

Akut lenfoblastik lösemi hastalarında t(4;11) MLL/AF4 translokasyonunun *real time* RT-PCR ile 5 yıllık sonuçlarının retrospektif değerlendirilmesi**A five-year retrospective evaluation of t(4;11) MLL/AF4 translocation results with real time RT-PCR in acute lymphoblastic leukemia patients**

Sunde YILMAZ SÜSLÜER ¹	Burçin TEZCANLI KAYMAZ ¹	Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ ¹	Aslı TETİK VARDARLI ¹
Duygu AYGÜNEŞ ¹	Ayşegül DALMIZRAK ¹	Çağdaş AKTAN ¹	Ali Şahin KÜÇÜKASLAN ¹
Tuğçe BALCI ¹	Çağla KAYABAŞI ¹	Besra ÖZMEN YELKEN ¹	Nur SELVİ GÜNEL ¹
Çığır BİRAY AVCI ¹	Buket KOSOVA ¹	Zuhal EROĞLU ¹	Serap AKSOYLAR ²
Nazan ÇETİNGÜL ²	Can BALKAN ³	Deniz YILMAZ ³	Yeşim AYDINOK ³
Kaan KAVAKLI ³	Mahmut TÖBÜ ⁴	Murat TOMBULOĞLU ⁴	Filiz BÜYÜKKEÇECİ ⁴
Fahri ŞAHİN ⁴	Güray SAYDAM ⁴	Cumhur GÜNDÜZ ¹	

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye**Öz**

Amaç: t(4;11), MLL-AF4 translokasyonu sonucu oluşan, 4q21 kromozomal bandına yerleşim gösteren AF4 geninin 11q23 kromozomal bandına yerleşim gösteren MLL genine füzyonu sonucu gelişen kromozomal bir anomalidir. Bu çalışmada, retrospektif olarak 2009-2013 yılları arasındaki akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarındaki t(4;11) MLL-AF4 translokasyonunun analiz sonuçlarının incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 2009-2013 yılları arasında akut lösemi ön tanısıyla 176 çocuk (70 kız, 106 erkek) ve 144 yetişkin (60 kadın, 84 erkek) olgunun kan veya kemik iliği örnekleri incelendi. Bu olgulara ait 71 kan ve 473 kemik iliği örneğinin t(4;11) translokasyon RNA sonuçları, gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildi. İlk aşamada, kan ve kemik iliği örneklerinden izole edilen total RNA veya mRNA'dan konvansiyonel bir PCR cihazı ile komplementer DNA sentezlendi. İkinci aşamada, gerçek zamanlı PCR cihazı ile t(4;11) kantitasyonu gerçekleştirildi. Olguların kantitatif olarak değerlendirilmesi, pozitif kontrol ve negatif kontrolün karşılaştırılması ile örneklerin negatif yada pozitif (pozitif olgu kopya sayısının referans kopya sayısına oranı) olması şeklinde yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızda 98'i takip hastası olmak üzere toplam 320 hasta t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu için değerlendirildi. Çalışmaların sonucunda toplam 34 olgu (24 çocuk, 10 yetişkin) pozitif ve diğer örnekler negatif olarak bulundu.

Sonuç: Bu değerlendirmenin sonuçları, RT-PCR yöntemi ile ALL hastalarında yeni tanı döneminde ve tedavi sürecinde t(4;11) MLL-AF4 translokasyonunun kantitatif tayini, hem tanının kesinleştirilmesinde hem de moleküler remisyona sağlanmasına yönelik tedaviyi yönlendirmesinde değerli bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Sözcükler: t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu, gerçek zamanlı RT-PCR.

Abstract

Aim: t(4,11) is a chromosomal abnormality formed by the translocation MLL-AF4, which is the result of the fusion of the AF4 gene, localized on 4q21 chromosomal band, to the MLL gene, localized on 11q23 chromosomal band. The aim of this study is to examine the results of the analysis of t (4;11) MLL-AF4 translocation in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients retrospectively.

