

بررسی بیان ژن Survivin و واریانت پیرایشی جدید Survivin-2a در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن

دکتر سیدمحمدامین موسوی^۱، نگین سیدگوگانی^۲، دکتر ایرج اسودی کرمانی^۳*

تاریخ دریافت: 1391/07/01 تاریخ پذیرش: 1391/09/28

چکیده

پیش زمینه و هدف: لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) نوعی بدخیمی خونی می باشد که در آن جابه جایی کروموزومی منجر به تکثیر بی رویه سلول های میلوئیدی و مقاومت به مرگ برنامه ریزی شده سلول می شود. مشخص شده است که بیش بیان Survivin با بهبودی ضعیف بیماران لوسمی و پاسخ کم به شیمی درمانی همراه است. با این حال مطالعات جامعی در مورد Survivin-2a که یک واریانت پیرایشی جدید Survivin می باشد، به خصوص در بیماران CML انجام نشده است. در مطالعه حاضر، الگوی بیان Survivin و Survivin-2a در بیماران CML مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: نمونه های خونی ۹ فرد سالم و ۳۰ بیمار مبتلا به CML از مراجعه کنندگان به بیمارستان شهید قاضی طباطبایی تبریز جمع آوری شدند. در مجموع، ۲۴ بیمار در فاز مزمن (CP) و شش بیمار در فاز حاد (AP/BC) بودند. بررسی الگوی بیان ژن Survivin و Survivin-2a توسط واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR) انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که بیان ژن Survivin در بیماران مرحله AP/BC به طور معنی داری بالاتر از مرحله CP و افراد سالم می باشد. همچنین Survivin-2a در بیماران مرحله AP/BC در مقایسه با بیماران مرحله CP و افراد سالم بیان بالاتری داشت. به عبارتی، Survivin-2a در هر ۶ بیمار فاز AP/BC به میزان بالایی بیان شد. در حالی که از ۲۴ بیمار موجود در فاز CP، فقط در ۴ بیمار به میزان کم بیان شد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، بیان بالای Survivin-2a مشابه با Survivin، با مرحله AP/BC بیماری مرتبط می باشد. از اینرو می توان از واریانت پیرایشی اخیر به عنوان یک مارکر تشخیصی و درمانی استفاده کرد.

کلید واژه ها: مرگ برنامه ریزی شده سلول، لوسمی میلوئیدی مزمن، Survivin، Survivin-2a

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره هفتم، ص ۷۸۳-۷۷۶، ویژه نامه اسفند ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۹۲۷۴۱

Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir

مقدمه

سلول های میلوئیدی و مهار مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می گردد (۲). امروزه راهکارهای مختلفی برای درمان CML پیشنهاد می شود که از آن جمله می توان به شیمی درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و مهارکننده های اختصاصی فعالیت تیروزین کینازی Bcr-Abl اشاره کرد (۳،۴). اما وجود برخی مشکلات از جمله مقاومت دارویی و عود مجدد بیماری مانع اصلی در موفقیت روش های درمانی می باشد (۵،۶).

لوسمی میلوئیدی مزمن^۴ یکی از شناخته شده ترین انواع لوسمی می باشد که در آن جابجایی دو طرفه کروموزومی بین ژن Abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن Bcr بر روی کروموزوم ۲۲ منجر به تشکیل کروموزوم فیلادلفیا می شود که مهم ترین مشخصه CML می باشد (۱). انکوپروتئین Bcr-Abl با فعالیت تیروزین کینازی غیرقابل تنظیم خود منجر به رشد بی رویه سلول های بنیادی خون ساز مغز استخوان، بقای بیش از حد

^۱ استادیار، دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ استاد، فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۴ Chronic myeloid leukemia (CML)

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خونی مورد نیاز این تحقیق از بیماران مبتلا به CML از بیمارستان شهید قاضی طباطبایی تبریز با معرفی پزشک فوق تخصص انکولوژی و با رضایت کامل بیماران جمع آوری شدند. تشخیص مبتلایان به CML توسط همکاران پزشک و به صورت سیتوژنتیکی با توجه به وجود کروموزوم فیلادلفیا و به صورت مولکولی با توجه به Bcr-Abl انجام شد. همچنین پرونده پزشکی بیماران به منظور تشخیص فاز بیماری و مشخصات بالینی بیماران مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۳۰ نمونه خونی از بیماران مبتلا به CML و ۹ نمونه از افراد سالم (به عنوان گروه کنترل) جمع آوری شدند. لازم به ذکر است محدودیت در مراجعه بیماران به بیمارستان، فوت بیماران و همچنین منطبق نبودن روش‌های درمانی برخی بیماران مرجوعی با روش مورد مطالعه این تحقیق، از محدودیت‌های تعداد بیماران در این مطالعه محسوب می‌شود.

