DOI: 10.48305/jims.v40.i675.0412

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۷۵/هفته‌ی سوم مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۷ تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۵/۲۱

بررسی ارتباط بیان ژن *MYC* و RNA غیر کد کننده‌ی lnc-myc-2-34 dup1 در بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد

کمال شاه امیری[۱]، آرش القاسی[۲]، نجم الدین ساکی[۲]، غلام عباس کایدانی[۳]، حسین تیموری[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، روند افزایشی میزان بروز لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia) ALL گزارش شده است. با این‌حال، مکانیسم‌های مولکولی درگیر کاملاً شناخته نشده‌اند. به دلیل اهمیت c-*MYC* در بیماری‌زایی ALL، توجه به lncRNAهای مرتبط با آن در شناسایی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پیشرفت بیماری اهمیت دارد. پیامدهای ناشی از سیگنال‌های Notch بسته به دوز و محتوا، بسیار پلئوتروپیک هستند. در بخش هماتولنفوئید بدن، سیگنالینگ Notch بر رده‌های سلولی در مراحل مختلف رشد تأثیر می‌گذارد. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی نقش ژن *MYC* و LncRNAهای مرتبط با آن به عنوان یک هدف بالقوه‌ی درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد بود.

روش‌ها: این مطالعه‌ی مورد- شاهدی در سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ بر روی ۴۰ فرد مبتلا به ALL و ۴۰ فرد سالم انجام شد. برای این منظور RNA تام از نمونه‌ی خون افراد استخراج شد و پس از سنتز cDNA، بیان *MYC* و lnc-myc-2-34 dup1 با استفاده از روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که در افراد مبتلا به ALL، بیان *MYC* و lncRNA مرتبط lnc-myc-2-34 dup1 نسبت به افراد شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این تغییرات بیان در سن، جنس، MRD و رده‌های T-ALL و B-ALL تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. lncRNA با ژن *MYC* همبستگی نشان داده و منحنی راک حاکی از پتانسیل بیومارکری قوی آن بوده است.

نتیجه‌گیری: استفاده از lncRNAها به عنوان مارکرهای تشخیصی، پیش‌آگهی و درمانی می‌تواند گزینه‌ی مناسبی باشد که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که lnc-myc-2-34 dup1 در بیماران مبتلا به ALL افزایش بیان داشته و می‌توانند به عنوان بیومارکر قوی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد؛ انکوژن *MYC*؛ RNA Long Noncoding ، بیان ژن؛ مطالعه‌ی مورد- شاهدی

ارجاع: شاه امیری کمال، القاسی آرش، ساکی نجم الدین، کایدانی غلام عباس، تیموری حسین. **بررسی ارتباط بیان ژن *MYC* و RNA غیر کد کننده‌ی lnc-myc-2-34 dup1 در بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۷۵): ۴۲۰-۴۱۲

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia) ALL، شایع‌ترین بدخیمی در کودکان زیر ۱۵ سال و دومین لوسمی حاد شایع در بزرگسالان است. در کودکان، حدود ۷۵ درصد موارد ابتلای آن قبل از ٦ سالگی بروز می‌کند (۱). در سال‌های اخیر میزان بروز ALL روند افزایشی داشته است. اختلالات کروموزومی و تغییرات ژنتیکی دخیل در فرایند تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز لنفوئیدی مشخصه‌ی اصلی ALL است (۲). به طور سنتی، طبقه‌بندی عوامل خطر بر اساس عوامل بالینی مانند سن، تعداد گلبول‌های سفید خون و پاسخ به شیمی‌درمانی است. با این حال، شناسایی تغییرات ژنتیکی به پیش‌آگهی فردی و بهبود مدیریت بیماری کمک کرده است (۳).

مسیر سیگنالینگ Wnt/b-catenin، یکی از آبشارهای کلیدی مهم در تنظیم سیر تکاملی و پایداری سلول‌های ایمنی و خون است، اما نقش دقیق آن هنوز بحث‌برانگیز و موضوع پژوهش‌های مختلفی است. با فعال شدن مسیر سیگنالینگ Wnt، پروتئین b-catenin به داخل هسته وارد شده و رونویسی ژن‌های هدف شامل cyclin D1 و

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیمارهای تالاسمی و هموگلوبینوپاتی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین تیموری: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: hosseintimm@yahoo.com

c-myc را فعال می‌کند. مسیر سیگنالینگ Wnt/ b -catenin در سرطان‌های خونی به طور غیرعادی فعال است، بنابراین به عنوان یک هدف بالقوه جهت درمان سرطان مورد بررسی قرار گرفته است (۲).

ژن c-MYC یکی از انکوژن‌هایی است که اغلب تنظیم آن مختل شده و عامل بسیاری از سرطان‌های انسانی است. ژن c-MYC اغلب توسط جابه‌جایی‌های کروموزومی در سرطان‌های خون به ویژه در لنفوم و لوسمی سلول B یا T فعال می‌شود. اگرچه درک نقش تنظیمی MYC در کنترل بیان lncRNA و اینکه چگونه MYC توسط lncRNA در سرطان‌های خون کنترل می‌شود هنوز در ابتدای راه است، نشان داده شده است که c-MYC می‌تواند بخشی از عملکرد انکوژنی خود را از طریق lncRNAها اجرا کند. چندین مطالعه lncRNAهای تنظیم کننده‌ی بیان c-MYC و lncRNAهای تنظیم شده با c-MYC را در سرطان‌های مختلف خون شناسایی کرده‌اند و مکانیسم‌های جدیدی را نشان داده‌اند که چگونه این مولکول‌های RNA عمل می‌کنند (٤، ٥).

