Research Paper

Relationship Between ZAP-70 Gene (rs104893674 "A/C") Polymorphism With Risk for Acute Myeloid Leukemia

Masoomeh Rahimzadeh1, *Siroos Naeimi3, Mohammad Mahdi Moghanibashi1, Khalil Khashei Varnamkhasti1

1. Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Background and Aim
In acute myeloid leukemia, a large number of immature cells develop, which can related to some single nucleotide polymorphisms presence in positions of genes that encodes enzymes involved in cell activation and evolution signaling pathways. In this study, the association of rs104893674 (A/C) polymorphism with the risk of Acute Myeloid Leukemia (AML) in samples obtained from Fars and Isfahan Province hospitals was investigated.

Methods & Materials
In the present case-control study conducted at Islamic Azad University of Kazerun in 2019, 94 AML patients and 99 age and sex-matched healthy individuals were enrolled. The rs104893674 (A/C) polymorphism was determined by Tetra Primer ARMS PCR method. Data were analyzed by SPSS (version23) software using Chi-square statistical test.

Ethical Considerations
This study with research ethics code IR.IAU.KAU.REC.1398.051 has been approved by Research Ethics Committee of Islamic Azad University of Kazerun.

Results
The results of this study showed a significant, allele and genotype-specific Association between rs104893674 (A/C) polymorphism with risk of AML. Thus, there are more likely to develop AML in AC genotype, individuals with A allele at this polymorphic site (P=0.000).

Conclusion
The association of acute myeloid leukemia with the genetic polymorphism of the ZAP-70 protein can be considered as an option for prognosis of this complication in susceptible individuals.

Keywords:
Acute myeloid leukemia, ZAP-70, Leukemia, Polymorphism

Extended Abstract

1. Introduction

Acute myeloid leukemia, with an annual incidence of about 3.5 per 100,000 people, is the most common form of acute leukemia in adulthood [4, 5]. In this heterogeneous cancer, in terms of phenotype and genotype, due to genetic changes in blood precursor cells, the natural growth and differentiation of these cells is altered and causes the accumulation of abnormal and immature myeloid cells in the bone marrow and peripheral blood [6].

Polymorphisms in a gene locus expressing proteins involved in the development and activation of myeloid cells may play a role in the immaturity of these cells. The ZAP-70 gene provides instructions for the production of the zeta-chain-dependent protein kinase, which is part of the signaling pathway for the evolution and activation of blood cells. rs104893674 (A/C) is a single nucleotide polymorphism of the ZAP-70 gene, which due to its location inside the exon can directly increase

*Corresponding Author:
Siroos Naeimi, PhD.
Address: Department of Genetics, Colleague of Science, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
Tel: +98 (917) 1391420
E-mail: naeimis@kau.ac.ir
or decrease the function of the gene and subsequently increase or decrease the susceptibility to disease.

2. Materials and Methods

This case-control study was performed on 94 patients with acute myeloid leukemia as a case group and 99 healthy individuals as a control group. All adults with acute myeloid leukemia diagnosed by a specialist were included in the patient group. Also, people without cancer who were age- and sex-matched with cancer patients were included in the control group. Individuals with a history of any internal disease were excluded from the study. A total of 5 ml of peripheral blood was collected from the subjects. DNA was then extracted by “salting out” method and transferred to the freezer at -20°C. The quality of the extracted DNA was determined on 1% agarose gel and the rs104893674 (A/C) polymorphism was determined using Tetra-primer ARMS PCR technique. Data were analyzed using SPSS v. 23 and Chi-square statistical test.

3. Results

The results of Tetra-primer ARMS PCR test showed 169 bp amplified fragments for CC genotype and 237 bp for AC genotype resulting from ZAP-70 gene amplification at position rs104893674 (A/C). Since no AA genotype was found in the samples, no amplified product was shown on the gel. The results of chi-square test showed a significant relationship between the control group and the patient group in the frequency of both alleles A and C in the polymorphism rs104893674 position (P=0.000). There was a significant relationship between the control group and the patient group in the frequency of CC and AC genotypes in the polymorphism rs104893674 position (P=0.000) (Table 1 & 2).

4. Discussion and Conclusion

In acute leukemia, the bone marrow produces large amounts of immature white blood cells, and the normal production of white blood cells stops, leading to a loss of...
the body’s ability to fight disease [2]. Given that research has linked leukemia to genetics, one of the most important and accurate ways to diagnose and predict the disease is to use people’s DNA and genetic information [15].

