







## Miyelodisplastik sendrom hastalığında P53 polimorfizmlerinin önemi

### Importance of p53 gene polymorphisms in myelodysplastic syndrome disease

Bahar Vatansever<sup>1</sup>  Duygu Aygüneş Jafari<sup>2</sup>  Hale Güler Kara<sup>2</sup>   
Ege Sevinç<sup>2</sup>  Burçin Kaymaz<sup>2</sup>  Gülay Alp<sup>1</sup>   
Fahri Şahin<sup>1</sup>  Güray Saydam<sup>1</sup>  Buket Kosova<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Miyelodisplastik sendrom (MDS) akut miyeloid lösemiye dönüşüm riski yüksek olan, artmış apoptozis ve azalmış hematopoez oranlarıyla karakterize klonal bir hastalıktır. MDS patogenezi tam olarak açıklanabilmiş değildir. Olguların ~%50' si anormal karyotiptedir ve bu oran ikincil MDS' de %80 civarındadır. P53 proteinini kök hücre homeostazının önemli düzenleyicisidir ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptotik ile enflamatuar yanıt gibi bir dizi hücreyel olayda yer alır. Genomik bütünlüğün korunmasında da önemli görevleri bulunan TP53 geni kanserlerde sıklıkla mutasyona uğramaktadır; ancak, mutasyonlarının yanında bazı gen polimorfizmlerinin de kanserle ilişkili oldukları bilinmektedir. Çalışmadaki amacımız, dört yaygın p53 tek nükleotid polimorfizminin MDS' deki yaygınlıklarını ve hastalık gelişimi üzerine etkilerini belirlemektir. Bu amaçla, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı' nda MDS tanısı ile takip edilen ya da yeni tanı almış 100 olgu çalışmaya dahil edildi.

**Gereç ve Yöntem:** MDS'li olguların periferik kan lökositlerinden izole edilen DNA'lar gerçek-zamanlı PCR yöntemiyle çalışılarak, p53 polimorfizmleri (rs35163653, rs35993958, rs1800371, rs1042522) uygun problemlerin kullanımıyla ve erime eğrisi analizleriyle belirlendi.

**Bulgular:** İncelenen dört yaygın p53 polimorfizmin arasında özellikle rs1042522 polimorfizmindeki atasal olmayan G alelinin MDS'li olgularda artmış olduğu gözlenmiştir (C:%30.3; G:%69.7). Fonksiyonel olduğu, yani sentez edilen proteinin fonksiyonunu etkilediği bilinen bu polimorfizmde 417. pozisyonundaki C nukleotidinin G'ye transisyonu (C>G), proteinin 72. pozisyonundaki prolin amino asidinin arjinine (P72R) kodlanmasına yol açmaktadır.

**Sonuç:** Çalışmamız, MDS hastalık grubunda rs35163653, rs35993958, rs1800371 ve rs1042522 p53 polimorfizmlerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bunlardan, rs1042522 polimorfizminin kansere yatkınlık ve duyarlılıkla ilişkili olduğu yapılan diğer bazı çalışmalarla gösterilmiş olması nedeniyle, MDS hastalığı için de yüksek risk oluşturabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, MDS hastalığı için gerçekleştirilen bu çalışmanın daha geniş bir olgu grubuyla tekrarlanmasıyla rs1042522 polimorfizmi ileride MDS teşhisinde belirteç olarak kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** MDS, p53, polimorfizm, SNP, hematopoietik.

## ABSTRACT

**Aim:** Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal disease with a high risk of conversion to acute myeloid leukemia, characterized by increased apoptosis and decreased hematopoiesis. The pathogenesis of MDS has not been fully explained. ~50% of cases have abnormal karyotype and this rate is around 80% in secondary MDS.

Sorumlu yazar: Duygu Aygüneş Jafari  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
İzmir, Türkiye  
E-posta: [duygu.aygunes@ege.edu.tr](mailto:duygu.aygunes@ege.edu.tr)  
Başvuru tarihi: 23.06.2021 Kabul tarihi: 16.01.2022

The p53 protein is an important regulator of stem cell homeostasis and is involved in a range of cellular events such as cell cycle regulation, apoptotic and inflammatory response. The TP53 gene, which has important roles in maintaining genomic integrity, is frequently mutated in cancers; however, some gene polymorphisms are known to be associated with cancer, as well as mutations. Our aim in the study is to determine the prevalence of four common p53 single nucleotide polymorphisms in MDS and their effects on disease development. For this reason, 100 cases followed up with the diagnosis of MDS or newly diagnosed in Ege University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Department of Hematology were included in the study.