استفاده از بیومارکرها به عنوان یک هدف جدید برای درمان بیماری بسیار حائز اهمیت است (٦، ٧). امروزه، lncRNAها به عنوان یک بیومارکر بالقوه جهت تشخیص انواع مختلف سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند (٨). lncRNAها می‌توانند اثرات خود را از طریق بسیاری از فرایندهای سلولی مانند ترکیب فضایی کروموزوم‌ها، تغییرات کروماتین و DNA، رونویسی RNA، خاموش کردن pre-mRNA، تخریب mRNA و ترجمه mRNA اعمال کنند (٩). چندین مطالعه میزان بیان غیر طبیعی RNAهای غیر کدکننده را در لوسمی حاد لنفوبلاستیک دوران کودکی (ALL) با ارزش تشخیصی بالقوه شناسایی کرده‌اند (١٠-١٢). بیان افتراقی lncRNAها در زیرگروه‌های مختلف لوسمی لنفوبلاستیک حاد تشخیص داده شده است. علاوه بر این، lncRNAs وابسته به NOTCH در ALL مشتق شده از رده‌ی سلول‌های T (T-ALL) نیز مشخص شده‌اند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن CEBPA و بیان چندین lncRNA در لوسمی میلوئید حاد وجود دارد (١٣). به دلیل اهمیت c-*MYC* و lncRNAهای مرتبط با آن در بیماری‌زایی ALL امروزه مطالعات بسیاری به نقش lncRNA به عنوان یک هدف بالقوه‌ی درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد پرداخته‌اند. بر همین اساس در مطالعه‌ی حاضر ارتباط بیان ژن *MYC* و RNA غیر کد کننده‌ی lnc-myc-2-34 dup1 در بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع مورد- شاهدی بود که ٤٠ کودک مبتلا به بیماری لنفوبلاستیک حاد (٣٢ نفر B-ALL و ٨ نفر T-ALL) مراجعه‌کننده به بیمارستان بقایی ٢ شهر اهواز در سال ١٣٩٩ جمعیت مورد مطالعه‌ی آن را تشکیل داد. به تعداد این افراد، افراد سالم به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بیماران بر اساس شاخص MRD نامی است که به تعداد کمی از سلول‌های لوسمیک (سلول‌های سرطانی از مغز استخوان) داده می‌شود که در طول درمان یا پس از درمان در زمانی که بیمار در حال بهبودی است در فرد باقی می‌ماند.

معیارهای ورود و خروج به مطالعه به دو زیرگروه پاسخ‌دهنده به درمان و عدم پاسخ به درمان بیماری لوسمی لنفوبلاستیک تقسیم شدند. همچنین، اطلاعات بیماران از لحاظ سن و شاخص MRD ثبت گردید. مواردی که به بیماری‌های دیگر از جمله بدخیمی‌های خونی مبتلا بودند، از مطالعه حذف شدند. از بیماران، چک‌لیستی در بردارنده‌ی اطلاعات پزشکی و خانوادگی تکمیل شده و همچنین، افراد با رضایت آگاهانه در تحقیق حاضر شرکت کرده و از آن‌ها رضایت‌نامه کتبی اخذ شد. همچنین این مطالعه دارای کد اخلاق با شناسه‌ی IR.SKUMS.REC.1399.273 ثبت شده در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می‌باشد.

از ٤٠ فرد بیمار و ٤٠ فرد شاهد، نمونه‌ی خون اخذ گردید. نمونه‌های خون برای جلوگیری از انعقاد به لوله‌های استاندارد حاوی EDTA ریخته و پس از خون‌گیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش در فریزر با دمای ٢٠- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن و lncRNA با استفاده از روش Real time PCR

استخراج RNA با استفاده از کیت Super RNA Extraction kit AnaCell انجام شد. مراحل انجام کار مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. جهت بررسی کمی RNA استخراج شده، از تعیین دانسیته نوری (Optical density) OD و میزان جذب در طول موج ٢٦٠nm توسط دستگاه نانودراپ استفاده شد. سنتز cDNA با کیت cDNA synthesis kit AnaCell و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. از کیت Real Time PCR Master Mix 2X AnaCell و پرایمرهای موجود در جدول ١ برای انجام واکنش Real- Time PCR استفاده گردید. برای این منظور مخلوط واکنش شامل ١٠ میکرولیتر مسترمیکس 2x، ٠/٥ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ١٠ میکرومولار، ٢٠ نانوگرم از نمونه cDNA تا حجم نهایی ٢٠ میکرولیتر در دستگاه Real- Time PCR (qunt stdiue 3) با برنامه‌ی دمایی انجام واکنش PCR شامل ٤٠ چرخه بود که هر چرخه از سه بخش ١٥ ثانیه دمای ٩٥ درجه؛ ٣٠ ثانیه، ٦٠ درجه و ٣٠ ثانیه، ٧٢ درجه قرار گرفت تا واکنش Real- time PCR انجام شود. اطلاعات پرایمرها با نرم‌افزار الیگو انالایزر و پرایمر ٣ توسط شرکت سیناکلون انجام شد. ژن بتا اکتین به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌های مورد استفاده در واکنش Real Time PCR همراه طول قطعه‌ی تکثیر شده

