مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۵, شمـاره‌ی ۱۱۲, آذر و دی ۱۳۹۶, صفحات ۴۰ تا ۴۹

ارزیابی میزان بیان ژن GRAF در بیماران B-ALL مراجعه کننده به بیمارستان‌های مشهد و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران

عباس قوطاسلو[۱]، حسن بوستانی[۱]، اسماعیل رستمی[۲]، امید کیانی قلعه سردی[۱]، دکتر محمد هادی صادقیان[۳]

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار a.ghotaslou@gmail.com

دریافت: ۹۵/۷/۱۱ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: *لوسمی لنفوبلاستیک حاد، یک اختلال ناشی از تکثیر بدخیم سلول‌های نابالغ لنفوئیدی است. GRAF (GTPase regulator associate with focal adhesion kinase) به‌عنوان یک ژن سرکوبگر تومور عمل می‌کند و در بدخیمی‌های خونی به وسیله‌ی ناهنجاری‌های ژنتیک و اپی‌ژنتیک غیرفعال می‌شود. لذا با توجه به اهمیت آن در مطالعه‌ی حاضر بیان ژن GRAF در بیماران مبتلا به B-ALL مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *نمونه خون محیطی از ۶۰ بیمار مبتلا به B-ALL و ۳۰ فرد سالم به عنوان شاهد گرفته شد. RNA استخراج و cDNA سنتز شد. بیان ژن GRAF به کمک تکنیک Real time PCR بررسی گردید و ارتباط بین بیان ژن GRAF و یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *بیان ژن GRAF در بیماران نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود (۰/۸۷ برابر). تعداد بیمارانی که کاهش بیان ژن GRAF در آنها وجود داشت ۷۳/۴ درصد (۴۴ از ۶۰ بیمار) بودند. بیان ژن GRAF در زیر گروه‌های مرفولوژیکی FAB اختلاف چشمگیری نداشت.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد بیان ژن GRAF در لوسمی حاد لنفوئیدی مانند لوسمی‌های حاد میلوئیدی دچار کاهش بیان می‌شود. این کاهش بیان می‌تواند موید نقش سرکوب کنندگی تومور برای GRAF در لوسمی‌های حاد باشد.*

واژگان کلیدی: ***GRAF ، لوسمی حاد، Real time PCR ، ALL***

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد یا لوسمی/لنفوم لنفوبلاستیک، یک تکثیر بدخیم سلول‌های نابالغ لنفوئید است که از تغییرات ژنتیکی چند مرحله‌ای در یک سلول پروژنیتور لنفوئیدی ناشی می‌گردد. بیشترین رخداد آن در سنین ۲ تا ٤ سال و به میزان کمتر در اواخر کودکی، نوجوانی و بالغین جوان مشاهده می‌گردد. تغییرات ژنتیکی اکتسابی که در بروز

۱- دانشجوی دکترای هماتولوژی و علوم انتقال خون، کمیته‌ی پژوهشی دانشجویی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار
۳- متخصص پاتولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

