

Lösemilerde t(9;22) BCR-ABL Translokasyonunun Real-Time RT-PCR ile 10 Yıllık Sonuçlarının Retrospektif Değerlendirilmesi

RETROSPECTIVE EVALUATION OF 10-YEAR RESULTS OF T (9; 22) BCR-ABL TRANSLOCATION VIA REAL-TIME RT-PCR IN LEUKEMIA

Cumhur GÜNDÜZ¹, Burçin Tezcanlı KAYMAZ¹, Vildan Bozok ÇETİNTAŞ¹, Aslı Tetik VARDARLI¹, Sunde Yılmaz SÜSLÜER¹, Duygu AYGÜNEŞ¹, Ayşegül DALMIZRAK¹, Çağdaş AKTAN¹, Ali Şahin KÜÇÜKASLAN¹, Tuğçe BALCI¹, Çağla KAYABAŞI¹, Besra Özmen YELKEN¹, Nur SELVİ GÜNEL¹, Çığır BİRAY AVCI¹, Buket KOSOVA¹, Zuhale EROĞLU¹, Serap AKSOYLAR², Nazan ÇETİNGÜL², Can BALKAN³, Deniz YILMAZ³, Yeşim AYDINOK³, Kaan KAVAKLI³, Mahmut TÖBÜ⁴, Murat TOMBULOĞLU⁴, Filiz BÜYÜKKEÇECİ⁴, Fahri ŞAHİN⁴, Güray SAYDAM⁴

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, İzmir

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: Kemik iliğindeki hematopoietik hücrelerin anormal birikimiyle karakterize olan kronik myeloid lösemi (KML) için t(9;22) kromozomal translokasyonu tanınan bir belirtidir. Philadelphia kromozomu oluşumuyla sonuçlanan translokasyon, KML olgularında gelişmekte ve hastalarının %95'inde görülmektedir ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut myeloid lösemi (AML)'de daha kötü bir prognoz göstergesidir. Bu çalışmada, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında 2004-2013 yılları arasında gelen KML ön tanı hastalarının t(9;22) analizi yapılarak, sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve gereçler: 2004-2013 yılları arasında gelen KML ön tanı olguların, BCR-ABL füzyon gen ekspresyonunun belirlenmesi, 361 çocuk ve 2433 erişkin olguda gerçekleştirilmiştir. Çocuk olgularının 125'i ve erişkin olgularının 626'sı takip hastası olup 3612 kan (%59) ve 2516 kemik iliği (%41) örneğinden total RNA veya mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında 2004-2013 yılları arasında 6128 t(9;22) ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Takip hastası çocuklarda (yaş ortalaması 10,43±5,07) 2 ile 26 arasında değişen 545 analiz ve erişkin takip hastalarında (yaş ortalaması 51,07±14,63) ise 2 ile 30 arasında değişen 753 analiz gerçekleştirilmiştir. Çocuk olguların 38'i ve erişkin olguların 474'ü BCR-ABL füzyon gen ekspresyonu pozitif olarak belirlenmiştir.

Tartışma ve sonuç: BCR-ABL1 transkriptlerinin kan ve kemik iliğindeki kantitatif ölçümü, KML'nin ilk tanısı ve rutin tedavi sonrası t(9;22)-pozitif lösemili hücrelerin patobiyolojisini daha iyi anlamamız açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kronik myeloid lösemi, Philadelphia kromozom, p210, BCR/ABL

Cumhur GÜNDÜZ

Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD
İZMİR

ABSTRACT

Objective: The t(9;22) chromosomal translocation is a diagnostic marker for the chronic myeloid leukemia (CML) which is characterized by abnormal accumulation of hematopoietic cells in the bone marrow. The translocation resulting in the formation of the Philadelphia chromosome; develops in KML cases and is observed in 95% of patients, it is the indicator of poorer prognosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML). In this study, the CML pre-diagnosed patients in Medical Biology Department for the 2004-2013 period are analyzed for t(9; 22) and the results are evaluated.

Methods: The determination of BCR-ABL fusion gene expression for the CML pre-diagnosed patients between 2004-2013, has been conducted in 361 children and 2433 adult cases. 125 of children cases and 626 of adult cases are follow-up patients and total RNA or mRNA isolations are conducted for 3612 blood (%59) and 2516 bone marrow (%41) samples.