Following the argument that rs104893674 mononucleotide polymorphism is located within the exon and can directly increase or decrease gene function and consequently increase or decrease susceptibility to disease, the results of the present study are significantly associated with genotypic specificity and showed an allele for rs104893674 polymorphism with a risk of acute myeloid leukemia. It was found that people with AC genotype and “A” allele in this polymorphic position are more prone to acute myeloid leukemia. Therefore, considering the significant association of rs104893674 polymorphism with the risk of acute myeloid leukemia, it can be concluded that genetic markers are strong predictive strategies with high sensitivity for early detection of acute myeloid leukemia (Figure 1).

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was ethically approved by the ethics committee of the Vice Chancellor for Research, Islamic Azad University, Kazerun Branch (Code: IR.IAU.KAU.REC.1398.051).

Funding

The present paper was extracted from the Msc. thesis of the first author, Department of Genetics, Faculty of Science, Kazerun Branch, Islamic Azad University.

Authors’ contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Vice Chancellor for Research of the Azad University, Kazerun Branch and all who helped with this research.
ارتباط پلی مورفیسم Zn70 (A/C) با خطر ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد

مقدمه

لوسمی، بیماری پیش رونده و بدخیم اعضای خون ساز بدن است. از کل سرطان ها به خود، پنجمین سرطان شایع جهان و بعد از سرطان معده شایع ترین سرطان در ایران محسوب می شود. لوسمی را می توان به دو نوع حاد و مزمن منشأگرفته از دو رده اصلی سلول های خونی یعنی رده های میلوئیدی و لنفوئیدی تقسیم بندی کرد. در این بین لوسمی حاد میلوئیدی با بروز آن در هر صد هزار نفر، شایع ترین شکل لوسمی و ۳/۵ از هر سالانه حدود ۱۸۳۰۰ اروپا تقریباً محصور می شود. در این سرطان هتروژن از لحاظ فنوتیپ و ژنوتیپ، در اثر تغییرات ژنتیکی در سلول های پیش ساز خونی، رشد و تمایز طبیعی این سلول ها دچار تغییر شده و بدتر تجویز سلول های میلوئیدی خونی خود را در راه است. سلول های محلول محلول می شوند، و تکثیر به درجه تغییرات انتقالی و تبدیل سلول های خون ساز بالغ را ندارند. سالانه در ایران و اروپا حدود ۱۸۳۰۰ اروپا تقریباً سالانه لوسمی حاد با خطر ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد تولید مشاهده می شود. لوسمی حاد میلوئیدی با شایعت بیشتر در مردان نسبت به زنان به عنوان دومین سرطان خون در ایران به ۱۸/۵۰ درصد و سومین سرطان خون کشنده در ایران به شمار می رود. در این سرطان های وارداتی تغییرات نسبت به لوسمی میلوئیدی حاد تخمین می شود. 

در این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن ZAP-70 با خطر ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در نمونه های لوسمی میلوئیدی حاد می باشد. به دست آمده از بیمارستان های دو استان فارس و اصفهان بود.

همچنین این مطالعه تأثیر این پلی مورفیسم در سلول های میلوئیدی حاد در ورود سلول نابالغ در سلول های پیش ساز خونی و اثر این پلی مورفیسم در سلول های پیش ساز خونی در اثر قطعه‌بندی و یا اعمال قطعه‌بندی را بررسی می کند.

پژوهشگران این پلی مورفیسم را در طبقه بندی گروه‌های زنده و مرده در سلول های پیش ساز خونی تغییرات انجام دادند. نتایج حاکی از وجود ارتباط معنی دار همراه با اختصاصیت ژنوتیپی و آدلای پلی مورفیسم یافته ها در این موقعیت A و Dارای آدلای AC با استعداد ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد بود.

در نهایت، پژوهشگران میزان ارتباط پلی مورفیسم ژن ZAP-70 با خطر ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد را با استفاده از روش DNA استخراج و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل توصیف کردند. نتایج نشان داد که افراد با ژنوتیپ ناسب میتواند به عنوان گزینه ای برای درمان لوسمی میلوئیدی حاد هستند. 

کلیدواژه ها: لوسمی میلوئیدی، لوسمی، ZAP-70، پلی مورفیسم
مواد و روش‌ها

آن مطالعه مورد - همانی روی ۱۷۳ فرد مبتلا به لوسمی میلوئیدی پروتئین ZAP-70 در سال ۲۰۱۰، برای آلل میکرومیکرولیتر با واحد نمونه سنجی شد. برای این منظور، نمونه‌های خونی از هماهنگی افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی و بیماران سالم بدون لوسمی میلوئیدی استخراج شد و در حجم نهایی پروتئین ZAP-70 افزایش یافت. تعداد افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی و بیماران سالم بدون لوسمی میلوئیدی در این مطالعه به ترتیب ۹۹ و ۳۶ نفر بودند. جنس با نمونه‌های سرطانی همسان شدند وارد گروه کنترل (مورد) شدند. همچنین افراد فاقد سرطان که از نظر سن و جنس با نمونه‌های سرطانی همسان شدند وارد گروه کنترل (مورد) شدند. برای اخذ رضایت نامه از افراد مورد مطالعه و پر کردن پرسش نامه، فردان سالم به عنوان فرد مبتلا به لوسمی به‌عنوان یک صفت پذیرفته می‌شدند.