ALL نقش دارند شامل نقص در تنظیم ژن‌های کد کننده‌ی فاکتورهای رونویسی و مولکول‌های پیام رسانی می‌باشند که منجربه از بین رفتن هومئوستاز سلول خونساز می‌شود و نیز آسیب ژن‌های کدکننده تنظیم‌گرهای کلیدی در تمایز سلول‌های لنفوئیدی است. به‌طوری که تغییر در این ژن‌ها باعث توقف و تاخیر در تمایز پروژنیتور سلول B نرمال می‌شوند و بنابراین در ایجاد لوسمی شرکت می‌کنند (۳-۱). GRAF(GTPase regulator associated with FAK) یک پروتئین سرکوب کننده‌ی تومور است که ژن آن روی بازوی بلند کروموزوم ۵(5q) واقع شده و به‌طور مداوم در بافت‌های مختلف بیان دارد. پروتئین کد شده به وسیله‌ی آن، به‌طور اختصاصی به مناطق غنی از پرولین انتهای کربوکسیلی FAK (focal adhesion kinase) متصل شده و باعث تنظیم منفی پروتئین RhoA می‌شود. FAK یک تیروزین کیناز غیر رسپتوری است که نقش مهمی در تنظیم رشد، تکثیر، زنده ماندن و مهاجرت سلولی دارد (٦-٤). FAK در تنظیم سیگنال، اینتگرین‌ها، سایتوکاین‌ها، رسپتور فاکتورهای رشد و انکوژن‌ها نقش دارد. اختلال در عملکرد FAK در سلول‌های سرطانی مرتبط با متاستاز، مقاومت به درمان و پیش آگهی بد است (۸و ۷). GRAF باعث تغییر در اسکلت سلولی به‌واسطه‌ی پروتئین‌های خانواده Rho می‌شود. خانواده Rho به خانواده بزرگ RAS متعلق بوده و شامل پنج عضو از پروتئین‌های متصل شونده به GTP است. خانواده GTPase Rho نقش مهمی در کنترل رشد سلولی به واسطه‌ی تنظیم سازماندهی اسکت سلولی دارند (۱۱-۹). RhoA با مهار فعالیت p27(Kip) p21(Cip1) و p16(Ink4) منجر به پیشرفت چرخه‌ی سلولی می‌گردد (۱۴-۱۲). مطالعات نشان داده‌اند فعالیت مداوم RhoA می‌تواند منجر به ترانسفورم شدن سلول‌ها شود.مطالعات بالینی اخیرحاکی از ارتباط افزایش بیان RhoA با متاستاز و پیشرفت تومورهای توپر از قبیل کبد، مثانه، مری، سر و گردن، تخمدان، معده، ریه وسینه است (۱۵). همان‌طور که عنوان شد GRAF با مهار RhoA باعث فعال شدن پروتئین P21 می‌شود که منجر به مهار چرخه سلولی و کاهش تکثیر می‌شود. مطالعات انجام شده حاکی از کاهش بیان ژن GRAF در بیماران با لوسمی میلوئیدی است. همچنین مطالعات دیگر نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن GRAF مرتبط با پیش اگهی بهتر در بیماران لوسمی حاد میلوئیدی است (۱٦و٥). با توجه به این نکته که تا کنون بیان ژن GRAF در بیماران ALL در ایران بررسی نشده است مطالعه حاضر به‌منظور بررسی میزان بیان ژن GRAF در بیماران لوسمی حاد لنفوبلاستیک و ارتباط آن با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران انجام شد.