**Materials and Methods:** DNAs isolated from peripheral blood leukocytes of MDS cases were studied by real-time PCR method, p53 polymorphisms (rs35163653, rs35993958, rs1800371, rs1042522) were determined by using appropriate probes and melting curve analysis.

**Results:** Among the four common p53 polymorphisms examined, especially the non-ancestral G allele in the rs1042522 polymorphism was observed to be increased in MDS cases (C: 30.3%; G: 69.7%). In this polymorphism, which is known to be functional, that is, affecting the function of the synthesized protein, the transition of the C nucleotide at position 417 to G (C>G) causes the coding of the amino acid proline at position 72 of the protein to arginine (P72R).

**Conclusion:** Our study is the first to investigate the p53 polymorphisms of rs35163653, rs35993958, rs1800371 and rs1042522 in the MDS disease group. Of these, rs1042522 polymorphism has been shown to be associated with cancer susceptibility and susceptibility, and it is thought that it may pose a high risk for MDS disease as well. In conclusion, rs1042522 polymorphism may be used as a marker in the diagnosis of MDS in the future by repeating this study for MDS disease with a larger case group.

**Keywords:** MDS, p53, polymorphism, SNP, hematopoietic.

## GİRİŞ

Miyelodisplastik sendrom (MDS) kemik iliğindeki dishematopoez ve artmış apoptozis ile karakterize, periferik kanda sitopenilerin eşlik ettiği, klinik ve sitogenetik açılarından heterojen bir hastalık grubunu oluşturmaktadır. Akut miyeloid lösemi (AML) dönüşümü gösterebilen MDS çoğunlukla yaşlı popülasyonda görülür. Hastaların %80'i 60 yaştan sonra tanı alır ve ortalama tanı yaşı 70'dir (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde görülme sıklığı tüm yaş gruplarında 100.000'de 3-4' tür (2). 70 yaş üstünde görülme sıklığı ise 100.000'de 22-45'e çıkarak, yaş ilerledikçe de bu oran artmaktadır (2). Gençlerde görülme sıklığı düşük olsa da Japonya, Çin, Kore, Hindistan, Tayland ve Türkiye gibi Asya kıtasına düşen ülkelerdeki oranı yüksektir ve MDS için belirlen ortalama tanı yaşı 40-50'dir (3).

MDS'nin sınıflamasında Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization; WHO) 2016 yılında belirlediği güncel sınıflama kullanılmaktadır (4). Skoring sisteminde de 1997 yılından bu yana kullanılan IPSS, yeni moleküler belirteçlerin buluşuyla 2012 yılında revize edilerek R-IPSS adını alarak güncellenmiştir (5).

MDS'nin patogenezi tam bilinmemekle birlikte, olguların yaklaşık %50'sinde anormal karyotip saptanmaktadır. Genomik stabiliteyi koruyan en önemli genlerden biri TP53'tür ve p53 transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır (6). Aynı

zamanda önemli bir tümör baskılayıcı gen olan p53 DNA hasarında hücre döngüsünü durdurarak DNA tamir proteinlerini aktive etmektedir, ancak hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse de hücrenin apoptotik yolla ölümüne yol açmaktadır (7). TP53 geni kanserlerde sıklıkla mutasyona uğramış olduğundan fonksiyonlarını yerine getirememektedir ve genomik instabilitiye neden olmaktadır (8).

TP53 geni aynı zamanda oldukça polimorfiktir; yani, kişiler arasında dizisinde bazı farklılıklar gösterebilir. Mutasyonlardan farklı olarak polimorfizmlere toplumda daha sık rastlanır ve görülme oranları genellikle  $\geq 1\%$ 'dir (9). İnsan genomunda en sık tek nükleotid polimorfizmlere (single nucleotide polymorphism; SNP) rastlanır ve DNA'daki tek bir nükleotidin başka bir nükleotidle yer değiştirmesiyle meydana gelir. Burada, pürin yerine yine bir pürin (örn. A→G), ya da pirimidin yerine pirimidin (örn. C→T) bazı geldiğinde transisyon; pürin bazı yerine pirimidin (örn. A→C) ya da tersi meydana geldiğinde de transversiyondan bahsedilir. TP53 geni için 200'den fazla SNP tanımlanmıştır ve bunların çoğu fenotipik olarak sessizdirler ve biyolojik etkileri yoktur; ancak, bazılarının etkin yani fonksiyonel oldukları ve kanser gibi bazı hastalıkların gelişimiyle ilişkili oldukları belirlenmiştir.