جداسازی لکوسیت‌های تک هسته‌ای از نمونه‌های خونی:

نمونه‌های خونی تهیه شده از بیماران و افراد سالم در فالتکون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (سیناژن، تهران)، به میزان دو برابر با محلول PBS^۳ رقیق شد. برای جداسازی لکوسیت‌های تک هسته‌ای خون، ۴ ml محلول فایکول (بیوزن، مشهد) به خون رقیق شده، اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (۲۰). لایه میانی که حاوی لکوسیت‌های تک هسته‌ای بود توسط پیپت پاستور به فالتکون استریل منتقل شده و با PBS شستشوداده شد. رسوب سلولی حاصل تا مرحله استخراج RNA در دمای ۸۰- نگهداری گردید.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR):

استخراج RNA از نمونه‌های خونی بیمار و سالم، با استفاده از محلول Rimazoles (Teifarafarayand، تهران) انجام شد. بعد از افزودن محلول Rimazoles، RNA توسط محلول کلروفرم (Merck، آلمان) جداسازی و با استفاده از ایزوپروپانول (Merck، آلمان) رسوب داده شد. رسوب RNA پس از شستشو توسط اتانول (Merck، آلمان) در ۱/۱۰٪ EDTA (سیناژن، تهران) نگهداری گردید. کمیت و کیفیت RNA حاصله با استفاده از اسپکتروفتومتری UV و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر یکسان از RNA مربوط به هر نمونه خونی (۱ میکروگرم) با آنزیم DNaseI (فرمنتاز، کانادا) تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT (فرمنتاز، کانادا) و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم رونویسی

یکی از مکانیسم‌های عمده در ایجاد مقاومت دارویی، مقاومت به مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌باشد که عمدتاً به علت بیان بالای پروتئین‌های مهار کننده مرگ برنامه ریزی شده سلول^۱ (IAP) رخ می‌دهد (۷). Survivin عضو جدیدی از این خانواده پروتئینی می‌باشد که به دلیل نقش دوگانه‌ی آن در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پیشبرد چرخه سلولی توجه محققان بسیاری را به خود جلب کرده است (۸). بیان متمایز Survivin در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال و از سوی دیگر وجود ارتباط بین میزان بیان آن با درجه‌ی بدخیمی تومورها و مقاومت به درمان‌های مختلف از جمله شیمی‌درمانی، آن را به عنوان مارکر مولکولی در سرطان مطرح می‌سازد (۹). ژن Survivin که در بازوی بلند کروموزوم ۱۷ در جایگاه ۲۵ قرار دارد، دارای ۴ اگزون اصلی E1، E2، E3 و E4 می‌باشد (۹). علاوه بر واریانت اصلی Survivin، پنج واریانت پیرایشی 2B، 3B، 2α، 3α و ΔEx3 برای آن شناخته شده است که در نتیجه فرایند پیرایش متناب RNA^۲ ایجاد شده‌اند (۱۰). وجود این تعداد واریانت پیرایشی نشان دهنده‌ی تنظیم شدید این ژن و دخالت آن در عملکردهای متفاوت سلولی می‌باشد (۱۰). واریانت پیرایشی Survivin-2a یک واریانت جدید Survivin می‌باشد که در سال ۲۰۰۵ میلادی کشف شد (۱۱). این واریانت دارای قابلیت بر هم کنش فیزیکی با Survivin بوده و می‌تواند عملکردهای آنتی آپوپتوتیک آن را مختل نماید (۱۱).