روش بررسی

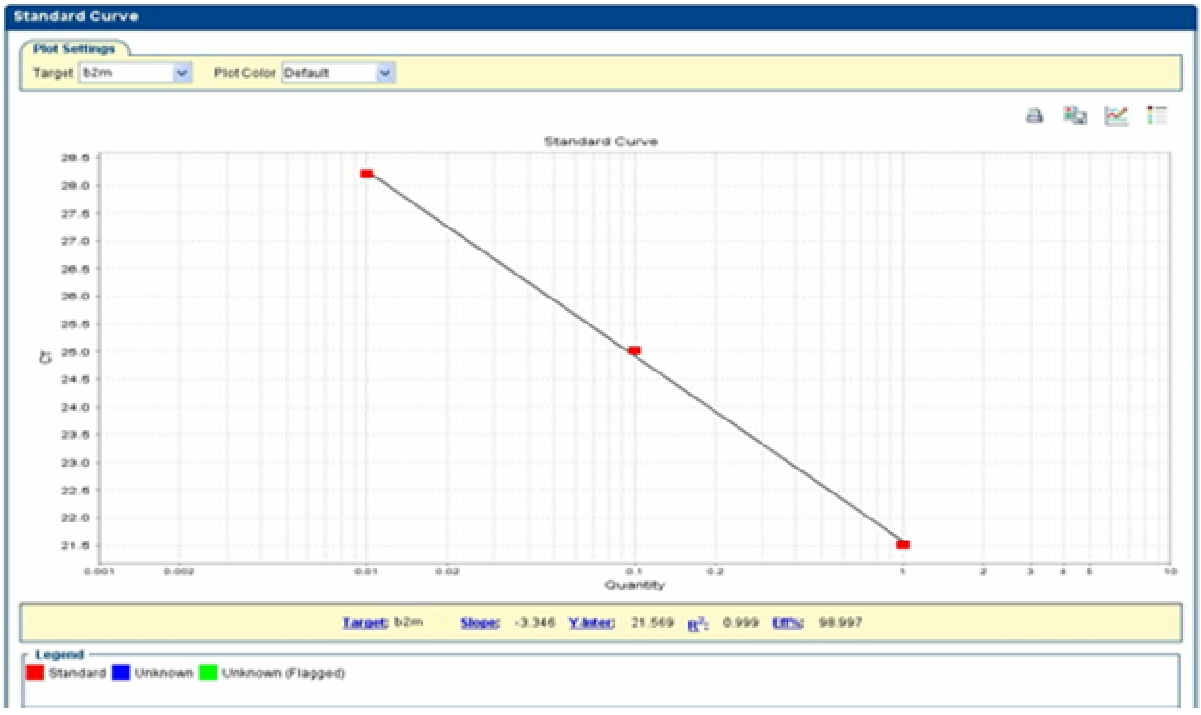
مطالعه حاضر بر روی ۶۰ بیمار با B-ALL که به تازگی تشخیص داده شده بودند (بیماران هیچ دارویی دریافت نکرده بودند) و ۳۰ فرد سالم به‌عنوان شاهد که به بخش هماتولوژی بیمارستان قائم مشهد مراجعه کرده بودند، انجام شد و با شماره کد اخلاق ۴۱-۱۳۹۱ تایید گردید. در بیمارستان قائم مشهد طبقه بندی بیماران زیر نظر متخصصین هماتولوژی و پاتولوژی و بر اساس معیارهای WHO (مورفولوژی، سیتوشیمی، ایمونوفنوتایپ و سیتوژنتیک) انجام گردید و در صورت عدم وجود ترانس لوکیشن‌هایی که در جدول ۴ ذکر شده است، گزارش نهایی بر اساس ایمونوفنوتایپ و مورفولوژی انجام شد. اطلاعات بیماران شامل شمارش گلبول سفید، شمارش پلاکت، غلظت هموگلوبین، سن، جنس، وضعیت طحال بیماران و نتایج بررسی‌های سیتوژنتیک از پرونده‌ی پزشکی بیماران استخراج شد. از تمامی افراد مورد مطالعه بعد از کسب رضایت نامه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. بعد از نمونه‌گیری سلول‌های تک هسته‌ای به وسیله‌ی سدیمنتاسیون گرادیان غلظت با استفاده از