پس از اخذ رضایت‌نامه و تهیه امضاء بر دسته‌بندی، به‌عنوان پروتئین ZAP-70، با استفاده از روش PCR با نرم‌افزار Macrogen (جنوب‌شرقی آمستردام) انجام گردید.

### مواد و روش‌ها

- **پروتئین ZAP-70:** از ۱۷۳ نمونه مبتلا به لوسمی میلوئیدی و ۱۷۳ نمونه سالم استخراج شد.
- **PCR Master:** از تیتر PCR Master (Amplicon, Odense, Denmark) خریداری شد.
- **رکتاژ PCR:** از ۱۲۰ گروه Rotor-Gene ۲۰۰۰ (Corbett Research، Wellington) استفاده شد.
- **پرایمر‌ها:** از پرایمر‌های که بر اساس توالی زنجیره آماده شده بودند.
- **پرکسیونر:** آزمایشگاه Macrogen (جنوب‌شرقی آمستردام) استفاده شد.

### روش‌های اجرایی

1. **ایجاد نمونه:** نمونه‌های نیتریک اسیدرپیدر (HCl) و آب مقدار استریل، به طور جداگانه، استفاده شد.
2. **افزایش PCR:** با استفاده از پرایمر‌های ZAP-70، استفاده شد.
3. **ساخت کرک میکره:** پرایمر‌های ZAP-70 از تیتر PCR Master (Amplicon، Odense، Denmark) به‌عنوان پرکسیونر استفاده شد.
4. **بررسی با نرم‌افزار:** با استفاده از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه ژنی تیروزین‌های ملکول‌های آداپتور، در پروتئین ZAP-70 پیدا شد.

### نتایج

نتایج نشان داد که نحوه تغییر تغییرات پلی‌مورفیسم در موقعیت کروموزومی ممکن است، باعث تغییر در کیفیت استخراج شده روی ژل آگارز و میکروبلیتر می‌شود. این تغییرات ممکن است باعث تغییر در شاخص‌های لوسمی میلوئیدی حاد به عنوان گروه مورد و نظیر در مطالعه مورد شاهدی روی بیمارستان‌های دو استان فارس و اصفهان از مهر ۹۹ تا شهریور ۹۹ می‌باشند.

### جدول

| شماره | میکروبلیتر | مرد | زن |
|-------|-------------|-----|----|
| 1     | ۵۴/۳۵       | ۶۸/۵۴ | ۶۸/۶۴ |

**توجه:** جدول بالا نشان می‌دهد که تعداد افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی در گروه رضایت‌نامه برقراری بوده و نیز تعداد افراد سالم در گروه کنترل بوده است.
یافته‌ها

انتظار از این پژوهش ذکر شده که تکثیر DNA در موقعیت ZAP-70 حاصل از تکثیر ژن ZAP-70- SMRA محصول می‌شود. از آنجایی که در بین rs104893674 (A/C) در موقعیت پلی‌مورفیسمی C و A مقدار بسیار زیادی سلول‌های سفید خونی نارس تولید می‌کند و تولید طبیعی سلول‌های سفید خونی از موارد مصرف‌های دل‌دار به نظر می‌رسد، که به این دلیل که به دلیل اینکه دچار خطر ابتلا به لوسمی می‌شوند و در موقعیت C در آزمون ممتاز کای صورت گرفت.

جریمی و دمای دنده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٣ و آزمون آماری مجذور کای صورت گرفت.

یافته‌ها

Tetra Primer ARMS PCR

نتایج تکثیر DNA مراجعه‌دهنده rs104893674 با حلول ١٨٩ جفت از پروپانویل ZAP-70 حاصل از تکثیر از اندازه DNA جفت نتایج در موقعیت C و A در موقعیت (A/C) به پروپانویل حاصل از تکثیر DNA به عنوان پروپانویلیت‌های مبتنی بر DNA. نتایج در موقعیت C و A در موقعیت (A/C) در جدول شماره ٢ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آزمون ممتاز کای ارتباط معنی‌داری را بین در موقعیت C و A در موقعیت (A/C) یافت که چنین برای لوسمی می‌ملوئیدی حاد را در شانس ابتلای ٢/١٩ (جدول شماره ٢) می‌کند. در این جایگاه چندشکلی اثبات کرد نتیجه حضور آلل A.