Results: In the Medical Biology Department, 6128 t(9;22) expression analysis are conducted for the 2004-2013 period. In follow-up children cases, (average age 10.43±5.07), 545 analyses changing between 2 and 26 are conducted; in follow-up adult cases (average age 51.07±14.63), 753 analysis changing between 2 and 30 are conducted. The BCR-ABL fusion gene expression determined to be positive for 38 children cases and for 474 adult cases.

Discussion and conclusion: The quantitative measurement of BCR-ABL in blood and bone marrow are important for initial diagnosis of CML and for better understanding of t(9; 22) leukemia positive cells' pathology after routine treatment.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, Philadelphia chromosome, p210 BCR/ABL

Dokuzuncu kromozom ile 22. Kromozom arasında resiprokal translokasyon olan t(9;22), philadelphia (Ph) kromozomu, hematolojik malignansilerde ilk saptanan kromozom anomalisidir. 1960 yılında Philadelphia'da Pennsylvania Üniversitesi Tıp Fakültesinden Novell ve Hungerford KML hastalarından elde edilen 22. kromozomun normal hücrelerdeki aynı kromozomdan daha kısa olduğunu gözlemleyerek, kısa kromozomu "philadelphia kromozomu" olarak adlandırmışlardır (1). Translokasyonun kırık bölgeleri t(9;22)(q34;q11), 1973 yılında Rowley tarafından tanımlanmıştır (2). Ph kromozomu moleküler seviyede, 22q11 BCR geninin 5' bölgesinin, 9q34 bölgesine yerleşmiş olan ABL geninin (9 kromozom) 3' bölgesine birleşmesi ile oluşan BCR/ABL füzyon genidir (1). Bu füzyon, BCR içindeki kırılma noktalarına bağlı olarak, P190 BCR/ABL1 ve P210 BCR/ABL1 proteinlerini kodlayan *BCR/ABL1* şimerik gen formuyla sonuçlanmaktadır. KML olgularının çoğunda, 210-kDa ağırlığındaki onkogenik bir protein olan p210 sentezlenmektedir (1). KML' de BCR geni içerisindeki kırılmalar, 12 ve 16. ekzonlar arasında gerçekleşmektedir. Bu bölge, M-BCR (Major breakpoint cluster region) olarak tanımlanmaktadır (1-6). Bu bölgede sentezlenen p210 füzyon proteini, akrosentrik kromozom yapısında olup,

artmış tirozin kinaz aktivitesine ve anormal hücre lokalizasyonuna sahiptir (4). P210 BCR/ABL1, KML olgularının %95'inde, erişkin ALL olgularının %25-30'unda, çocuk ALL olgularının %2-5'inde ve nadir olarak da AML olgularında saptanmaktadır. Ph kromozomu oluşumuyla sonuçlanan translokasyon, KML için tanısıl bir belirteçtir. ALL ve AML 'de daha kötü bir prognozun göstergesidir.

Bu çalışmada, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında 2004-2013 yılları arasında analizi yapılan t(9;22) sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalına 2004-2013 yılları arasında gelen KML ön tanılı olguların, BCR-ABL füzyon gen ekspresyonunun belirlenmesi, 361 çocuk [156 kadın (%44) / 204 erkek (%56)] ve 2433 erişkin [1161 kadın (%48) / 1272 erkek (52)] olguda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için etik kurul izni alınmıştır (Etik kurul 14-5/1). Çocuk olgularının 125' i ve erişkin olgularının 626'sı takip hastası olup 3612 kan (%59) ve 2516 kemik iliği (%41) örneğinden total RNA veya mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Standart, pozitif ve negatif kontroller için reaksiyon karışımı hazırlanarak, denatüre edilmiş RNA eklenerek,

cDNA sentez protokolü uygulanmaktadır. İki bin dört ile iki bin on iki yılları arasında (9;22) ekspresyonu, Light Cycler t(9;22) Quantification Kiti ile (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) real time online RT-PCR ile belirlenmiş, ABL / GAPDH gen ekspresyonuna göre kantite edilmiştir (7). İki bin on üç yıldan itibaren uygulanan metot değiştirilmiş ve *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit kullanılmaya başlanmıştır (8). Kit protokolüne göre; kullanılan referans gen ABL'dir. Hem ABL hem de Mbc için farklı standartlar kullanılarak, Uluslararası skalada değerlendirme, IS-MMR kalibratör ile yapılmıştır. Olgulara ait parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri, regresyon analizi ve "odds ratio" (OR) analizleri SPSS istatistik paket programında gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık $p<0,05$ olarak alınmıştır.

BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında 2004-2013 yılları arasında 6128 t(9;22) ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo I). Çocuk olgularının yaş ortalaması $10,43\pm 5,07$ olup takip hastalarında 2 ile 26 arasında değişen 545 t(9;22) analizi ve erişkin takip hastalarında (yaş ortalaması $51,07\pm 14,63$) ise 2 ile 30 arasında değişen 753 t(9;22) analizi gerçekleştirilmiştir. Çocuk olguların 38'i (%11) ve erişkin olguların 474'ü (%20) BCR-ABL füzyon gen ekspresyonu pozitif olarak belirlenmiştir.

On yıllık t(9;22) analizi sonuçları incelendiğine yıllara bağlı yıllara bağlı olarak analiz sayısında (Tablo II) anlamlı artış olduğu belirlendi [Şekil 1, ($R^2=0,9522$, $p<0,001$)]. Toplam pozitiflik değerlendirildiğinde % 29,54 oranında t(9;22) pozitifliği olduğu saptandı; 2004 ve 2013 yıllarında %46,58 ve %40,55 pozitiflik dikkat çekicidir.

Çocuk ve erişkin olgularda t(9;22) pozitifliği yıllara göre değerlendirildiğinde (Tablo III) çocuk olgularında 2004 yılı hariç son üç yılda (2011-2013) anlamlı artış gösterdiği ve 2006 yılına göre 2013 yılındaki t(9;22) pozitifliğindeki artışın 10,98 kat olduğu belirlenmiştir (OR=10,987 %95CI=1.437-83.835, $p=0,021$). Erişkin olgularda t(9;22) pozitifliği 2005-2012 yılları arasında ortalama %32,07 olarak belirlenmiştir. Son yılda (2013) 1,4 katlık bir artışla t(9;22) pozitifliğinin %44,47 olduğu saptanmıştır.

t(9;22) pozitifliği cinsiyet farklılığı açısından değerlendirildiğinde (Tablo IV) çocuk olgularda kızlarda daha yüksek oranda (%62,86) pozitif bulunduğu saptanmıştır. Yıllardaki oranlarına bakıldığında 2011 yılında kız olgularındaki pozitiflik oranı 1,31 kat artarak %82,61 olarak belirlenmiştir. Erişkin olgularda t(9;22) pozitifliği cinsiyet açısından farklılık göstermemektedir.

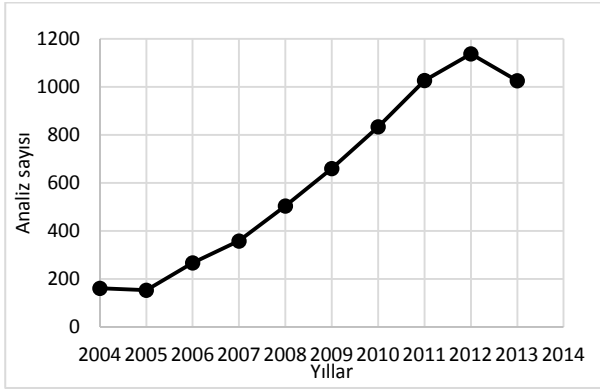
Tablo I: t(9;22) analizi yapılan olguların demografik özellikleri, kliniklere göre dağılımı ve test pozitiflikleri

	Çocuk		Erişkin		Toplam
	n	%	n	%	
Test Sayısı	788	12,86	5340	87,14	6128
Hasta Sayısı	361	12,92	2433	87,08	2794
Takip Hasta Sayısı	125	16,60	626	83,40	753
Test Tekrar Sayısı	545 (2-26)	13,33	3542 (2-30)	86,67	4087 (2-30)
Kadın/Kız	156(%44)	11,84	1161(%48)	88,16	1318
Erkek	204(%56)	13,82	1272 (%52)	86,18	1476
Yaş Ortalaması	10,43±5,07		51,07±14,63		46,22±19,12
Pozitif Hasta	38 (%10,53)	7,42	474 (%19,48)	92,58	512
Pozitif Test	105 (%13)	5,80	1705 (%32)	94,20	1810
NCN Ortalaması	847,96±5190,24		167,41±3555,04		206,88±3672,26
Kan	119 (%15)	3,29	3493 (%65)	96,71	3612
Kemik iliği	669 (%85)	26,59	1847 (%35)	73,41	2516