ژن	پرایمر	توالی پرایمر '3→5'	طول امپلیکون (جفت باز)
MYC	Forward primer	GTTGGGAGGAAGGTGAGGAA	۱۷۷
	Reverse primer	CCTCTGGGGTTTGCGAGATA	
myc-2-34-dup1	Forward primer	GATTCACAAGCCCCACCAAG	۱۸۱
	Reverse primer	CGTTTTCCCACAGTGATGCT	
β-actin	Forward primer	TGGGCATCCACGAAACTAC	۱۳۷
	Reverse primer	GATCTCCTTCTGCATCCTGT	

بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد و وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) گردید. ابتدا فرض نرمال بودن داده‌ها با آزمون‌های Shapiro-Wilk و Kolmogorov–Smirnov بررسی شد و با توجه به آن‌که داده‌ها نرمال نبودند، از آزمون Mann–Whitney جهت ارزیابی آن‌ها استفاده گردید. در مورد متغیر سن که تعداد گروه‌های مورد بررسی بیشتر از دو گروه بود، از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. در این مطالعه همچنین برای بررسی کارآیی الگوریتم‌های دسته‌بندی یا ایجاد داده‌های رسته‌ای از منحنی ROC که هر دو شاخص حساسیت و بازیابی را همزمان ارزیابی می‌کند، استفاده شد. خطای نوع دوم ۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

خصوصیات دموگرافیک شرکت‌کنندگان در آزمایش: سن و جنس افراد بیمار و شاهد در جدول ۲ مشخص شده است و با توجه به مقدار P که در تمامی موارد بیشتر از ۰/۰۵ است، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و بیمار نبوده و جمعیت مورد مطالعه از نظر سن و جنس همگن بوده‌اند.

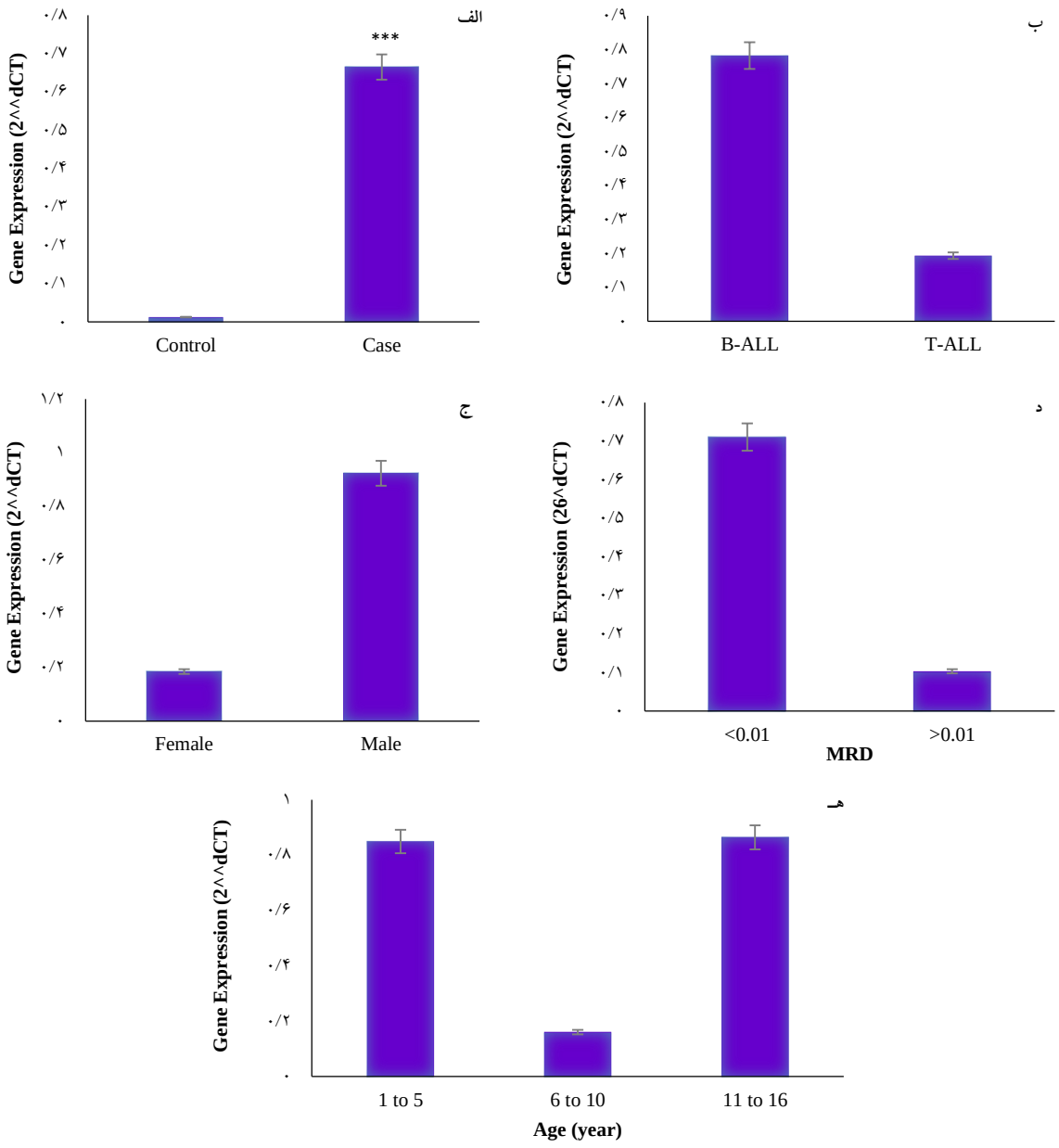
جدول ۲. وضعیت جنسیت و سن در گروه بیمار و شاهد همراه با احتمال تطابق آن‌ها