یکی از شاخص‌ترین خصوصیات Survivin بیان بالا و متمایز آن در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی می‌باشد (۱۲). بیش بیان این ژن در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولون، معده، کلیه، ریه، سینه، کبد، مثانه، تیروئید و نوروبلاستوما مشخص شده است. این در حالی است که در بافت‌های نرمال غیر تکثیر شونده‌ی افراد بزرگسال بیان این ژن غیر قابل تشخیص است (۱۳-۱۸). مشابه Survivin، واریانت Survivin-2a نیز بیان بالایی در سلول‌های سرطانی و تومورهای بدخیم دارد، به طوری که اثرات Survivin علیه مرگ برنامه ریزی شده سلولی را تضعیف می‌کند (۱۹). در حین طراحی این تحقیق، مطالعه جامعی در زمینه بیان واریانت پیرایشی Survivin-2a مخصوصاً در لوسمی، در دنیا و ایران انجام نشده بود. لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی بیان ژن Survivin-2a در سیر بالینی بیماران مبتلا به CML طراحی گردید.

¹ Inhibitor of apoptosis protein

² Alternative splicing

³ Phosphate Buffer Saline

این فاز در مقایسه با افراد سالم $P=0/000007$ را به دست داد که از نظر آماری معنی دار تلقی می‌شود.

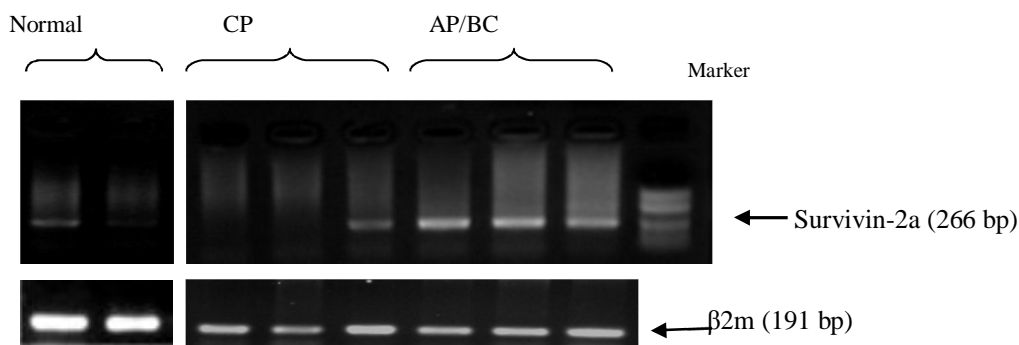
نداد ($P=0/44$)، اما در بیماران فاز AP/BC شدت بیان Survivin نسبت به $\beta 2m$ در مقایسه با افراد سالم و همچنین بیماران فاز CP به طور معنی داری افزایش یافته است. آنالیز آماری مربوط به

جدول شماره (۱): توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن Survivin-2a و Survivin $\beta 2m$

پرایمر $\beta 2m$ (NM004048): قطعه حاصل از PCR، ۱۹۱ جفت باز می‌باشد.
پرایمر جلویی 5'- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3'
پرایمر برگشتی 5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3'
پرایمر های Survivin-2a (AY795969): قطعه حاصل از PCR، ۲۶۶ جفت باز می‌باشد.
پرایمر جلویی خارجی 5'-TGG CAG CCC TTT CTC AAG-3'
پرایمر برگشتی خارجی 5'- AAC CCT CCC ATA CTA AGT GTC -3'
پرایمر جلویی داخلی 5'-ACC ACC GCA TCT CTA CAT TC- 3'
پرایمر برگشتی داخلی 5'- AAC CCT CCC ATA CTA AGT GTC -3'
پرایمر های Survivin (NM001168): قطعه حاصل از PCR، ۵۵۶ جفت باز می‌باشد.
پرایمر جلویی خارجی 5'-TGG CAG CCC TTT CTC AAG-3'
پرایمر برگشتی خارجی 5'-GAG AGA GAG AAG CAG CCA C-3'
پرایمر جلویی داخلی 5'-ACC ACC GCA TCT CTA CAT TC- 3'
پرایمر برگشتی داخلی 5'- CTG GTG CCA CTT TCA AGA C -3'

جدول شماره (۲): مشخصات بیماران مبتلا به CML

تعداد بیماران	۳۰
جنس	۱۷ مرد/۱۳ زن
میانگین سنی	۴۴ سال (۲۴-۶۵)
فاز بیماری	۲۴CP/ ۶AP/BC



