات لوکمی حاد، سیر کلینیکی سریع (در صورت عدم درمان) و وجود متاستازهای فراوان خونی می باشد که ٪۹۷ کل لوکمی کودکان را تشکیل می دهد در حالی که لوکمی مزمن تنها ٪۳ کل لوکمی ها را شامل می گردد (Lee GR, 1993).

۱-۳- لوکمی پرومیلوسیتیک حاد(APL)[3]

لوکمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، اولین بار در دهه ۱۹۵۰ به عنوان یک زیر مجموعه مجزا از لوکمی میلوئیدی حاد (AML) شناسائی شده که درسیستم طبقه بندی FAB، AML-M3 نامگذاری شده است. APL به عنوان یکی از درمان پذیرترین بدخیمی ها می باشد. اثر کلینیکی قابل توجه ATRA در این بیماری اولین بار در سال ۱۹۸۷ گزارش شد و امروزه روشن شده که تاثیر ATRA بدلیل اثر مستقیم آن بر روی پروتئین انکوژن PML/RARα است[۱]. پیش از ATRA، APL یک بیماری کشنده و فقط در ٤۰-۲۰ درصد موارد قابل درمان بود. اکثر بیماران در

[1] leukemia
[2] White blood cell
[3] Acute Promyelocytic Leukemia

اثر خونریزیهای شدید، عود و یا مقاوم شدن بیماری می مردند. در دهه اخیر APL به یک بیماری قابل درمان تبدیل شده و مطالعات مولکولی و زیست شناسی سلولی، اطلاعات زیادی را در مورد اساس پاتوبیولوژی این بیماری فراهم کرده است.

۱-۳-۱- اپیدمیولوژی APL

در ایران سرطان دستگاه خون ساز، ششمین سرطان رایج در مردان با بروز ۵/۸٪ کل سرطانهای مردان وهمچنین ششمین سرطان رایج در زنان، با بروز ۴/۶۲٪ کل سرطانهای زنان می باشد. از تعداد کل ۹۴۶ مورد سرطان دستگاه خونساز ثبت شده در بین زنان در سال ۱۳۸۳، فراوانی APL با۲۱نفر، ۲/۲۲٪ بود. این سرطان در بین انواع دیگر سرطانهای دستگاه خونساز در زنان در رتبه هشتم قرارگرفت.

از تعداد کل ۱۵۴۹ مورد سرطان دستگاه خونساز گزارش شده در سال ۱۳۸۳ در بین مردان، فراوانی APL با ۲۱ مرد مبتلا ، ۱/۳۶٪ بود. در این بین APL در رتبه دهم قرار گرفت. از لحاظ پراکندگی جغرافیایی، حداثر فراوانی APL در مردان، در استانهای خراسان، کرمان، یزد، خوزستان، کرمانشاه و آذربایجان غربی دیده شد. حداقل فراوانی آن در استانهای واقع در حاشیه دریاچه خزر، سیستان وبلوچستان و هرمزگان گزارش شده است. در زنان نیز حداکثر فراوانی در استانهای خراسان، اصفهان، خوزستان و آذربایجان غربی و حداقل فراوانی در استانهای غربی کشور مشاهده شد.

۱-۳-۲- اتیولوژی APL

تا کنون چند عامل به عنوان فاکتورهای زمینه ساز در ابتلا به اشکال مختلف AML شناخته شده است.

۱- قرار گرفتن در معرض عوامل شیمی درمانی در درمان سرطان، به ویژه عوامل آلکیله کننده، سبب افزایش خطر ابتلا و توسعه بیماری می شود که این تاثیر در حدود ۵-۳ سال بعد از اتمام شیمی درمانی افزایش می یابد.

عوامل شیمی درمانی دیگر به خصوص Epipodophyllotoxin ها و Anthracyclin ها با افزایش خطر ابتلا به لوکمی همراهند. این لوکمی ها اغلب با ناهنجاریهای کروموزومی خاصی در سلولهای لوکمیایی مرتبطند.

۲- ناهنجاریهای خونی از قبیل سندرومهای Myelodysplastic یا Myeloproliferative می تواند سبب ابتلا به AML شود.