%OR = ٢/١٩ (جدول شماره ٢) می‌کند. در این جایگاه چندشکلی اثبات کرد نتیجه حضور آلل A.

%OR = ٢/١٩ (جدول شماره ٢) می‌کند. در این جایگاه چندشکلی اثبات کرد نتیجه حضور آلل A.
این مقاله نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد و گروه کنترل، افراد با ژنوتیپ در موقعیت پلی‌مورفیک، بیشتر مستعد ابتلا به لوسمی میلوئیدی حاد هستند. به طور مشابه مطالعه‌ای در سال 2015 نتایج پژوهش دیگری در جمعیت تونسی نشان داد تا ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن ZAP-70 و ارتباط بین پلی‌مورفیسم ناحیه 3' UTR، ارتباط بین پلی‌مورفیسم ناحیه 3' UTR با خطر ابتلا به آرتریت روماتوئید اثبات کرد. در این مطالعه، برای صفاری‌سازی و تکثیر قطعه PCR، برنامه دمایی زمانی در جدول 3.2 نشان داده شد.

جدول 2. مقایسه فراوانی آلل های A و C در موقعیت پلی‌مورفیسم rs104893674 (A/C) در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد و گروه کنترل

| سطح معنی‌داری | کمیت سیکل‌ها | (طول پایین - طول بالا) | تعدادهای (پرسه) | گروه بیمار | گروه کنترل | OR | 95% CI | سطح معنی‌داری |
|----------------|--------------|-------------------------|------------------|------------|-------------|----|--------|----------------|
| 0.01           | 0/000        | 1/19 (2/22 - 1/21)     | 2/26             | 0/000      | 0/000       | 2/26 | 0/000  | 1/19 (2/22 - 1/21) |

جدول 3. برنامه دمایی - زمانی PCR

| روز (مایع) | درجه سانتی‌گراد | زمان (دقیقه) | تعداد سیکل‌ها |
|------------|------------------|--------------|----------------|
| 1          | 95               | 5             | 20             |
| 2          | 94               | 40            | 20             |
| 3          | 67               | 40            | 20             |
| 4          | 72               | 40            | 20             |

برای صفاری‌سازی و تکثیر قطعه PCR، برنامه دمایی زمانی در جدول 3.2 نشان داده شد.
نتیجه‌گیری

با توجه به ارتباط معنی‌دار پلی‌مورفیزم rs104893674 با خطر بر اثر لوسمی میلیودی جاده می‌توان دو هفته کرکت که مارکرهای جلوگیری، امکان‌زایی‌های پپتید‌های کننده فوق بی‌حسیسیت با افزایش تهیه‌ساز در لوسمی میلیودی جاده مساعدت داشته باشد.

مراقبات اخلاقی

پیرامون از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاقی IR.IAU.KAU.REC.1398.051 به صورت کمکی خلاصه مراجعات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تصویب شد.

حاجی مالی

این مطالعه از پژوهش‌های کارهای‌کار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون امکان‌زایی‌های دانشگاهی، دانشگاهی و دانشگاهی واحد کازرون استخراج شده است.

مشارکت نوشته‌گران

قابل نوشته‌گران در آماده‌سازی این مقاله به یک نیازهای شرکت داشته‌اند.

تجارب منافع

لویستران که تابعی از میکتین هیپوگونه فعال منافع در خصوص پژوهش‌های جلوگیری ودیدن ندارد.

تشکر و نظرات

پیام‌رسیدن لازم مفید شدید می‌باشد که اطلاعاتی از خداوند و که‌های مردمی‌ها که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش ناشناخته نیست که در بهترین ساختمانی به عمل می‌آید.
References

[1] Babaei M, Mousavi S, Malek M, Tosi G, Zolfaghari M, Danaei N, et al. Cancer occurrence in Semnan Province, Iran: Results of a population-based cancer registry. Asian Pac J Cancer Prev. 2005; 6(2):159-64. http://eprints.semums.ac.ir/860/1/APJCP_Volume_6_Issue_2_Pages_159-164.pdf

[2] Zand AM, Imani S, Sa’adati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. [Effect of age, gender and blood group on blood cancer types (Persian)]. Kowsar Med J. 2010; 15(2):111-4. https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?id=175155