SNP karsinogenez sürecinde, heterozigotluk kaybı tespitinde hassas bir yöntem olup metafaz genetiğinde gizli kalan duplikasyon ve delesyonların saptanmasında yararlı bir yöntemdir. MDS' de konvansiyonel sitogenetik ve FISH ile hastaların %50'sinde kromozomal anormallik tespit edilebilirken; SNP dizileme ile bu kromozomal anomali oranı %75 olarak tespit edilebilmiştir. En önemli kısım ise bu gizli değişimin, normal sitogenetik saptanan bireylerde, yapılan SNP dizi analizi ile kromozomal anomali saptandığında bunun prognoza olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. (10).

SNP'ler prognostik açıdan önemli bir sitogenetik tamamlayıcıdır. MDS'deki anormal farklılaşmada p53 polimorfizmlerinin etkilerini ortaya koyabilmek için, MDS tanısı ile takip edilen ya da yeni tanı alan hastaların periferik kanından izole edilecek olan DNA'lardan p53 genine ait 4 yaygın polimorfizmi (G360A, V217M, P72R ve P47S) belirlemeyi ve hastalıkla ilişkilerini ortaya koymayı amaçladık.

Bu çalışma p53 genindeki 4 polimorfizme ait SNP; V217M rs35163653 (G/A dönüşümü ile valin 217 polimorfik varyantı metiyonin 217), G360A rs35993958 (G/C dönüşümü ile glisin 360 polimorfik varyantı alanin 360), P47S rs1800371(C/T dönüşümü ile prolin 47 polimorfik varyantı serin 47), P72R rs1042522 (C/G dönüşümü ile prolin 72 polimorfik varyantı arjinin 72) şeklindedir.

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

### ***Hasta verilerinin ve örneklerin toplanması***

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü'nde takipli MDS tanılı ya da yeni tanı almış 18 yaş üstü, intensif kemoterapi almamış ve allojenik ya da otolog kök hücre nakli olmamış hastalar, "Genetik Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" alındıktan sonra çalışmaya alındı. Hastaların takip dosyalarına tanı esnasındaki; hemogram, biyokimya değerleri, kemik iliği aspirasyon ve patolojisi sonuçları kaydedilmektedir. Mutlaka karyotip bakılmakta ve sitogenetik analiz yapılarak tüm sonuçları performansı ile birlikte değerlendirilip risk skoru hesaplanarak tedavi kararı verilmektedir.

Her olgudan 2 adet mor kapaklı EDTA'lı tüpe 2'şer ml kan örneği alındı. Örnekler alınırken; son transfüzyondan 2 hafta kadar önce alınmış olmasına ya da sık transfüzyon ihtiyacı olan hastalarda transfüzyondan hemen önce alınmış

olmasına dikkat edildi. Çalışma protokolümüz, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 27.07.2017 tarih ve 17-7/5 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

### ***Kan örneğinden DNA izolasyonu***

Çalışmada DNA izolasyonu Roche firmasının Magnapure cihazına uygun ticari olarak satılan kitlerin (High Pure PCR Template Preparation Kit) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

### ***Gerçek Zamanlı PCR***

Polimorfik kısımların çoğaltılması için iki primer ve özgül floresan boya işaretli problardan HybProbe (FRET-Fluorescens Resonance Energy Transfer) kullanılmıştır. Gerçek-zamanlı PCR sistemi ile de polimorfik bölgeler bulunmuştur. Aleller arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak için 3'ucundan floresan boya ile işaretli, diğeri 5'ucundan alıcı boya ile işaretli LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) içeren LightSNiP Assay kullanılarak, Roche LightCycler® 480 gerçek-zamanlı PCR cihazıyla analiz yapılmıştır.

PCR gerçekleştikten sonra alelik diskriminasyon (alel ayırt etme) için "Melting Curve" (Erime Eğrisi) analizi yöntemi kullanılmıştır. Bu analizde atasal ve polimorfik DNA' ların floresan ışımaya düzeylerinin sıcaklığa bağlı değişim noktalarının (erime sıcaklığı-T<sub>m</sub>-melting temperature) birbirinden farklı olmasından yararlanılmıştır.