۳- قرار گرفتن طولانی مدت در معرض پرتوهای یونی و همچنین رادیولوژیهایی که اشعه x را در سطوح بالا تابش می کنند، می تواند خطرابتلا را افزایش دهد.

۴- ترکیبات شیمیایی از جمله بنزن و یا حلالهای آلی آروماتیک، خصوصا برای کسانی که به موجب شغلشان به صورت طولانی مدت با این ترکیبات در تماسند، میتواند خطرساز باشد.

۵- علاوه بر عوامل محیطی، پاره ای از شرایط درونی نیز میتواند احتمال ابتلا به لوکمی را افزایش دهد. که یکی از این عوامل سندرم داون است که ۱۸-۱۰ برابر خطر ابتلا به AML را افزایش می دهد[۲].

۱-۳-۳- سیتوژنتیک APL

نشان بارز سیتوژنتیک لوکمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) که زیر مجموعه M3 را در طبقه بندی FAB تشکیل می دهد، جابجائی است که جایگاه RARα (Retinoeic Acid Receptor) را در کروموزوم ۱۷ درگیر می کند. اکثر بیماران، دارای t(15;17)(q22;q11-12) میباشند[۳] . رتینوئیک اسید لیگاند مهم در مسیر تمایز بافتهای مختلف می باشد. در ۹۵٪ بیماران مبتلا به APL، ژن RARα بر روی کروموزوم ۱۷ تحت یک جابه جایی دو طرفه با ژن PML (Promyelocytic Leukemia gene) واقع بر روی کروموزوم ۱۵ قرار می گیرد. این اتصال سبب ایجاد پروتئین نوترکیبی می شود که عملکرد RARα را مختل کرده و از بلوغ نرمال گرانولوسیتها جلوگیری به عمل می آورد[۴]. اگر چه اعتقاد بر این است که جابه جایی کروموزومی RARα یک رخداد شروع کننده است و موتاسیونهای دیگری نیز برای توسعه لوکمی نیاز است.

۱-۳-۴- بیولوژی مولکولی APL

۱-۳-٤-۱- نقش بیولوژیکی RARα

RAR ها متعلق به خانواده بزرگ رسپتور هسته ای می باشند. از سه ایزوفرم RAR (α, β,γ)، فرم α درسلولهای هماتوپویتیک بیان می شود. رسپتورهای اسید رتینوئیک که شامل دو خانواده مجزا می باشند، (RXRs ,RARs) تنظیم کننده های رشد جنینی هستند و همچنین رشد و تمایز را در انواع سلولهای افراد بالغ تحت تاثیر قرار می دهند. این رسپتورها فاکتورهای نسخه برداری هستند که مستقیماً به صورت هترودایمر RAR-RXR به توالی های اختصاصی عناصر پاسخ دهنده به اسید رتینوئیک RARE[1] واقع در ناحیه تنظیمی ژنهای هدف خاصی متصل می شوند. RARE عموماً تکرار مستقیمی از َ3 -PuGTTCA – َ 5 می باشد که بوسیله۲ یا ۵ جفت باز از هم جدا شده اند. تا کنون انواع مختلف ژنهای هدف RAR شناسائی شده است که تعدادی از آنها را ذکر می کنیم[۵].

C-myc یک فاکتور نسخه برداری است که در تنظیم تکثیر و اپوپتوز نقش دارد و افزایش بیان آن در انواع بدخیمی ها مشاهده شده است. RAR باعث تنظیم منفی بیان C-myc می شود.

ژنهای Hox از فاکتور های نسخه برداری هستند که نقش مهمی در تنظیم تکثیر و تمایز سلولهای هماتوپوئتیک دارند. تعدادی از ژنهای Hox در پروموتور خود دارای RARE می باشند و رتینوئیک اسید ها در تنظیم بیان آنها نقش دارند[۶].