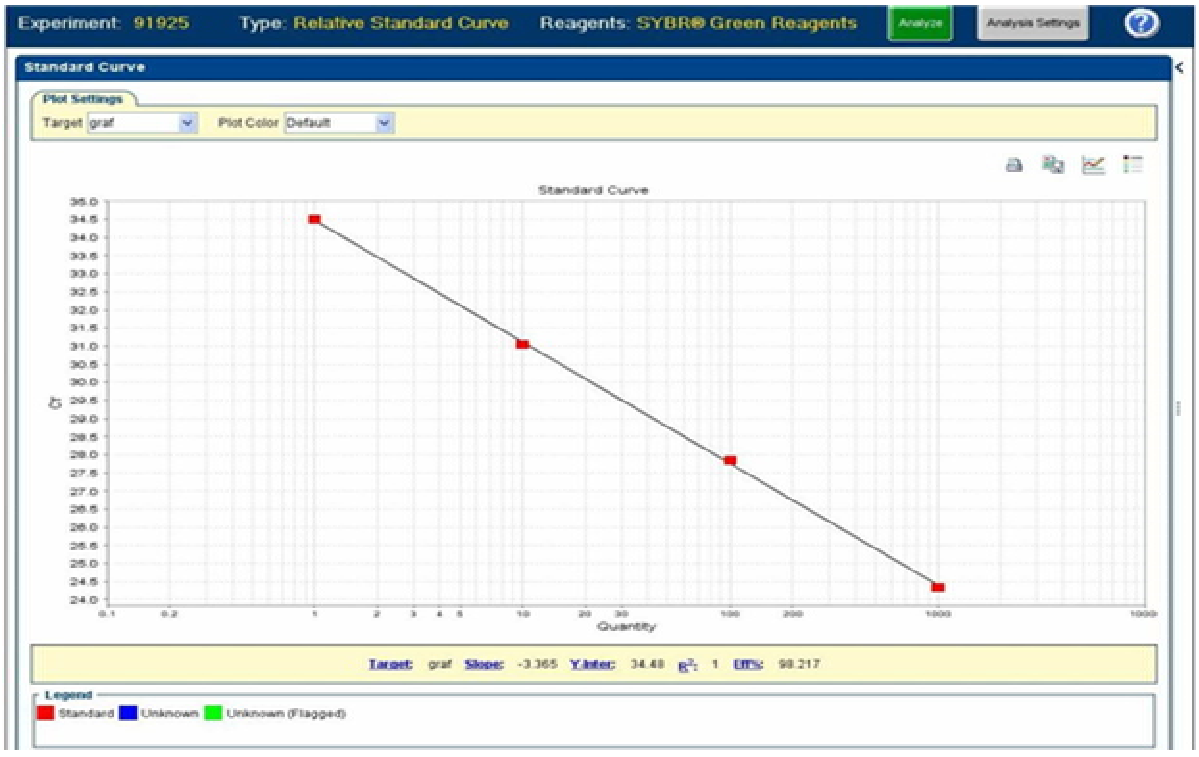
Ficoll-hypaque جدا شدند. سپس RNA با استفاده از ترایزول (Sigma ,USA) استخراج و از RNA جدا شده cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (کیت شرکت Fermentas و دستگاه Corbett) و با استفاده از رندوم هگزامر سنتز شد. ارزیابی میزان بیان ژن GRAF در نمونه بیماران و گروه شاهد به کمک تکنیک Real time-PCR و به‌صورت دوتایی (duplicate) انجام گردید. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه۲ در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه شامل ژن کنترل (Housekeeping gene) و ژن مورد بررسی

Gene symbol	Sequence (5' to 3')	Primer
GRAF	ATTCCAGCAGCAGCTTACA	Forward
GRAF	GATGAGGTGGGCATAGGG	Reverse
β2M	CAGCAAGGACTGGTCTTTCTAT	Forward
β2M	CAGCAAGGACTGGTCTTTCTAT	Reverse

توالی این پرایمرها در مطالعات قبلی طراحی شده بودند. به منظور اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها از سرویس BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) سایت NCBI استفاده شد و اختصاصیت آنها تایید گردید. میزان بیان ژن GRAF به کمک روش SYBR® Green (کیت شرکت TAKARA) و آنالیز نسبی بیان ژن به کمک روش $2^{\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. با محاسبه از طریق فرمول $FOLD\ CHANGE= 2^{-\Delta\Delta CT}$ بیمارانی که FOLD CHANGE>1 داشتند از نظر بیان ژن به‌عنوان افزایش بیان ژن و بیمارانی که FOLD CHANGE<1 داشتند از نظر بیان ژن به‌عنوان کاهش بیان ژن در نظر گرفته شدند.





شکل ۱: منحنی استاندارد ژن β2M و GRAF (efficiency برای ژن مرجع ۹۸/۹۹۷ و برای ژن GRAF برابر با ۹۸/۲۱۷ است.