گروه‌ها	جنس		سن (سال)		
	زن	مرد	۱-۵	۶-۱۰	۱۱-۱۶
بیمار	۱۴	۲۶	۱۶	۱۱	۱۳
شاهد	۱۹	۲۱	۱۷	۱۵	۸
P	۰/۰۶۶	۰/۰۵۸	۰/۷۴۱	۰/۰۹۶	۰/۱۶۳

بررسی بیان ژن MYC: نتایج حاصل از آزمون Mann-Whitney نشان داد که بیان ژن *MYC* به طور معنی‌داری در افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش یافته بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱-الف). مقایسه‌ی بیان ژن *MYC* در دو نوع لوسمی لنفوبلاستیک حاد B-ALL و T-ALL نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *MYC* بین گروه B-ALL و T-ALL وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۱-ب). بین زنان و مردان نیز تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *MYC* مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۱-ج). نتایج حاصل از محاسبه‌ی میزان MRD و بررسی ارتباط آن با بیان ژن *MYC* نشان داد که میزان بیان ژن *MYC* در افراد MRD مثبت و MRD منفی تفاوت معنی‌داری ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۱-د). بیماران از نظر سنی به سه گروه ۱ تا ۵ سال، ۶ تا ۱۰ سال و ۱۱ تا ۱۶ سال تقسیم شده و بیان ژن *MYC* میان آن‌ها مقایسه گردید. نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *MYC* بین گروه‌های سنی مختلف وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۱-ه).

شکل ۱ نشان می‌دهد، بیان این ژن در افراد بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم است (***: $P < ۰/۰۰۱$) اما در سایر گروه‌های مورد مقایسه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

بررسی بیان lnc-myc-2-34 dup1: ابتدا نرمالیتی داده‌های مربوط به بیان lnc-myc-2-34 dup1 با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و Kolmogorov–Smirnov بررسی شد و از آن‌جایی که داده‌ها نرمال نبودند، آنالیز آن‌ها با استفاده از آزمون Mann-Whitney صورت پذیرفت. نتایج این آزمون نشان داد که بیان lnc-myc-2-34 dup1 در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۲-الف). بررسی بیان lnc-myc-2-34 dup1 در رده‌های T-ALL و B-ALL نشان داد که بیان lnc-myc-2-34 dup1 در این دو گروه لوسمی لنفوبلاستیک حاد تفاوت معنی‌داری ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲-ب). مقایسه‌ی بیان lnc-myc-2-34 dup1 در زنان و مردان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نیز نشان‌دهنده‌ی عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین این دو گروه از لحاظ بیان lnc-myc-2-34 dup1 بود ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲-ج). تفاوت معنی‌داری از لحاظ بیان lnc-myc-2-34 dup1 بین دو گروه MRD مثبت و MRD منفی مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲-د). همچنین با استفاده از آزمون ANOVA مشخص شد که بین گروه‌های سنی مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان بیان lnc-myc-2-34 dup1 وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲-ه).