ژن p21 با انواع کمپلکس های کیناز وابسته به سایکلین که در تنظیم پیشرفت سیکل سلولی نقش دارند، واکنش داده و باعث مهار آنها می شود. تمایز گرانولوستی القاء شده توسط اسید رتینوئیک در سلولهای HL-60 همینطور تمایز منوسیتی القاء شده در سلولهای U937 همراه با افزایش بیان p21 بوده است. پروموتور p21 نیز دارای RARE می باشد و به نظر می رسد مستقیماً هدف اسید رتینوئیک فعال شده قرار می گیرد[۷].

1.Retinoic Aciad Response Element

۱-۳-٤-۲- نقش بیولوژیکی PML

در مغز استخوان بیان PML در سلولهای رده میلوئیدی بسیار بالا است در حالی که در منوسیت ها و سلولهای چند هسته ای خون محیطی به حداقل می رسد و یا اصلاً بیان نمی شود. PML چرخه سلولی را تحت تاثیر قرار می دهد . بیان بالای PML در سلولهای Hela باعث مهار رشد سلولی، مهار تشکیل کلنی در آگار و مهار رشد تومور در موشهای nude می شود. همچنین باعث تجمع سلولها در G1 و تاخیر ورود سلولها به فاز S (به دلیل کاهش سایکلین E و CdK2) می شود[۸] . PML یک سرکوب کننده رشد است و عفونی کردن سلولهای NB4 با رتروویروسهای دارای PML باعث سرکوب توانائی این سلولها برای ایجاد کلنی در آگار جامد می شود.

۱-۳-٤-۳- PML/RARA در t(15;17)

جابجائی t(15;17) باعث ایجاد دو کروموزوم نوترکیب می شود:۱) +15q و ۲) -17q . بنابراین در افراد APL یک کروموزوم ۱۷ و یک کروموزوم ۱۵ طبیعی وجود دارد. این جابجائی باعث ایجاد یک نسخه فیوژن در هر یک از کروموزوم های بوجود آمده می شود. در فیوژن PML/RARα انتهای آمینی PML به موتیف های اتصال به DNA و به لیگاند RARα متصل می شود. در حالی که فیوژن PML/RARα همواره در همه بیماران دارای t(15;17) وجود دارد، فیوژن RARα/PML تقریباً در ۸۰ درصد از بیماران یافت می شود[۹].

۱-۳-٤-٤- مناطق شکست در t(15;17)