Materials and Methods: Peripheral blood or bone marrow samples of 176 children (70 girls, 106 boys) and 144 adults (60 women, 84 men) with a preliminary diagnosis of acute leukemia between 2009-2013 were analyzed in the

Yazışma Adresi: Sunde YILMAZ SÜSLÜER

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

Makalenin Geliş Tarihi: 08.03.2014 Kabul Tarihi: 23.06.2014

Medical Biology Department of Ege University Faculty of Medicine. The translocation RNA results of 71 peripheral blood and 473 bone marrow samples of these patients were evaluated quantitatively for t(4;11) with real-time RT-PCR. t(4;11) quantitation was performed by real-time qRT-PCR instrument after the synthesis of complementary DNA with conventional PCR from total RNA or mRNA isolated from blood and bone marrow. Quantitative analysis of the patients was performed by comparing positive and negative controls and samples classified as positive or negative (the ratio of the number of positive copies to the number of reference copies).

Results: A total of 320 patients, with 98 having also follow-ups, were evaluated for t(4;11) translocation. Totally 34 patients (24 children and 10 adults) were found positive and the other samples were negative.

Conclusion: The assessment of these results supports that, quantitative determination of t(4;11) with RT-PCR method among newly diagnosed ALL patients and ALL patients undergoing treatment, is a valuable method for both confirming the diagnosis and guiding the treatment intended to achieve molecular remission.

Keywords: t(4;11) MLL-AF4 translocation, real time RT-PCR.

Giriş

Lösemi, hematopoitik hücrelerdeki proliferasyon ve diferansiyasyon dengesinin bozulması sonucu ortaya çıkan malin bir hastalıktır. Genetik değişikliklerin sonucu olarak transforme olan hematopoitik hücrelerin klonal olarak proliferasyonu söz konusudur.

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), tüm çocukluk malinitlelerinin %30'u olmakla birlikte çocukluk çağı lösemilerinin de %80'inden sorumludur (1,2). Pik insidansı 3-7 yaşları arasındadır ve bazen yetişkinlerde de görülebilmekle birlikte, 50 yaşın üzerinde son derece nadirdir.

Hematopoitik hücrelerin malin transformasyonunun başlangıcına sebep olan ve böylece myeloid ve lenfoblastik lösemilere veya lenfomalara sebep olan bir seri kromozomal translokasyon bilinmektedir (3). 11q23 üzerinde bulunan MLL geni, *Drosophila trithorax*'ın memeli karşılığıdır ve erken dönemde embriyo gelişimi ve hematopoez gen ifadesinin pozitif düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (örn; Polycomb ve Hox genleri) (4). MLL birden fazla korunmuş fonksiyonel alanları içeren üç AT hook, dört sentral çinko parmak bölgesi ve 210-aminoasit C-terminal SET bölgesini içeren 500 kD'luk bir proteini kodlar. Sonucusu, epigenetik transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkili kromatin modifikasyonlarını düzenleyen histon H3 lizin 4 (H3K4) metiltransferaz aktivitesinden sorumludur (5). Son yayınlanan veriler 64 translokasyon ortak genlerinin 104 farklı MLL düzenlenmeleri ortaya koymuştur (6). Tüm ortak proteinler nükleer lokalizasyon sinyalleridir ve güçlü transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedirler. MLL'nin en yaygın ortak genleri; AF4, AF9, ENL, AF10, AF6, ELL ve AF1P'dir. İlginç olarak, ayrı MLL füzyon ortaklarının lösemi yöneliminde olası rolleri olabilir çünkü belirli ortak proteinler sadece MLL'yi onkogenik bir füzyon proteinine bağlamakla kalmayıp, aynı zamanda transformasyon için soy duyarlılığını da yönetebilir; MLL-AF4 ekspresyonu görülen lösemiler, çoğunlukla hem pediatrik hem yetişkinlerde pro-B ALL diagnozu alırlar, bunun yanında füzyon ortakları AF9, AF6 veya AF10 genellikle myelomonositik veya monoblastik akut myeloid lösemi alttıplerinde yaygındır (7).