شکل ۱. نمودار میزان بیان ژن *MYC* برای شاخص‌های مختلف مورد مطالعه

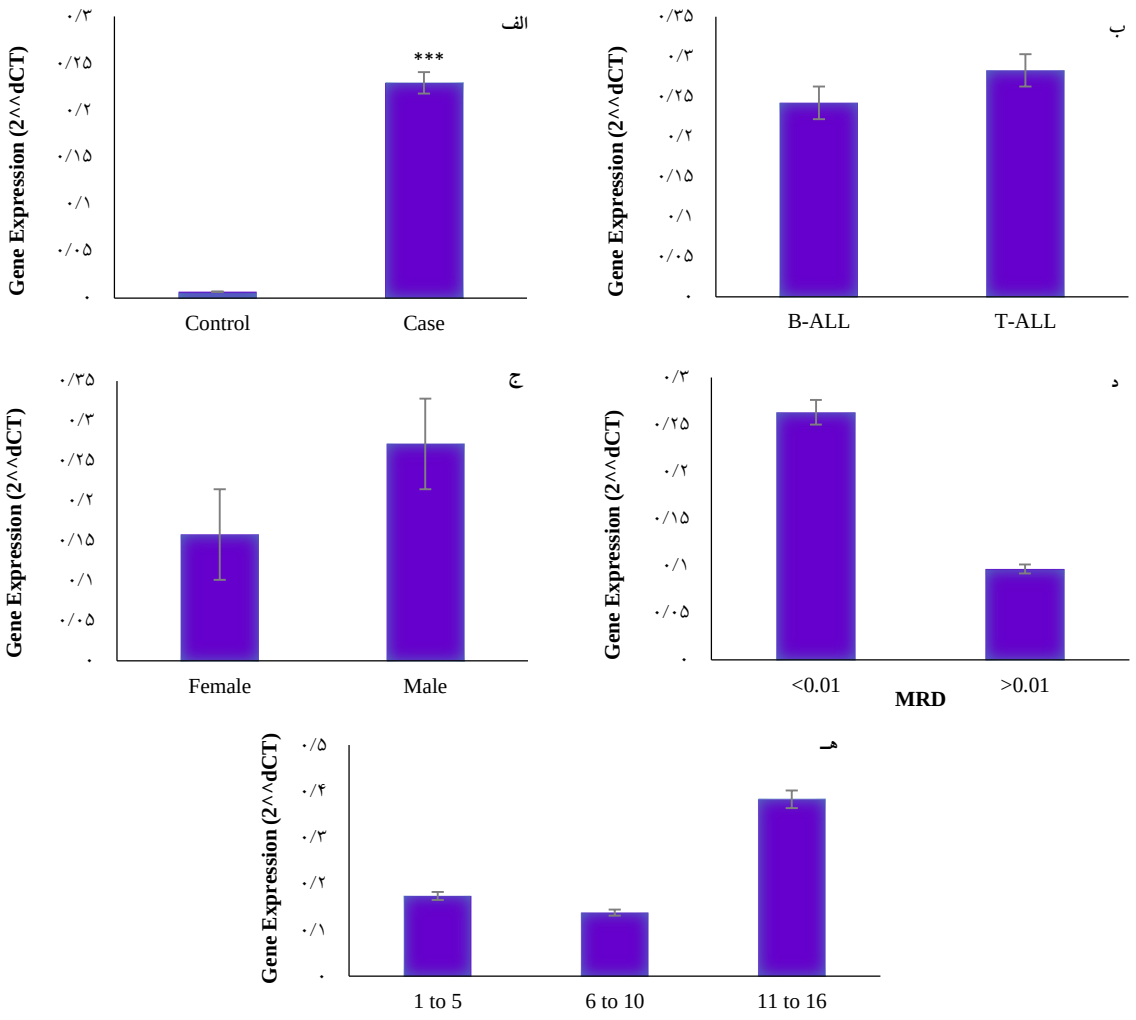
الف: میزان بیان *MYC* در افراد بیمار و سالم؛ ب: میزان بیان *MYC* در گروه B-ALL و T-ALL؛ ج: میزان بیان *MYC* در زنان و مردان؛ د: میزان بیان *MYC* در MRD بیشتر و کمتر از ۰/۰۱ ؛ ه: میزان بیان *MYC* در سنین مختلف؛ ***: P < ۰/۰۰۱

شکل ۲ نشان می‌دهد بیان این ژن در افراد بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم است (***: P < ۰/۰۰۱) اما در سایر گروه‌های مورد مقایسه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P > ۰/۰۵).

بررسی ارتباط میان بیان ژن MYC و بیان lnc-myc-2-34 dup1

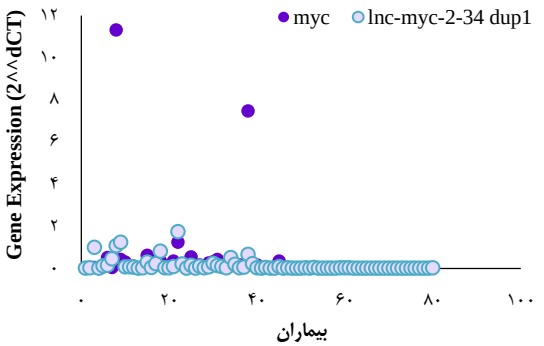
ضریب همبستگی Spearman برای بررسی ارتباط بیان ژن *MYC* با بیان lnc-myc-2-34 dup1 محاسبه شد. ضریب همبستگی محاسبه شده برابر با ۰/٤۸ بود که نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی متوسط مستقیم است. سطح **معنی‌داری**، P < ۰/۰۱ برآورد شد (شکل ۳).

بررسی پتانسیل بیومارکری lnc-myc-2-34 dup1: با استفاده از رسم منحنی راک، پتانسیل بیوماکری lnc-myc-2-34 dup1 ارزیابی و سطح زیر نمودار ۰/۹۰۱ محاسبه شد که نشان دهنده‌ی پتانسیل بالای این lncRNA به عنوان مارکر تشخیصی برای لوسمی لنفوبلاستیک حاد بود (P < ۰/۰۰۰۱) (شکل ٤).



شکل ۲. نمودار میزان بیان lnc-myc-2-34 dup1 برای شاخص‌های مختلف مورد مطالعه.