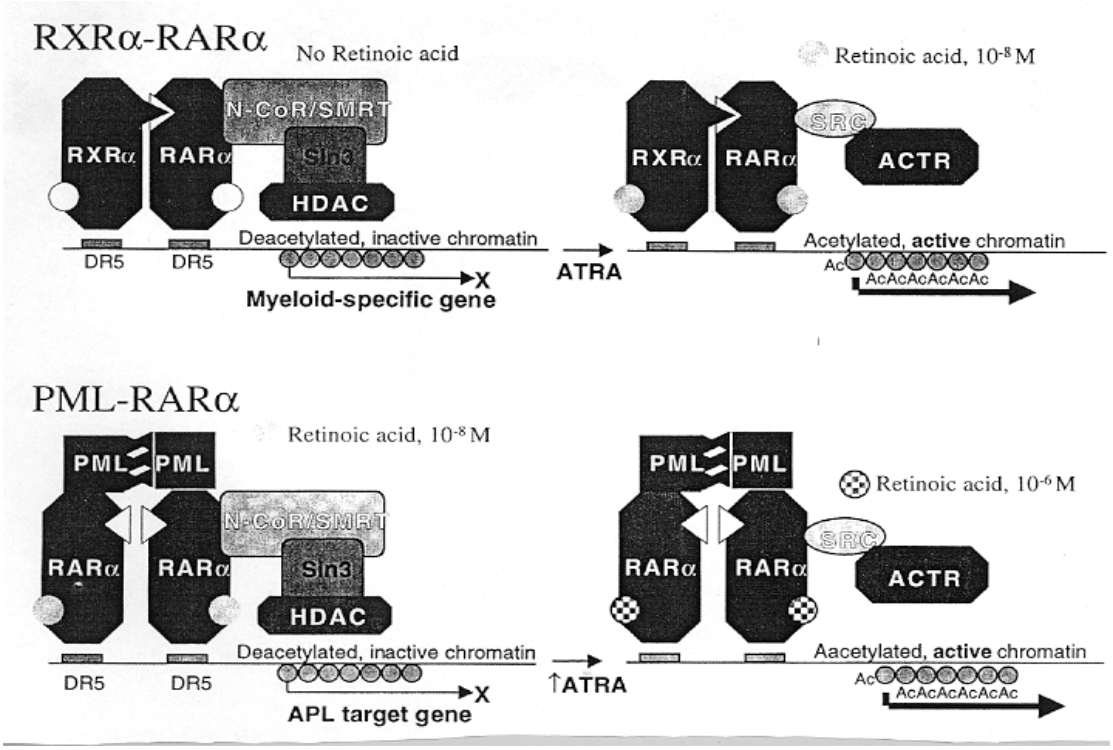
مناطق شکست در جابجائی کروموزومی در(q22-q24)17 و (q11-q21)15 قرار دارد. دو ژنی که در این جابجائی کروموزومی درگیر هستند عبارتند از ژن PML بر روی کروموزوم ۱۵ که یک فاکتور نسخه برداری است و ژن گیرنده اسید رتینوئیک α بر روی کروموزوم ۱۷. منطقه شکست در ژن RARα بر روی کروموزوم ۱۷ در اینترون ۲ و در قطعه ای از DNA به طول Kb ۱۵ قرار دارد . در مقابل سه ناحیه از ژن PML در این جابجائی درگیر است که باعث ایجاد سه ایزوفرم مختلف می شود که عبارتند از ایزوفرم bcr_1 درحدود ۵۵ درصد از بیماران دارای این جابجائی کروموزومی گزارش شده است و در آن اینترون ٦ ژن PML درگیر است. ایزوفرم bcr_2 که در حدود ۵ درصد از این بیماران مشاهده می شود و در آن اگزون ٦ ژن PML درگیر است و ایزوفرم bcr_3 در حدود ٤۰ درصد بیماران مشاهده می شود و اینترون ۳ ژن PML در آن درگیر است[۱۰] .

نسخه های کایمریک PML/RARA و RARA/PML در اثر این جابجائی کروموزومی دو طرفه ایجاد می شود. به دلیل وجود مناطق شکست مختلف در ژن PML همچنین به دلیل پدیده پردازش متناوب در ژن PML ناهمگونی زیادی در نسخه های فیوژن مشاهده شده است، بعلاوه به دلیل استفاده متناوب از دو سایت پلی آدنیلاسیون که در ژن RARα وجود دارد نسخه های PML/RARα با اندازهای مختلف ایجاد می شود[۱۱ و۱۲] .

۱-۳-۵- پاتوفیزیولوژی APL

اهمیت نقش PML/RARα در ایجاد APL مشخص نشده است و به جابجائی کروموزومی دوطرفه نیازمند است. به بیان ساده پروتئین فیوژن باعث توقف تمایز و آپوپتوز در پرومیلوسیت ها می شود. در رده سلولی NB4 گرفته شده از بیماران APL تداخل در بیان PML/RARα مانع رشد این سلولها می شود[۱۳]. به نظر می رسد نقش عمده PML/RARα، حداقل در این رده سلولی مسدود کردن مرگ سلولی است. اطلاعات با ارزشی از وظیفه آنتی آپوپتوزی PML/RARα، از بررسی وظیفه پروتئین طبیعی PML (که به نظر می رسد واسطه انواع مختلف مسیرهای آپوپتوزی است) بدست آمده است. در واقع نه تنها بیان بالای PML باعث القاء آپوپتوز می شود بلکه سلولهای موشهای فاقد ژن PML به اثر آپوپتوزی القاء شده توسط مواد مختلف مانند فاکتور نکروز دهنده تومور، Fas، اینترفرون گاما، سرامید و اشعه مقاوم هستند[۱۴]. به نظر می رسد PML/RARα ، باعث غیر فعال شدن PML طبیعی می شود که این به نوبه خود سبب مقاومت به آپوپتوز که از مشخصات سلولهای APL است، می گردد. به طور قطعی غیر فعال شدن عملکرد PML، روند پاتوژنتیک مهمی در APL می باشد چون در موشهای ترانس ژنیک PML/RARα و فاقد هر دو آلل PML، افزایش در شیوع و شروع زودتر لوکمی مشاهده شده است[۱۵].