MLL-AF4 füzyon geninin oluşmasına neden olan; 11q23 kromozomal bandına yerleşim gösteren MLL geninin 4q21 kromozomal bandına yerleşim gösteren AF4 genine füzyonu [t(4;11)(q21;q23)], ALL'de en yaygın görülen kromozomal aberasyondur ve lösemilerde kötü prognoz göstergesidir. Fakat erişkin nüfusta ALL sıklığının görece olarak düşük olduğu düşünüldüğünde yetişkin ALL hastalarında t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 pozitifliği nadir bir olaydır. Nadir görülmesine rağmen, lösemilerin bu formu, klinik olarak ilgi çekicidir, çünkü evrensel karakteristik immüfenotipik ve klinik özellikleri ile benzersiz ve ayrı biyolojik bir olgu olarak kabul edilmektedir (8).

Çocuk ALL'de, herhangi bir MLL yeniden düzenlemesi kötü prognozla ilişkilidir, bunun yanında yetişkin ALL hastalarında MLL AF4 ve MLL-AF9 füzyon genlerinin varlığı diğer MLL yeniden düzenlenmelerine göre daha kötü sonuç ile ilişkilidir (9).

Moleküler düzeyde, MLL ve AF4 genlerindeki kırılma noktaları intronların içine yayılmıştır, ekzon 8 ve 12 (MLL) ve ekzon 3 ve 7 arasında, bazı transkriptler yetişkin ya da infant ALL hastalarında daha sık görülmektedir (10).

Moleküler sitogenetik ile elde edilen genetik anomaliler hakkındaki bilgi, hedefli tedavileri geliştirmek ve tedavi protokollerinde onları birleştirmek için gereklidir.

Bu çalışmada, retrospektif olarak 2009-2013 yılları arasındaki ALL hastalarındaki t(4;11) MLL-AF4 translokasyonunun analiz sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 2009-2013 yılları arasında akut lösemi ön tanısıyla gelen hastaların yetişkin ve çocuk grubundaki demografik özellikleri ve MLL-AF4 translokasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

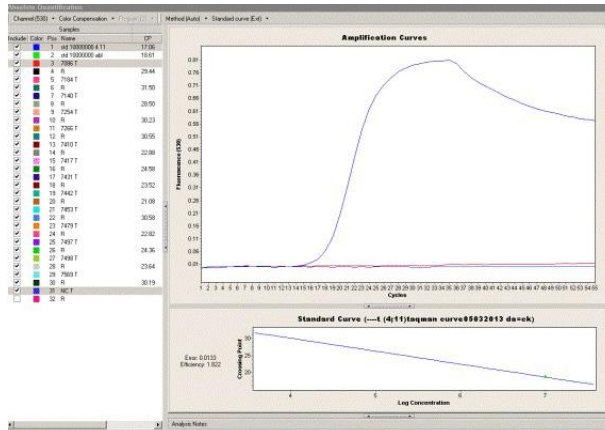
Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 2009-2013 yılları arasında ALL ön tanısıyla gelen hastalar retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışma için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (27.05.2014, 14-5/2) alındı. Beş yılı içeren dönemde, 176 çocuk (70 kız, 106 erkek; yaş ortalaması 8.08±5.24) ve 144 yetişkin (60 kadın, 84 erkek; yaş