[3] Robin KO, Mervin CY. Hematology, immunology and infectious disease: neonatology questions and controversies. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2008. https://www.elsevier.com/books/hematology-immunology-and-infectious-disease-neonatology-questions-and-controversies/978-1-4160-3158-1

[4] Kupsa T, Horacek JM, Jebavy L. The role of cytokines in acute myeloid leukemia: A systematic review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012; 156(4):291-301. [DOI:10.5507/bp.2012.108] [PMID]

[5] Fauci AS, Hauser SL, Kasper DL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Oncology and hematology. Harrison’s principles of internal medicine. 19th ed. New York: McGraw Hill Education; 2015. https://www.worldcat.org/title/harrisons-principles-of-internal-medicine/oclc/907408102#details-allauthors

[6] Steffen B, Muller-Tidow C, Schwable J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2005; 56(2):195-221. [DOI:10.1016/j.critrevonc.2004.10.012] [PMID]

[7] Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. IARC Sci Publ. 2002; 8(155). https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Scientific-Publications/Cancer-Incidence-In-Five-Continents-Volume-VIII-2002

[8] Saffar A, Rahgozar M, Shahi F, Biglarian A. [Survival analysis of acute myeloid leukemia (Persian)]. Iran Uni Med Sci. 2015; 22(134):41-8. http://rjms.iums.ac.ir/article-1-3921-en.html

[9] Chang FH, Tzeng DS, Lee TM, Chen TC, Hsu LS, Lung FW. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in colorectal cancer in Taiwan. Kaohsiung J Med Sci. 2015; 22(134):41-8. http://rjms.iums.ac.ir/article-1-3921-en.html

[10] Wang H, Kadlecik TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HES, Hsu LY, Freedman TS. ZAP-70: An essential kinase in T-cell signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2(5):a002279. [DOI:10.1101/cshperspect.a002279] [PMID] [PMCID]

[11] Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. Annu Rev Immunol. 2009; 27:591-619. [DOI:10.1146/annurev.immunol.021908.132706] [PMID] [PMCID]

[12] Morrison DK. MAP kinase pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4(11):a011254. [DOI:10.1101/cshperspect.a011254] [PMID] [PMCID]

[13] Parikh SA, Shanafelt TD. Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. Curr Hematol Malig Rep. 2014; 9(3):294-9. [DOI:10.1007/s11899-014-0223-4] [PMID]

[14] Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Belau NM, Zimmermann M, Wirbelauer T, et al. The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. Haematologica. 2017; 102(2):346-55. [DOI:10.3324/haematol.2016.147744] [PMID] [PMCID]

[15] Torkaman A, Moghaddam Charkani N, AghaeiPour M. An approach for leukemia classification based on cooperative game theory. Anal Cell Pathol (Amst). 2011; 34(5):235-46. [DOI:10.1155/2011/212174] [PMCID]

[16] Ferjeni Z, Bouzid D, Fourati H, Stayoussef M, Abida O, Kammoun T, et al. Association of TCR/CD3, PTPN22, CD28 and ZAP70 gene polymorphisms with type 1 diabetes risk in Tunisian population: Family based association study. Immunol Lett. 2015; 163(1):1-7. [DOI:10.1016/j.imlet.2014.11.005] [PMID]

[17] Chen S-Y, Liu M-F, Wang C-R. Genetic polymorphism of 3’ untranslated region of zeta-chain associated protein kinase 70 kDa in southern Taiwanese patients with rheumatoid arthritis. Clinical rheumatology. 2016; 35(3):747-50. [DOI:10.1007/s10067-015-3044-5] [PMID]

[18] Chinn IK, Sanders RP, Stray-Pedersen A, Coban-Akdemir ZH, Kim VH-D, Dadi H, et al. Novel combined immune deficiency and radiation sensitivity blended phenotype in an adult with biallelic variations in ZAP70 and RNF168. Front Immunol. 2017; 8:576. [DOI:10.3389/fimmu.2017.00576] [PMID] [PMCID]

[19] Torkaman A, Moghaddam Charkani N, AghaeiPour M. An approach for leukemia classification based on cooperative game theory. Anal Cell Pathol (Amst). 2011; 34(5):235-46. [DOI:10.1155/2011/212174] [PMCID]

[20] Ferjeni Z, Bouzid D, Fourati H, Stayoussef M, Abida O, Kammoun T, et al. Association of TCR/CD3, PTPN22, CD28 and ZAP70 gene polymorphisms with type 1 diabetes risk in Tunisian population: Family based association study. Immunol Lett. 2015; 163(1):1-7. [DOI:10.1016/j.imlet.2014.11.005] [PMID]
This Page Intentionally Left Blank