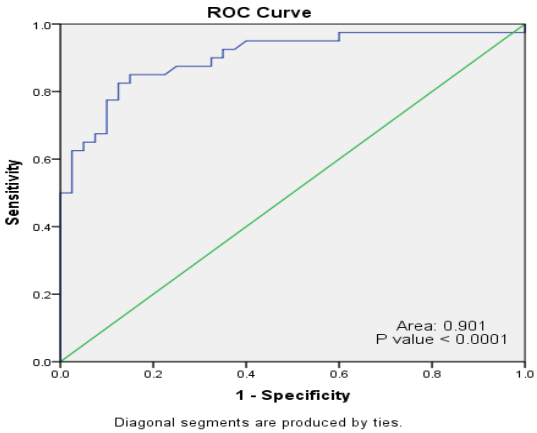
الف: میزان بیان lnc-myc-2-34 dup1 را در افراد بیمار و سالم؛ ب: در گروه B-ALL و T-ALL؛ ج: در زنان و مردان؛ د: در MRD بیشتر و کمتر از ۰/۰۱ ؛ ه: در سنین مختلف نشان می‌دهد. ***: P < ۰/۰۰۱



شکل ۳. نمودار بررسی همبستگی میزان بیان ژن *MYC* و lnc-myc-2-34 dup1 در افراد مورد مطالعه. نمودار نشان می‌دهد در هر فرد با کاهش بیان lnc-myc-2-34 dup1، بیان *MYC* نیز کاهش داشته است.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر بیان ژن *MYC* و یک lncRNA مرتبط با این ژن، lnc-myc-2-34 dup1، در افراد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد با افراد سالم مقایسه شد. نتایج حاصل نشان داد که بیان ژن *MYC* و lncRNA مربوطه به طور معنی‌داری در افراد بیمار افزایش می‌یابد (P < ۰/۰۵). این تغییر بیان ژن در رده‌های مختلف لوسمی لنفوبلاستیک حاد شامل B-ALL و T-ALL، جنسیت‌های مختلف، سنین مختلف و MRD تفاوت معنی‌داری نداشت (P > ۰/۰۵). از طرفی ضریب همبستگی Spearman نشان‌دهنده‌ی همبستگی متوسط و مستقیم بین *MYC* و lnc-myc-2-34 dup1 بود. منحنی راک نیز پتانسیل قوی بیومارکری این lncRNA را تأیید نمود (P < ۰/۰۰۰۱).



شکل ٤ . بررسی پتانسیل بیومارکری lnc-myc-2-34 dup1. منحنی راک نشان می‌دهد که این lnc-myc-2-34 dup1 پتانسیل بیومارکری معنی‌داری دارد.

اهمیت *MYC* در لوسمی لنفوبلاستیک حاد از داده‌های ژنومی و بررسی بیان در مقیاس بزرگ منعکس شده است که نشان دهنده‌ی دخالت *MYC* در شروع و ادامه‌ی بدخیمی‌های لنفوئیدی است (١٤). گیرنده‌های Notch در یک مسیر سیگنالینگ محافظت شده که توسعه‌ی انواع مختلف سلول و بافت را در متازوآها تنظیم می‌کند، شرکت دارند. پیامدهای ناشی از سیگنال‌های Notch بسته به دوز و محتوا، بسیار پلئوتروپیک هستند. در بخش هماتولنفوئید، سیگنالینگ Notch بر رده‌های سلولی در مراحل مختلف رشد تأثیر می‌گذارد. Notch بر خودتجدیدی سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs)، تمایز سلول T از یک پیش‌ساز چندگانه، بلوغ تیموسیت‌های دوگانه‌ی منفی (DN) به ویژه در چک‌پوینت انتخابی بتا (β-selection checkpoint) و همچنین تمایز سلول‌های $CD4^+$ T در مسیرهای TH1 یا TH2 تأثیر می‌گذارد. از زمان کشف Notch1 از طریق تجزیه و تحلیل کروموزومی در لوسمی/ لنفوم لنفوبلاستیک حاد سلول T انسان (T-ALL)، شواهد فراوانی از دخالت Notch1 در پاتوژنز این سرطان مهاجم به دست آمده است. اخیراً، جهش‌های فعال در Notch1 در ٥٥ تا ٦٠ درصد T-ALLهای انسانی کشف شده است و داده‌های در حال ظهور نشان می‌دهد که انواع مشابه جهش‌های Notch1 اغلب در بسیاری از مدل‌های موشی T-ALL به عنوان رویدادهای ثانویه رخ می‌دهند (١٥).

در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که بیان *MYC* در افراد مبتلا به ALL افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. Allen و همکاران نیز نشان دادند که بیان پروتئین C-myc در افراد مبتلا به B-ALL افزایش یافته و ارزش تشخیصی دارد (١٦).

Ott و همکاران نیز نشان دادند که بیان *MYC* در این بیماران افزایش یافته و از طرفی مهار کننده‌های برومودومین با مهار *MYC* دارای پتانسیل ضد سرطانی می‌باشند (١٧).

در مطالعه‌ی Wallington-Beddoe و همکاران هم مشخص شد که اسفنگوزین کیناز ٢ با افزایش بیان *MYC* موجب القای لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌گردد (١٨). این موارد همگی با یافته‌های ما در مطالعه‌ی حاضر هم‌راستا می‌باشد.