NCN=normalize kopya sayısı

Tablo II. Yıllara göre negatif ve pozitif t(9;22) analiz sayıları

Yıl	Negatif	Pozitif	% Pozitiflik	Toplam
2004	86	75	46,58	161
2005	107	46	30,07	153
2006	189	78	29,21	267
2007	252	106	29,61	358
2008	350	154	30,56	504
2009	470	190	28,79	660
2010	640	194	23,26	834
2011	762	265	25,80	1027
2012	852	286	25,13	1138
2013	610	416	40,55	1026
Toplam	4318	1810	29,54	6128

**Şekil 1.** Yıllara göre yapılan t(9;22) analiz sayıları**Tablo III.** Çocuk ve erişkin olguların t(9;22) pozitifliğinin yıllara göre dağılımı

Yıllar	Çocuk			Erişkin		
	Negatif	Pozitif	% Pozitiflik	Negatif	Pozitif	% Pozitiflik
2004	16	11	40,74	70	64	47,76
2005	35	3	7,89	72	43	37,39
2006	38	1	2,56	151	77	33,77
2007	69	5	6,76	183	101	35,56
2008	51	3	5,56	299	151	33,56
2009	89	5	5,32	401	185	31,57
2010	65	3	4,41	575	191	24,93
2011	117	23	16,43	645	242	27,28
2012	123	25	16,89	729	261	26,36
2013	90	26	22,41	487	390	44,47
Toplam	693	105	13,16	3612	1705	32,07

Tablo IV. Çocuk ve erişkin olguların t(9;22) pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı

Yıllar	Çocuk		Erişkin	
	Erkek (%)	Kız (%)	Erkek (%)	Kadın (%)
2004	2 (18,18)	9 (81,82)	38 (59,38)	26 (40,63)
2005	1 (33,33)	2 (66,67)	17 (39,53)	26 (60,47)
2006	1 (100,00)	0 (0,00)	36 (46,75)	41 (53,25)
2007	3 (60,00)	2 (40,00)	53 (52,48)	48 (47,52)
2008	3 (100,00)	0 (0,00)	86 (56,95)	65 (43,05)
2009	2 (40,00)	3 (60,00)	87 (47,03)	98 (52,97)
2010	1 (33,33)	2 (66,67)	95 (49,74)	96 (50,26)
2011	4 (17,39)	19 (82,61)	120 (49,59)	122 (50,41)
2012	10 (40,00)	15 (60,00)	134 (51,34)	127 (48,66)
2013	12 (46,15)	14 (53,85)	193 (49,49)	197 (50,51)
Toplam	39 (37,14)	66 (62,86)	859 (50,38)	846 (49,62)

Tablo V. İlk tanı t(9;22) pozitifliğinin yıllara göre dağılımı

	Çocuk	%	Erişkin	%	Toplam	%
2004	3	14,29	19	18,63	22	17,89
2005	2	6,45	16	25,81	18	19,35
2006	1	3,23	38	27,14	39	22,81
2007	3	6,67	32	23,70	35	19,44
2008	2	7,41	36	17,56	38	16,38
2009	2	4,00	45	17,79	47	15,51
2010	1	3,45	30	10,49	31	9,84
2011	6	15,79	91	22,09	97	21,56
2012	10	21,28	96	20,92	106	20,95
2013	8	19,05	71	18,73	79	18,76
Toplam	38	10,53	474	19,48	512	18,32

İlk tanı t(9;22) pozitifliği çocuk olgularında %10,53 erişkin olgularda %19,48 olarak belirlenmiştir. Yıllara göre değişimi incelendiğinde çocuk olgularında son 3 yılda (2011-2013) ilk tanı t(9;22) pozitifliği belirgin bir şekilde artmıştır. En yüksek olarak 2006 yılına göre 2012 yılında 6,6 kat artış gözlenmiştir (OR=6,5957, %95CI=0,8036-54,1370, $p=0,078$). İlginç olarak 2010 yılında hem çocuk olgularında (%3,45) hem erişkin olgularda (%9,84) en düşük ilk tanı t(9;22) pozitifliği olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kanser, belirli genlerde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu oluşan, hüresel seviyedeki genetik bir bozukluktur (2). Kanser hücrelerinde oluşan kromozomal