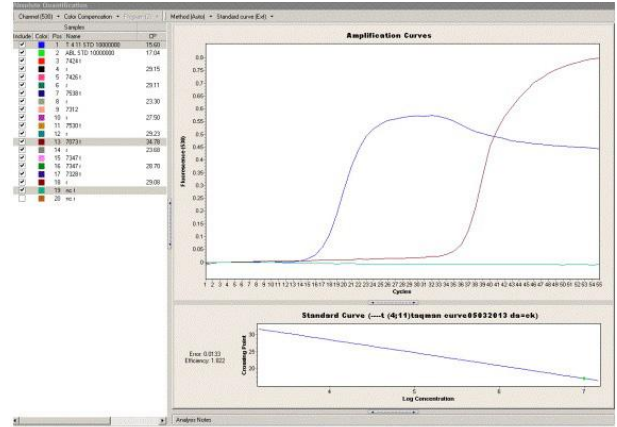
ortalaması 46.32 ± 19.01) hastanın 71 kan [18 çocuk (%5), 53 yetişkin (%31)] ve 473 kemik iliği [353 çocuk (%95), 120 yetişkin (%69)] örnekleri incelendi. Rutin analiz için örneklerden total RNA (Magna Pure Compact RNA Isolation Kit, Roche) veya mRNA (mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow, Roche) kit protokolüne göre izole edildi. İzole edilen total RNA veya mRNA'dan konvansiyonel bir PCR cihazı ile komplementer DNA (cDNA) (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche) kit protokolüne göre sentezlendi.

Elde edilen cDNA örnekleri, t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu için Europe Against Cancer (EAC) program primer ve problemleri (Tablo-1) kullanılarak kantitatif olarak çalışıldı. Bunun için amplifikasyon ve kantitatif olarak örneklerin değerlendirilmesi, Taqman yöntemi ile gerçek zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler (LC, Roche Applied Science) ile gerçekleştirildi. *Housekeeping* gen olarak ABL kullanıldı.

Hastaların kantitatif olarak, pozitif hasta kopya sayısının referans kopya sayısına oranı ile değerlendirildi (Şekil-1,2).



Şekil-1. Negatif bir olgu sonucu.



Şekil-2. Pozitif bir olgu sonucu.

Bulgular

Çalışmamızda 176 çocuk (70 kız, 106 erkek) ve 144 yetişkin (60 kadın, 84 erkek) toplam 320 hasta t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu için değerlendirildi. Doksan sekizi takip hastası olmak üzere çocuk hastaların 74'ü ve yetişkin hastaların 24'ü takip hastası idi.

Çalışmaların sonucunda toplam 34 hasta [24 çocuk (%14), 10 yetişkin (%7)] pozitif t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu taşıyıcısı ve diğer örnekler negatif t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu taşımayan olarak bulundu. Pozitif saptanan çocuk hastalarda MLL-AF4 kopya sayısı ortalaması 0.029 ± 0.12 ve yetişkin hastalarda ise 5.98 ± 18.17 olarak hesaplandı (Tablo-2).

Tartışma

t(4;11) MLL-AF4 translokasyonu; sitogenetik, FISH ve PCR gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Sitogenetik yöntemler minimal rezidüel hastalıkların takibi açısından yeterli olmamaktadır. Aktif transkripsiyon

Tablo-1. t(4;11) MLL-AF4 Translokasyonu için Europe Against Cancer (EAC) Program Primer ve Problemleri.*

EAC kodu	Gen	Gen referans			Primer / prob lokalizasyon
		Aksesyon numarası	Ekzon	5'-3' pozisyonu (büyüklük)	5' - 3' dizi
ENF207	MLL	L04284	9	4050-4074 (25)	CCCAAGTATCCCTGTAACAAAAA
ENF208	MLL		10	4186-4208 (23)	GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT
ENP242	AF4	L13773	5	1517-1538 (22)	CATGGCCGCCTCCTTTGACAGC
ENR262	AF4		5	1581-1560 (22)	GAAAGGAACTTGGATGGCTCA
ENF1003	ABL	X16416	2	372-402 (31)	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
ENPr1043	ABL		3	467-440 (28)	CCATTTTTGGTTGGGCTTCACACCATT
ENR1063	ABL		3	495-475 (21)	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

*ENF: Forward primer, ENP: TaqMan probe, ENPr: TaqMan reverse probe, ENR: Reverse primer.

düzenini belirlemede kullanılan RT-PCR yönteminin sitogenetik metoda göre üstünlüğü daha hızlı ve duyarlı olmasının yanında, sayısal bir değer olarak elde edilen sonuçların hastaların tedaviye verdikleri yanıtın takibinde kolaylık sağlamasıdır. Kantitatif sonuçlar klinisyenler için daha yol göstericidir ve tedavinin takibini kolaylaştırmaktadır. Çok düşük düzeydeki ekspresyonların bile belirlenebilmesi, klinisyenlere hastalığın prognozu için erken ipuçları verebilmektedir.