اهمیت مسیر PI3K/Akt در بدخیمی‌های هماتولوژیک مانند لوسمی و لنفوم، با توجه به نقش مهم و تنظیمی آن در پاتوژنز و بروز مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی، بیشتر مشخص شده است (١٩). شواهد بسیاری نشان داده‌اند که فعالیت نابجای PI3K/Akt در بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد، یک مرحله‌ی ضروری برای شروع و ادامه‌ی لکوموژنز است (٢٠). *MYC* یکی از شناخته‌شده‌ترین پروتوانکوژن‌ها در تنظیم چرخه‌ی سلولی است و در بیان ژن‌های مهار کننده‌ی سایکلین‌ها نیز نقش دارد. مطالعات صورت گرفته بر روی این ژن نشان داده است که فاکتور رونویسی کد شده توسط آن پس از فعال شدن در سلول‌های سرطانی، از طریق مسیرهای سیگنالینگ مانند PI3K/Akt، باعث مهار بیان ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی چرخه‌ی سلولی همچون p21 و p27 می‌شود. *MYC* از این طریق، زمینه را برای تکثیر سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند (٢١). در مطالعه‌ی حاضر نیز افزایش بیان *MYC* در افراد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، تأییدکننده‌ی نقش انکوژنی آن می‌باشد.

مطالعات بیانی اخیر بر روی نمونه‌های pre-B cALL نشان داده است که پروفایل بیانی lncRNAها می‌تواند زیرگونه‌های بیماری را به طور دقیق طبقه‌بندی کند (٢٢، ٢٣). این مطالعات نشان داده است که lncRNAها می‌توانند به عنوان نشانگرهای تشخیصی و پیش‌آگهی در لوسمی استفاده شوند، اما برای درک مفید بودن بالینی آن‌ها به مطالعات بیشتری نیاز است (٢٤).

Wang و همکاران گزارش کردند که افزایش بیان یک lncRNA به نام NALT که در نزدیکی NOTCH1 در فاصله‌ی ١٠٠ جفت باز قرار دارد، با NOTCH1 در نمونه‌های انسانی مرتبط است و موجب افزایش تقسیم سلولی در سلول‌های T-ALL می‌گردد (٢٥).

بررسی همبستگی Spearman نشان داد که بیان lncRNA مورد مطالعه با بیان ژن *MYC* همبستگی متوسط و مستقیم دارد به این معنی که در هر فرد، افزایش و کاهش *MYC* به طور متوسطی با افزایش و کاهش lnc-myc-2-34 dup1 همراه بود. منحنی راک نیز تأیید کرد که lncRNA مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر، به طور معنی‌داری دارای پتانسیل بیومارکری برای لوسمی لنفوبلاستیک حاد هستند. بر اساس جستجو در پایگاه‌های داده، مطالعه بر روی lnc-myc-2-34 dup1 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، تاکنون انجام

نشده و در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار مشخص شد که بیان آن در بیماری لوسمی لنفوبلاستیک حاد به طور معنی‌داری افزایش یافته و دارای پتانسیل بیومارکری قوی می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که بیان ژن *MYC* در افراد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد به طور معنی‌داری نسبت به افراد سالم افزایش می‌یابد و در واقع این ژن، نقش انکوژنی در ALL ایفا می‌کند. همچنین lnc-myc-2-34 dup1 با نقش انکوژنی و افزایش بیان در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، می‌تواند در این بیماری نقش داشته و به عنوان بیومارکر مورد استفاده قرار بگیرند. بررسی بیان این lncRNA می‌تواند در تشخیص لوسمی لنفوبلاستیک حاد به کار رود و هدف قرار دادن آن در راهکارهای تنظیمی بیان ژن، می‌تواند هدف درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد باشد. استفاده‌ی گسترده از lnc-myc-2-34 dup1 به عنوان مارکر لوسمی لنفوبلاستیک حاد نیاز به مطالعات و آزمایشات بیشتری دارد که امید می‌رود در آینده انجام شده و از این lncRNA در سطح بالینی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی مصوب در مرکز تحقیقاتی سلولی و مولکولی شهرکرد به شماره‌ی ۵۶۷۷ می‌باشد. از دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر حمایت مالی و دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به خاطر همکاری در این طرح تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. N Engl J Med 2015; 373(16): 1541-52.
2. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J 2017; 7: e577.
3. Rehman A, Abbas N, Saba T, Ur Rahman SI, Mehmood Z, Kolivand H. Classification of acute lymphoblastic leukemia using deep learning. Microscopy Research and Technique, 2018. 81(11): p. 1310-17.
4. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2017; 35(9): 975-83.
5. Arman K, Möröy T. Crosstalk between MYC and lncRNAs in hematological malignancies. Front Oncol. 2020; 10: 579940.
6. Bustos Fernández L. Colon: Structure and function. Berlin, Germany: Springer Science & Business Media; 2013.
7. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Int 2018; 60(1): 4-12.
8. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. Genomics Proteomics Bioinformatics 2016; 14(1): 42-54.
9. Arun G, Diermeier SD, Spector DL. Therapeutic targeting of long non-coding RNAs in cancer. Trends Mol Med 2018; 24(3): 257-77.
10. Liang J, Chen W, Lin J. LncRNA: an all-rounder in rheumatoid arthritis. J Transl Int Med 2019; 7(1): 3-9.
11. Li G, Gao L, Zhao J, Liu D, Li H, Hu M. LncRNA ANRIL/miR-7-5p/TCF4 axis contributes to the progression of T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell Int 2020; 20: 335.
12. Li S, Bian H, Cao Y, Juan C, Cao Q, Zhou G, et al. Identification of novel lncRNAs involved in childhood acute lymphoblastic leukemia pathogenesis. Oncology letters meant results 2019; 17(2): 2081-90.
13. de Souza Melo CP, Campos CB, de Oliveira Rodrigues J, Aguirre-Neto JC, Atalla A, Pianovski MAD, et al. Long non-coding RNAs: biomarkers for acute leukemia subtypes. Br J Hematol 2016; 173(2): 318-20.
14. Sheikh-Zeineddini N, Safaroghli-Azar A, Salari S, Bashash D. C-Myc inhibition sensitizes pre-B ALL cells to the anti-tumor effect of vincristine by altering apoptosis and autophagy: Proposing a probable mechanism of action for 10058-F4. Eur J Pharmacol 2020; 870: 172821.
15. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Genes Dev 2006. 20(15): 2096-109.
16. Allen A, Gill K, Hoehn D, Sulis M, Bhagat G, Alobeid B. C-myc protein expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia, prognostic significance? Leuk Res 2014; 38(9): 1061-6.
17. Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, et al. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 2012; 120(14): 2843-52.
18. Wallington-Beddoe CT, Powell JA, Tong D, Pitson SM, Bradstock KF, Bendall LJ. Sphingosine kinase 2 promotes acute lymphoblastic leukemia by enhancing MYC expression. Cancer Res 2014; 74(10): 2803-15.
19. Bressanin D, Evangelisti C, Ricci F, Tabellini G, Chiarini F, Tazzari PL, et al. Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels. Oncotarget 2012; 3(8): 811-23.
20. Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for the treatment of leukemia. Cell Mol Life Sci 2015; 72(12): 2337-47.
21. Safaroghli-Azar A, Sadri M, Bashash D. Bashash, Induction of p21-and p27-mediated cell cycle arrest in Nalm-6 cells using pan-PI3K inhibitor (Buparlisib)