düzeydeki genetik değişiklikler, gen ürünlerinin ya da aktivitelerinin değişimine neden olabilmektedir (2,3,5). Bu genetik değişiklikler kanser gelişiminin incelenmesinin temelinde ve tümör oluşumunda oldukça önemlidir (3). Hematolojik kanserler kromozom kayıp ve kazanımları içermelerine rağmen daha çok tipik translokasyonlarla karakterizedir. Bazı hematolojik kanserlerde bu translokasyonlar, hastalığı sınıflandıracak kadar özeldir (9). KML olgularının %95'i, yetişkin ALL olgularının %25-30'u, Philadelphia kromozomu varlığında, t(9;22) translokasyonuna sahiptir. Philadelphia kromozomu, Bcr-Abl füzyon proteinlerinin ekspresyonuyla t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucunda oluşmaktadır. BCR/ABL tarafından oluşan malign transformasyon, onun abl tirozin kinaz aktivitesine bağlı olarak kritiktir. Aynı zamanda, hibrid genin bir parçası olan bcr, malign fenotipin gerçekleşmesinde de yer almaktadır (10). Çalışmamızın temelinde, KML patogenezinden sorumlu t(9;22)(q34;q11) translokasyonunun ürünü olan BCR-ABL1 geninin kantitatif analizi yer almaktadır.

KML olgularında qRT-PCR gibi moleküler yöntemler ile bcr-abl genin yeniden yapılanması ile oluşan Ph kromozomunun varlığı ile tedavi takibi gerçekleştirilebilmektedir. Tedavi sonrasında hastaların taşıdıkları Ph+ hücrelerinin oranının doğru bir şekilde tespit edilmesi, tedaviye verilen cevabın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Tedavi sonrasında artan BCR-ABL1 RNA seviyeleri, hastalık ilerlemesi riskini önemli bir şekilde arttırmaktadır (11). Bu yüksek riskli hastaların erken tespiti, nüks öncesinde, terapötik strateji için erken değişiklik yapılmasına izin verebilecektir. Böylece, BCR-ABL1 transkriptlerinin kan ve kemik iliğindeki kantitatif ölçümü, klinik uygulamalarda t(9;22)-pozitif lösemili hücrelerin patobiyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.

Sonuç olarak belirli periyotlarda ölçülen t(9;22) ekspresyonu, KML'nin ilk tanısı ve rutin tedavi sonrası minimal rezidüel hastalık takibi ve prognozun belirlenmesi için gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.

2. Rowley JD. Letter. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243(5405):290-3.
3. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Malcolm A. S. Moore, Ruthard M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR Fusion Proteins: Leukemogenic Potential and Effects on B Cell Commitment. *PLoS One* 2009;4(10):e7661.
4. Klug, SW, Cummings RM. Genetik Kavramlar. Öner C. Vol. 2, Palme Yayıncılık, Ankara, 2002.
5. Schulz W. *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer Science and Business Media, 2005;219-226.
6. Telegeev GD, Dubrovskaya AN, Dybkov MV, Maliuta SS. Influence of BCR/ABL fusion proteins on the course of Ph leukemias. *Acta Biochim Pol* 2004;51(3):845-9.
7. Müller MC, Saglio G, Lin F, Pfeifer H, Press RD, Tubbs RR, Paschka P, Gottardi E, O'Brien SG, Ottmann OG, Stockinger H, Wiecek L, Merx K, König H, Schwindel U, Hehlmann R, Hochhaus A. An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. *Haematologica* 2007;92(7):970-3.
8. Mauté C, Nibourel O, Réa D, Coiteux V, Gardel N, Preudhomme C, Cayuela JM; GBM-HM. Calibration of BCR-ABL1 mRNA quantification methods using genetic reference materials is a valid strategy to report results on the international scale. *Clin Biochem* 2014;47(13-14):1333-6.
9. Moore FR, Rempfer CB, Press RD. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR Fusion Transcript Monitoring in Chronic Myelogenous Leukemia. *Methods Mol Biol* 2013;999:1-23.
10. Yaghmaie M, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, et al. Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Arch Iranian Med* 2008;11(3):247-251.
11. Hickey FB, Cotter TG. Identification of transcriptional targets associated with the expression of p210 Bcr-Abl. *Eur J Haematol* 2006;76:369-383.