شکل شماره (۱): بررسی الکتروفورزی بیان واریانت پیرایشی Survivin-2a در بیماران CML. بیان ژن Survivin-2a با استفاده از فن RT-PCR و الکتروفورز ژل آگارز در بیماران فاز AP/BC و CP (الف) و افراد سالم (ب) مورد بررسی قرار گرفت. شکل ارائه شده نمونه‌ای از نتایج تعدادی از بیماران و افراد سالم می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه نقش Survivin در سرطان‌های مختلف صورت گرفته است. به عنوان مثال بیان بالای Survivin در سرطان‌های کولون، معده، کلیه، ریه، سینه، کبد، مثانه، تیروئید، نوروبلاستوما و نیز در بیماران مبتلا به ALL^۱، AML^۲ و CML گزارش شده است (۲۱-۱۳). بیش بیان Survivin در بیماران مبتلا به لوسمی با بهبودی ضعیف بیماران، پاسخ کم به شیمی درمانی و عود بیماری همراه بوده است (۲۴-۲۲). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که واریانت پیرایشی جدید Survivin-2a به عنوان آنتاگونیست Survivin عمل کرده و خاصیت آنتی آپوپتوتیک آن را تضعیف می‌کند. در نتیجه می‌تواند سلول‌های بدخیم را نسبت به شیمی درمانی حساس تر کند (۱۱). از اینرو مطالعه بیان این واریانت پیرایشی در بیماران مبتلا به CML و بررسی نقش آن می‌تواند حائز اهمیت باشد. در مطالعه حاضر، بیان Survivin-2a در بیماران مبتلا به CML مورد تحقیق قرار گرفت.

نتایج حاصل از این مطالعه، بیان واریانت پیرایشی Survivin-2a را در بیماران مبتلا به CML تأیید کرد. از طرفی، بیان Survivin-2a در بیماران فاز AP/BC در مقایسه با بیماران فاز CP و افراد سالم به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. لذا می‌توان گفت Survivin-2a می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش آگهی دهنده در تشخیص فاز بیماری و میزان پیشرفت CML محسوب شود و به عنوان مارکر تشخیصی و درمانی مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد. همچنین در نتایج حاصل از مطالعه ما مشابه با Survivin-2a، بیان واریانت اصلی Survivin نیز با پیشرفت سیر بیماری از CP به AP/BC افزایش معنی‌داری نشان داد. می‌توان چنین استنباط کرد که بیان بالای Survivin تنها دلیل ایجاد مقاومت دارویی در بیماران CML نمی‌باشد، بلکه در این میان مسیرهای دیگری مثل Survivin-2a نیز باید مورد توجه قرار گیرد. چرا که همراه با افزایش بیان Survivin در فاز AP/BC، بیان واریانت Survivin-2a نیز بالا می‌رود تا خاصیت آنتی آپوپتوتیک Survivin را تضعیف می‌کند.

این یافته مطابق با مطالعات قبلی مبنی بر بیش بیان Survivin-2a در بیماران مبتلا به سرطان معده به همراه افزایش بیان Survivin می‌باشد که مشخص شده است این واریانت پیرایشی نقش عمده‌ای در پیشروی تومور و متاستاز ایفا می‌کند (۲۲). بیان واریانت پیرایشی Survivin-2a در تومورهای مدولوبلاستومای انسانی و نیز رده سلولی Daoy آشکار شده است (۱۱). در مطالعه مشابه، بیان Survivin-2a در نمونه‌های حاشیه تومور تیروئید نسبت به نمونه‌های توموری و غیر توموری بالاتر بوده است (۱۴). در حال تهیه این مقاله گزارشی توسط Speletas و همکاران ارائه گردید که بیان Survivin-2a در بیماران CML را با دید متفاوتی از مطالعه ما بررسی کردند (۲۴). آن‌ها نشان داده‌اند که بیان واریانت پروآپوپتوتیک Survivin-2a به طور معنی‌داری با زیر نوع‌های Bcr-Abl بیماران مرتبط است (۲۴). به طوری که بیماران با زیر نوع b2a2 بیان بسیار بالاتری را در مقایسه با بیماران دارای زیر نوع b3a2 نشان می‌دهند. این یافته توجیه می‌کند که بیماران با زیر نوع b2a2 پاسخ به درمان بهتری نسبت به مهارکننده‌های تیروزین کینازی دارند (۲۴). نتایج حاصل از مطالعه ما مبنی بر افزایش بیان Survivin-2a به همراه Survivin در فاز AP/BC در بیماران CML تحت درمان از دیدی متفاوت نتایج Speletas و همکاران را همپوشانی کرد (۲۴). می‌توان چنین استنباط کرد که بیان بالای Survivin تنها دلیل ایجاد مقاومت دارویی در بیماران CML نمی‌باشد، بلکه در این میان مسیرهای دیگری مثل Survivin-2a و نحوه مکانیسم عمل این واریانت در ایجاد مقاومت بیماران نسبت به دارو، باید مورد تحقیقات بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و امور پژوهشی دانشگاه تبریز که هزینه‌ی قسمتی از طرح را متقبل فرموده‌اند، همچنین از همکاری بیماران محترم و خانواده‌های ایشان و کارکنان زحمت کش بخش خون و نمونه‌گیری بیمارستان شهید قاضی طباطبایی تبریز ابراز می‌دارند.