PML/RARα به طور مستقیم با تمایز میلوئیدی تداخل می کند، به نظر می رسد این مسئله نشان دهنده توانائی آن در مهار نسخه برداری از ژنهای دخیل در کنترل تمایز پرومیلوسیتیک (در فقدان اسید رتینوئیک) باشد. مکانیسم این اثر به صورت شماتیک (شکل۱) نشان داده شده است. PML/RARα با به کار گیری کورپرسور هسته ای (N-COR) و هیستون داستیلاز (HDAC) در ناحیه پروموتور این ژنهای بحرانی، باعث مهار نسخه برداری می شود[۱۶] .



شکل۱-۱ : درگیری کورپرسور هسته ای (N-COR) در پاتوژنز لوکمی حاد پرومیلوسیتیک (APL)

در شرایط طبیعی RXRα و RARα هترودایمر تشکیل داده و به توالی DR5 در بازوی 5 ژن های پاسخ دهنده به اسید رتینوئیک متصل می شود. در فقدان اسید رتینوئیک، RARα با کمپلکس سرکوب کننده نسخه برداری شامل N-COR، SMRT، HDAC (هیستون داستیلاز) واکنش می دهد. داستیلاسیون هیستون منجر به شکل گیری کنفورماسیون کروماتین بسته شده و ژنهائی که بیانشان بوسیله رتینوئیک اسید تنظیم می شود، به میزان خیلی کم و یا اصلاً نسخه برداری نمی گردند. در حضور غلظت کم یا فیزیولوژیک اسید رتینوئیک، N-COR از محل اتصال خود برروی مولکول RARα جابجا شده و کواکتیویتورهای نسخه برداری مانند SRC به جای آن قرار می گیرند. همچنین هیستون استیل ترانسفرازها (ACTR) نیز به کار گرفته می شوند و منجر به استیلاسیون هیستون ، باز شدن کروماتین و فعال شدن نسخه برداری می شوند. در APL ، پروتئین فیوژن PML/RARα از طریق دمین پیچ در پیچِ بخش PML دایمر یا مولتی مر تشکیل می دهد(دمین های اتصال به DNA ، کورپرسور و لیگاند RARα در مولکول فیوژن حفظ شده اند) و به عنوان یک دایمر غیرطبیعی به محل DR5 در ناحیه پروموتور ژنهای درگیر در تمایز پرومیلوسیتها متصل می شوند. کمپلکس PML-RARA/N-COR به غلظت فیزیولوژیک رتینوئیدها

(10^{-8}M) غیر حساس است و باعث سرکوب نسخه برداری می شود (از طریق هیستون داستیلاسیون). در غلظت فارماکولوژیک ATRA، کمپلکس PML-RARA/N-COR جدا ،کروماتین استیله شده و بیان ژن از سر گرفته می شود.

مهار نسخه برداری توسط این فیوژن به ناحیه پیچ در پیچ PML نیاز دارد و به نظر می رسد ناحیه پیچ در پیچ PML احتمالاً از طریق دیمریزاسیون باعث پایداری واکنش بین RARα ، N-COR و HDAC می شود. در حالی که در حالت طبیعی، ارتباط بین نوع وحشی RARα و N-COR در غلظت فیزیولوژیک اسید رتینوئیک از بین می رود، ارتباط محکم تر موجود بین PML-RARα و N-COR تنها در غلظت فارماکولوژیک ATRA از بین می رود[۱۷] .