شکل ۲: نمایش Amplification plot برای رقت‌های مختلف استاندارد ژن GRAF

به‌منظور افزایش اختصاصیت محصولات واکنش منحنی ذوب بعد از هر نوبت کاری رسم شد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ از پرایمر ژن‌های GRAF و β2M تهیه و بعد از انجام تست منحنی تکثیر رسم شد (شکل ۱ و۲). آنالیز نتایج مطالعه به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و به‌کمک تست‌های Kolmogorov–Smirnov و Chi-Square independent sample t-test انجام گردید و P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از ۶۰ بیمار مبتلا ۳۵ بیمار مرد (۵۸/۳ درصد) و ۲۵ بیمار زن (۴۱/۶ درصد) و نیز در گروه کنترل ۱۵ نفر مرد (۵۰ درصد) و ۱۵ نفر زن (۵۰ درصد) بودند. محدوده‌ی سنی بیماران ۱ تا ۲۹ سال و میانگین سنی بیماران ۱۵ سال بود. از نظر طبقه بندی FAB ۴۰ بیمار (۶۶/۶ درصد) از گروه ALL-L1 و ۲۰ بیمار (۳۳/۳ درصد) از گروه ALL-L2 بودند. کاهش بیان ژن GRAF در بیماران نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P value= ۰/۰۳). همچنین میانگین بیان ژن GRAF در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نسبت به کنترل کاهش یافته بود (۰/۸۷ برابر). تعداد بیمارانی که کاهش بیان ژن GRAF در آنها وجود داشت ۷۳/۴ درصد (۴۴ از ۶۰ بیمار) بود. از نظر یافته‌های بالینی تب در ۳۷ درصد، اسپلنومگالی در ۳۵ درصد، هپاتومگالی در ۲۶/۷ درصد، لنفادنوپاتی در ۳۳/۳ درصد و پتشی و پورپورا در ۶/۷ درصد بیماران وجود داشت. ارتباط معنی‌داری بین یافته‌های بالینی بیماران و میزان بیان ژن GRAF وجود نداشت (جدول ۲).

جدول ۲: ارتباط بین Fold change ژن GRAF و علایم بالینی

علایم بالینی		GRAF Fold change	مقدار P
تب	دارد	۰/۹±۱/۲۳	۰/۶۷۷
	ندارد	۰/۸±۱/۲۴	
لنفادنوپاتی	دارد	۱/۱۷±۱/۸۴	۰/۹۶۲
	ندارد	۰/۷۳±۰/۷۵	
اسپلنومگالی	دارد	۰/۶۴±۰/۷۸	۰/۵۱۴
	ندارد	۱/۰۱±۱/۴۱	
هپاتومگالی	دارد	۰/۷۸±۰/۹۱	۰/۹۹۰
	ندارد	۰/۹۱±۱/۳۲	
پتشی - پورپورا	دارد	۰/۳۰±۰/۲۸	۰/۳۶۸
	ندارد	۰/۹۲±۱/۲۶	

شمارش گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها و غلظت هموگلوبین در بیماران و ارتباط آن با زیر گروه‌های FAB میزان بیان ژن GRAF در بیماران در جدول ۳ نشان داده شده است. ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن GRAF و پارامترهای آزمایشگاهی و زیرگروه‌های FAB وجود نداشت. همچنین در مطالعه حاضر بیماران از نظر اختلالات سیتوژنتیکی مانند t(12;21)، t(9;22) و t(1;19) بررسی شدند که ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن GRAF و این اختلالات وجود نداشت (جدول ۴).

جدول ۳: ویژگی‌ها و یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران

ویژگی	FAB Type		میزان بیان ژنGRAF		مقدار P
	L1	L2	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن	
(%) تعداد بیماران	**40(66/6)**	**20(33/4)**	**16(26/6)**	**44(73/4)**	
مرد	**23**	**12**	**9**	**28**	
زن	**17**	**8**	**7**	**12**	
شمارش گلبول سفید (10^9/L, median)	**47/57**	**53/41**	**48/11**	**50/15**	**0/542**
شمارش پلاکت (10^9/L, median)	**203/178**	**112/957**	**118/345**	**200/122**	**0/167**
هموگلوبین g/dL (median)	**7/8**	**8/0**	**8/1**	**7/9**	**0/394**

جدول ۴: بررسی ارتباط بین Fold change ژن GRAF و ناهنجاری‌های ژنتیکی

اختلال کروموزومی		تعداد	GRAF Fold change	مقدار P
t(12;21)	دارد	9	0/82±0/83	0/591
	ندارد	51	0/89±1/29	
t(9;22)	دارد	8	0/47±0/41	0/637
	ندارد	52	0/94±1/30	
t(1;19)	دارد	5	0/27±0/37	0/368
	ندارد	55	6/37±11/69	