[in Persian]. KoMesh 2018; 20(4): 756-63.
22. Fernando TR, Rodriguez-Malave NI, Waters EV, Yan W, Casero D, Basso G, et al. LncRNA expression discriminates karyotype and predicts survival in B-lymphoblastic leukemia. Mol Cancer Res 2015; 13(5): 839-51.
23. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer cell 2002; 1(2): 133-43.
24. Ouimet M, Drouin S, Lajoie M, Caron M, St-Onge P, Gioia R, et al. A childhood acute lymphoblastic leukemia-specific lncRNA implicated in prednisolone resistance, cell proliferation, and migration. Oncotarget 2017; 8(5): 7477-88.
25. Wang Y, Wu P, Lin R, Rong L, Xue Y, Fang Y. LncRNA NALT interaction with NOTCH1 promoted cell proliferation in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia. Sci Rep 2015; 5: 13749.

DOI: *10.48305/jims.v40.i675.0412*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 675, 3rd Week, August 2022**

Received: 14.12.2022 Accepted: 07.01.2022 Published: 12.08.2022

The Relationship between the Gene Expression Level of *MYC* Gene and Non-Coding RNA Lnc-Myc-2-34 Dup1 in Acute Lymphoblastic Leukemia

Kamal Shahamiri[1], Arash Alghasi[2], Najmaldin Saki[2], Gholam Abbas Kaydani[3], Hossein Teimori[1]

Original Article

Abstract

Background: In recent years, an increasing trend in the incidence of acute lymphoblastic leukemia (ALL) has been reported. However, the molecular mechanisms involved are not fully understood. Because of the importance of c-MYC in ALL pathogenesis, it is important to consider the associated lncRNAs in identifying the molecular mechanisms involved in disease progression. The consequences of hazardous dosing hazards and content are highly pleiotropic. In hemolymphoid, Notch signaling grows on cell lines at different stages. The present study aimed to investigate the role of the *MYC* gene and related LncRNAs as a potential target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia.

Methods: This case-control study was performed on 40 ALL patients and 40 healthy controls in the years 2020-2021. For this purpose, total RNA was extracted from blood samples and after cDNA synthesis, *MYC*, and-myc-2-34 dup1 expression was measured using Real-Time PCR. Statistical analysis of the results was performed using SPSS software and appropriate tests.

Findings: The results of the gene expression study showed that in patients with ALL, *MYC* expression and related lncRNA lnc-myc-2-34 dup1 compared to controls had significant increases. These expression changes were not significantly different in age, sex, MRD, and T-ALL and B-ALL categories. lncRNA lnc-myc-2-34 dup1 correlated with the *MYC* gene, and the ROC curve indicated their strong biomarker potential.

Conclusion: Using lncRNAs as diagnostic, prognostic, and therapeutic markers can be an appropriate option that needs further research. According to the presenexpertri, it is reported for the first time that an-myc-2-34 dup1 has increased expression in patients with ALL and can be used as strong biomarkers.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia; *MYC* oncogene; Long Noncoding RNA; Case-control studies; Gene expression

Citation: Shahamiri K, Alghasi A, Saki N, Kaydani GA, Teimori H. **The Relationship between the Gene Expression Level of *MYC* Gene and Non-Coding RNA Lnc-Myc-2-34 Dup1 in Acute Lymphoblastic Leukemia.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(675): 412-20.

1- Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- Thalassemia and Hemoglobinopathy Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3- Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Hossein Teimori, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; Email: hosseintimm@yahoo.com