۱-۳-٦- مشخصات سیتولوژیکی APL

درAPL نسبت به سایرAML ها کمترین تکثیردیده می شود. تمایز سلولی تا مرحله پرومیلوسیتیک پیش رفته است و یک وقفه در بلوغ سلول ها مشاهده می گردد. بطوریکه بیشتر از ۲۰٪ سلولهای خونساز مغز استخوان را بلاست و پرومیلوسیت تشکیل می دهد، بر خلاف سایر لوکمی ها، لکوپنی دیده میشود وترومبوسیتوپنی نیز وجود دارد. شمارش RBC و Hb کاهش متوسط تا خفیف نشان می دهد[۱۸]. پرومیلوسیت های غیرطبیعی دارای گرانولهای درشت و آئررادهای متعدد هستند و در ۱۰-۱ ٪ موارد آئررادهای چند گانه (Faggot cell) دیده می شوند. در این سلولها گاهی هسته های دولوبه دیده می شود، سیتوپلاسم بلاست ها رنگ پذیری شدید با سودان بلک و میلوپراکسیداز نشان می دهند[۱۹] .

۱-۳-۷- تظاهرات بالینی بیماران مبتلا به APL

علائم بالینی در این بیماران مانند سایر اشکال AML است. که شامل تب، خستگی، کاهش وزن یا کاهش اشتها، نفسهای کوتاه وسخت، کم خونی، خونریزی و کبودیهای مکرر به سبب افزایش انعقاد خارج رگی، لکه های ریز سر سوزنی و مسطح در زیر پوست به دلیل خونریزی، درد استخوان و مفصل و عفونتهای دایمی و مکرر می باشد[۲۰].

۱-۳-۸- روشهای تشخیص APL

لوکمی پرومیلوسیتیک حاد می تواند بر اساس آزمایشات مورفولوژیکی بر روی بیوپسی مغز استخوان از دیگر انواع AML قابل تشخیص باشد.

تشخیص قطعی، نیازمند بررسی وجود ترانسلوکیشن RARα است که این تست می تواند با تکنیکهای مولکولی از جمله PCR، روشهای متداول سیتوژنتیک از قبیل تکنیک FISH[1] انجام گردد[۲۱].

۱-۳-۹- درمان APL

APL به دلیل حساسیتش به داروی ATRA[2] که مشتقی از ویتامین A است، در بین لوکمی های دیگر منحصر به فرد است. درمان با ATRA سبب تمایز پرومیلوسایتیکهای لوکمیایی نابالغ به گرانولوسیتهای بالغ می شود. معمولا ATRA با شیمی درمانی وابسته به Anthracycline همراه است و سبب بهبود کلنیکی در تقریبا ۹۰٪ افراد می گردد. درمان توسط ATRA با عوارض جانبی خاصی از جمله، تنگی نفس، تب، افزایش وزن و ادم همراه است که با dexamethasone بهبود می یابد. به بیمارانی که عود می کنند درمانهای دیگری از قبیل Arsenic Tiroxide و پیوند سلولهای آلوژنی مغز استخوان توصیه می شود[۲۱].

۱-۴- تلومر

۱-٤-۱- تاریخچه تلومر

در اوایل دهه ۱۹۳۰، Hermann J.Muller و Barbara McClintock تلومر را با عنوان یک ساختار محافظت کننده در انتهای کروموزومها تعریف کردند. اگر چنین ساختاری در انتهای کروموزومها وجود نداشته باشد، سبب اتصال آنها به یکدیگر و در نهایت مرگ سلول می شود.

در دهه ۱۹۷۰ Jamesd.Watson بیان داشت که در روند همانندسازی DNA خطی، DNA پلیمراز نمی تواند به طورکامل انتهای ۵' کروموزومهارا همانندسازی کند ولذا یک بخش کوچک در دو انتهای کروموزومها به صورت تک رشته باقی می ماند. او بیان داشت که یک مکانیزم جبرانی برای پر کردن این شکاف انتهایی نیاز است. در غیر این صورت انتهای کروموزوم در هر سیکل همانندسازی، کوتاهتر می شود[۲۲].

در دهه ۱۹۶۰، Hayflick یک بینش زیست شناختی از پیری عنوان داشت. او دریافته بودکه سلولهای دیپلوئید در محیط کشت سلول به تعداد محدودی تکثیر می شوند. هنگامی که سلولها تا این حد تکثیر شدند، تحت تغییرات مورفولوژیکی وبیولوژیکی قرار می گیرند و در نهایت

[1] Fluorescent In Situ Hybridization
[2] All Transe Retinoic Acid