بحث

مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه در بیماران ایرانی با لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL) بود که نشان داد بیان ژن GRAF در بیماران نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داشته است.GRAF پروتئینی است که شامل سه دومین؛ ۱- GAP (GTPase activating protein)، ۲- دومین غنی از سرین/پرولین و ۳- دومین همولوژی با Src (SH3) است. دومین GAP از GRAF باعث افزایش هیدرولیز GTP در محیط آزمایشگاهی و نیز دومین SH3 به ناحیه غنی ازپرولین از کیناز FAK متصل می‌شود (۱۸و ۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که مهار FAK در سلول‌های ترانسفورم شده با رونوشت BCR/ABL منجر به مهار تومور زایی می‌گردد. GRAF باعث تنظیم منفی پروتئین (Ras homolog gene RhoA(family, member A که نوعی پروتئین متصل شونده به GTP است، می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین RhoA در فرآیندهایی مانند آپوپتوز، مهاجرت، تکثیر

و تمایز سلولی نقش دارد (۲۰و ۱۹). RhoA با مهار فعالیت p21 p27 و p16 منجر به پیشرفت چرخه سلولی می گردد. همان طور که عنوان شد GRAF با مهار RhoA باعث فعالیت پروتئین P21 می‌شود که منجر به مهار چرخه سلولی و کاهش تکثیر می‌شود (۲۲و ۲۱و ۱٤و ۱۲). بر این اساس کاهش بیان ژن GRAF منجر به افزایش اثر مهاری RhoA روی p21 و در پی آن افزایش تکثیر سلولی می‌گردد. عدم بیان یا کاهش بیان ژن GRAF ناشی از جهش، حذف و یا متیله شدن ژن آن در بدخیمی‌هایی مانند AML و MDS مشاهد شده است. مطالعه الای و همکاران برای اولین بار نشان داد که افزایش بیان ژن GRAF در بیماران لوسمی حاد مرتبط با پیش آگهی خوب است به‌طوری که افزایش بیان ژن GRAF مرتبط با میزان بهبودی کامل بیشتر و مقاومت دارویی کمتر است (۱۶). در مطالعه کیان و همکاران بر روی بیماران مبتلا به بدخیمی‌های میلوئیدی، مشاهده شد بیان ژنGRAF در این بیماران نسبت به افراد سالم به طور چشمگیری پایین تر است ولی در بیماران CML تفاوتی بین بیان ژن GRAF و نمونه‌های کنترل وجود نداشت .در مطالعه دیگری که همین گروه روی بیماران مبتلا به AML انجام دادند مشاهده شد که بیان ژن GRAF در هردو گروه بیمارانی که ژن GRAFمتیله شده داشتند وبیمارانی که ژن GRAF غیر متیله داشتند نسبت به گروه کنترل کمتر بود و نتیجه کلی که به دست آوردند این بود بیان ژن GRAF در AML کاهش می‌یابد که این امر ممکن است در لکوموژنز نقش داشته باشد (۱۷). در بررسی که بوجسن و همکاران روی بیماران مبتلا به AML و MDS انجام دادند مشاهده شد که پروموتور ژن GRAF در ۱۱ بیمار (۳۹ درصد) متیله شده بود در حالی که متیلاسیون پرموتور ژن GRAF در گروه کنترل در ۳ موارد موارد دیده شد که خود موید نقش تومور ساپرسوری GRAF در بدخیمی‌های میلوئید بود (۲۳).

نتیجه‌گیری

نتیجه‌ی کلی این که مطالعه حاضر نشان داد که کاهش بیان ژن GRAF در بیماران لوسمی حاد لنفوبلاستیک مانند لوسمی‌های حاد میلوئیدی رخ می‌دهد. این کاهش بیان می‌تواند موید نقش سرکوب کنندگی تومور برای GRAF در لوسمی‌های حاد باشد. با این حال ارتباط آماری معنی‌داری بین کاهش بیان ژن GRAF و پارامترهای آزمایشگاهی و بالینی بیماران مشاهده نشد. با این وجود با توجه به اهمیت و نقش تومور ساپرسوری GRAF پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری با تعداد نمونه‌ها و ژن‌های بیشتر جهت مشخص شدن نقش ژن GRAF در پاتوژنز لوسمی حاد لنفوبلاستیک و ارتباط آن با پارامترهای آزمایشگاهی و بالینی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که هزینه اجرای مطالعه حاضر را تامین نموده است قدردانی نمایند.