Çalışmamızda Çocukluk çağı ALL'de MLL-AF4 pozitifliğini %14 olarak belirlenmiştir. Santamaría-Quesada ve ark. (11) Kosta Rika'da çocukluk çağı ALL hastalarında %1,54 (1/65) oranında MLL-AF4 pozitiflik saptamıştır. Pakakasama ve ark. (12), Tayland'daki çocukluk çağı ALL hastalarında aşırmasında 1/63 (%1,59) oranında füzyon genini saptamışlardır. Çalışmamızda çocukluk çağı ALL'de MLL-AF4'nin yüksek pozitiflik oranı hastaların prognozu açısından kötü olarak değerlendirilmiştir. Liu ve ark. (13), 256 yetişkin ALL hastalarında yaptıkları çalışmada MLL-AF4 füzyon genini hastaların 14'ünde (%5,47) pozitif bulmuşlardır. Sabir ve ark. (14), Pakistan'da 104 yetişkin ALL hastasının 10'unda (%9,62) MLL-AF4 füzyonunu

saptamışlardır. Çalışmamızda yetişkin ALL grubunda MLL-AF4 pozitifliği %7 olarak belirlenmiş olup literatürdeki diğer çalışmalarda belirlenen yetişkin ALL'deki MLL-AF4 pozitifliği ile benzer olarak bulunmuştur.

Sonuç

t(4; 11) (q21; q23) / MLL-AF4 pozitif yetişkin ALL, diğer ALL formlarına göre özel patolojik ve klinik açıdan daha atraktif bir lösemi alttipidir. Yetişkin hastalarda ALL'nin bu formunun prognozu, klinik sonuçlarını iyileştirmek için birkaç devam eden klinik ve biyolojik çalışmalara rağmen zayıf kalır. Burada en önemli sorulardan biri, ilk tam remisyon içinde konsolidasyon tedavisi olarak allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu rolüdür, bu en çok kullanılan yaklaşım olsa da, dünya çapında uluslararası işbirliği grupları tarafından elde edilen veriler tartışmalıdır.

Bu değerlendirmenin sonuçları, RT-PCR yöntemi ile ALL hastalarında yeni tanı döneminde ve tedavi sürecinde t(4;11) MLL-AF4 translokasyonunun kantitatif tayini, hem tanının kesinleştirilmesinde hem de moleküler remisyon sağlanmasına yönelik tedaviyi yönlendirmesinde değerli bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Kaynaklar

1. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 1995;75(8):2186-95.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.
3. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994;372(6502):143-9.
4. Zhang Y, Rowley JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair* 2006;5(9-10):1282-97.
5. Milne TA1, Briggs SD, Brock HW, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 2002;10(5):1107-17.
6. Meyer C1, Kowarz E, Hofmann J, al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23(8):1490-9.
7. Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, et al. New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia* 2005;19(6):953-64 .
8. Marchesi F, Girardi K, Avvisati G. Pathogenetic, clinical and prognostic features of adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Adv Hematol* 2011;2011:621627.
9. Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359(9321):1909-15.
10. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901-28.
11. Santamaría-Quesada C, Vargas M, Venegas P, et al. Molecular and epidemiologic findings of childhood acute leukemia in Costa Rica. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(2):131-5.
12. Pakakasama S, Kajanachumpol S, Kanjanapongkul S, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *Int J Lab Hematol* 2008;30(4):286-91.
13. Liu F, Gao L, Jing Y, et al. Detection and clinical significance of gene rearrangements in Chinese patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54(7):1521-6.
14. Sabir N, Iqbal Z, Aleem A, et al. Prognostically significant fusion oncogenes in Pakistani patients with adult acute lymphoblastic leukemia and their association with disease biology and outcome. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(7):3349-55.