¹ Acute lymphoid leukemia

² Acute myeloid leukemia

References:

- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, and Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1995; 341 (3): 164-72.
- Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia* 2003; 17: 1211-62.
- Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(7): 973-88.
- Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 1: 453-60.
- Frazer R, Irvine AE, McMullin M. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. *Ulster Med J* 2007; 76 (1): 8-17.
- Hirose M. Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Int J Hematol* 2002; 76 (2): 206-11.
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13 (3): 239-52.
- Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Phathol*, 2004; 41(6): 566-607.
- Ryan BM, O'Donovan N, and Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; 35 (7): 553-562.
- Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 2005; 92 (2): 212-216.
- Caldas H, Honsey LE and Altura RA. Survivin 2a: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol cancer* 2005; 4 (11): 1-9.
- Fukuda S, Pelus LM. Survivin a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006; 5 (5): 1087-98.
- Babaei E, Mowla SJ, Shariat Torbaghan Sh, Emadi Baygi M. Detection of survivin gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of human osteosarcoma: its potential usefulness in diagnosis and prognosis of bone tumors. *Iran Biomed J* 2006; 10 (1): 39-45. (Persian)
- Kyani K, Hosseinpour Feizi MA, Babaei E, Montazeri V, Halimi M. Evaluation of the expression of Survivin-2 α splice variant as a molecular marker in thyroid cancer. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2009; 14 (3): 25-33. (Persian)
- Sarela AI, Macadam RCA, Farmery SM, Markham AM, Guillou PJ. Expression of the anti apoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46 (5): 645-50.
- Vallbohmer D, Drebber U, Schneider PM, Baldus S, Bollschweiler E, Brabender J, et al. Survivin expression in gastric cancer: Association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis. *J Surg Oncol* 2009; 99 (7): 409-13.
- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee AM. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DEX3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer Detect Prevent* 2009; 32 (4): 308-13.
- Tirro E, Consoli ML, Massimino M, Manzella L, Francesco F, Sciacca L, et al. Altered expression of c-IAP, survivin, and smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* 2006; 66 (8): 4263-72.
- Wajapeyee N, Britto R, Ravishankar HM, Somasundaram K. Apoptosis induction by activator protein 2 α involves transcriptional repression of Bcl-2. *J Biol Chem* 2006; 281: 16207-19.
- Conte E, Stagno F, Guglielmo P, Scuto A, Consoli C, Messina A. Survivin expression in chronic

- myeloid leukemia. *Cancer Lett* 2005; 225(1): 105-10.
21. Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, and Kakishita E. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75 (2): 161-5.
22. Sadek H, Ragab S, Rasmy H, Guindy NME, Ezzat W, Hamed M. Expression of the antiapoptotic gene survivin in acute leukemias. *J Am Sci* 2010; 6 (10): 1272-82.
23. Zhengjiang C, Lihua H, Wenrong F, Qin Z and Xiaofeng L. Expression of survivin and its splice variants in gastric cancer. *J Huazhong Univ Sci Tech* 2007; 27(4): 393-8.
24. Speletas M, Argentou N, Karanikas V, Gramoustianou ES, Mandala E, Braimi M, et al. Survivin isoform expression patterns in CML patients correlate with resistance to imatinib and progression, but do not trigger cytolytic responses. *Clin Immunol* 2011; 139 (2): 155-63.