References

1- Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nature Rev Clin Oncol.* 2015; 12: 344-57.

2- Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N E J Med.* 2015; 373: 1541-52.

3- Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *J Nat Comprehensive*

Cancer Network. 2012; 10: 858-914.
4- Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, et al. The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t (5; 11)(q31; q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; 97: 9168-73.
5- Qian Z, Qian J, Lin J, et al. GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase (GRAF) transcript was down-regulated in patients with myeloid malignancies. *J Exper Clin Cancer Res.* 2010; 29: 1.
6- Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress Biophysics Molec Biol.* 1999; 71: 435-78.
7- Avraham H, Park S-Y, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cellular Signalling.* 2000; 12: 123-33.
8- McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nature Rev Cancer.* 2005; 5: 505-15.
9- Taylor JM, Macklem MM, Parsons JT. Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J Cell Sci.* 1999; 112: 231-42.
10- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nature Rev Drug discover.* 2007; 6: 541-55.
11- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002; 420: 629-35.
12- Vidal A, Millard SS, Miller JP, Koff A. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biologic Chem.* 2002; 277: 16433-40.
13- Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown JH. Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27Kip1 expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circulation Res.* 2001; 89: 488-95.
14- Liberto M, Cobrinik D, Minden A. Rho regulates p21 (CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene.* 2002; 21: 1590-9.
15- Qian Z, Lin J, Qian J, et al. Quantification of GRAF gene expression in patients with acute myeloid leukemia using EvaGreen real time quantitative PCR. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi.* 2010; 27: 290-3.
16- Aly RM, Ghazy HF. High expression of GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase (GRAF) is a favorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. Blood Cells Mol Dis. 2014; 53: 185-8.
17- Qian J, Qian Z, Lin J, et al. Abnormal methylation of GRAF promoter Chinese patients

with acute myeloid leukemia. Leukemia research. 2011; 35: 783-6.

18- Benitah SA, Valerón PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1705: 121-32.

19- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nature Cell Biol. 2000; 2: 249-56.

20- Le Y, Xu L , Lu J, et al. FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. Am J Hematol. 2009; 84: 273-8.

21- Aznar S , Fernández-Valerón P, Espina C , Lacal JC. Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy. *Cancer letters.* 2004; 206: 181-91.

22- Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature.* 1998; 394: 295-9.

23- Bojesen S, Ammerpohl O, Weinhäusl A, et al. Characterisation of the GRAF gene promoter and its methylation in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Cancer.* 2006; 94: 323-32.

Evaluation of GRAF Gene Expression in Patients with B-ALL Referred to Mashhad Hospitals and Its Relationship with Clinical and Laboratory Findings

Ghotaslou A[1], Boustani H[1], Rostami E[2], Kiani Ghalesardi O[1], Sadeghian MH[3]

[1]Student Research Committee, Faculty of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2]Dept. of Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

[3]Cancer Molecular Pathology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***Corresponding Author**:* Rostami E, Dept. of Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

E-mail: a.ghotaslou@gmail.com

Received: 2 Oct 2016 **Accepted:** 5 Feb 2017

Background and Objective: Acute lymphoblastic leukemia is a disorder caused by the proliferation of malignant immature lymphoid cells. GRAF (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase) which acts as a tumor suppressor gene is disabled in hematologic malignancies due to genetic and epigenetic abnormalities. In this study, GRAF gene expression was inspected in patients with B-ALL.

Materials and Methods: Peripheral blood samples from 60 patients with B-ALL and 30 healthy controls were collected. DNA was extracted and cDNA was synthesized. GRAF gene expression was measured using Real-Time PCR and the relationship between GRAF expression and clinical and laboratory findings were investigated.

Results: GRAF gene expression was significantly decreased in patients compared to the control group (0.87). The number of patients who had a reduction in their GRAF gene expression was 73.4% (44 of 60 patients). GRAF expression had no significant difference in the FAB morphological subtypes.

Conclusion: Results of this study showed that GRAF gene expression is decreased in acute lymphoblastic leukemia. The reduction in GRAF gene expression confirms its tumor suppressive role in this leukemia.

Key words: GRAF, Acute Leukemia, Real-Time PCR, ALL