### ***İstatistik***

İstatistiksel değerlendirme için SPSS Statistics 25.0 programı kullanılmıştır.

Normal dağılım gösteren parametreler ortalama ± standart sapma şeklinde, normal dağılıma uymayan parametreler de ortanca şeklinde yorumlanmıştır.

Nicel veriler için One way Anova, independent sample T-test, bağımsız iki grup karşılaştırılıp normal dağılım varsayımı sağlandığında independent sample T-test kullanılmıştır.

Normal dağılımlı değişkenlerde; ikiden fazla grup karşılaştırılmasında, grupların birbirinden farklı olup olmadığını analiz edebilmek için Oneway Anova testi kullanılmıştır ve bu gruplarda hangi grupların birbirinden farklı olduğunu analiz edebilmek için Post Hoc karşılaştırmaları yapılmıştır.

Nitel verilerin mukayesesinde Pearson Ki Kare Testi ve Fisher's Exact Test testi kullanılmıştır.

Alellerin genotip dağılımı ve bu dağılımın beklenen değerlere uyup uymadığı (Hardy-Weinberg Dengesi) ki-kare testi uygulanarak

tespit edilmiştir. Yine ki-kare testi genotiplerin diğer parametreler ile karşılaştırılmasında da kullanılmıştır.

Hastalığın tanısından lösemiye dönüşümüne ya da hastanın ölümüne kadar geçen zaman progresyonsuz sağ kalım süresi olarak hesaplanıp Kaplan-Meier yöntemi ve Log Rank (Mantel-Cox) testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, %95 güven aralığında ve anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

### Yaş, Cinsiyet ve Laboratuvar Bulguları Dağılımı

Çalışmamıza alınan 100 hastanın 47'si erkek, 53'ü kadındı. Hastaların ortalama tanı yaşı  $62,76 \pm 13,997$  ve ortalama yaşı 65 (aralık: 24-89)'tir. Tanı sırasında kemik iliği blast oranı en

düşük olan hasta %0 ve en yüksek olan hastada %19'dur. Kemik iliği blast oranı 100 hastanın 46'sında  $\leq 2$ , 27' sinde  $> 2 - < 5$  aralığında, 15'inde  $\geq 5 - < 10$  aralığında, 12'sinde  $\geq 10 - \leq 19$  aralığında değerlendirilmiştir. Ortalama kemik iliği blast oranı  $4,5 \pm 4,52$  olup, ortanca kemik iliği blast oranı %3,0 (aralık 0-19)'dir. Kemik iliği blast oranı %2 olan hasta grubu 32 kişi ile yığılmanın en yüksek olduğu kategori olup, sadece 1 hastada kemik iliği blast oranı %15 olarak saptanmıştır (Tablo-1).

### Sitogenetik ile Bakılan Karyotip Sonuçları

100 hastanın 78' ine metafaz sitogenetiği ile karyotip bakılmış ve 20 hastada (%25,6) anormal karyotip saptanmıştır. Normal karyotip saptanan hasta sayısı 58' dir (%74,4). MDS için spesifik tanımlı bir translokasyon bulunmamaktadır (Tablo-2).

**Tablo-1-** Hastaların tanı sırasında yaş ve klinik özellikleri.

Tanı sırasında	Min.	Max.	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
Yaş	24	89	62,76	65	13,997
Kemik iliği blast yüzdesi (%)	0	19	4,5	3,00	4,5248

**Tablo-2.** Anormal karyotip sonuçları.

Anormal karyotip sonuçları	Sıklık
45,X,-Y[13] / 46,XY[10]	1
45,X[14] / 46,XY[6]	2
45,X[7] / 46, XY[4]	1
Mozaik 45XY-15 46 XY	1
46,XX, del (5q)(q13q31)[3] / 46, XX[7]	1
46,XX[45] / 45,X[4] / 47,XXX[1]	2
46,XY, i (17 q) (8)/47, XY ,+8. İ(17 q) (4)	1
46,XY, del(20)(q11)	1
46,XY, del(7q)(q22)[3]/46,XY[27]	2
46,XY[15] / 47, XY, +8[5]	1
46,XY[7] / 46, XY del(5)(q13p31)[2]	1
46,XY[9] / 46, XY, t(3;12)(q21;q24.1)[6]	1
47,XX,+8	1
47,XY,+8	1
47,XY,+mar[15]/46,XY[5]	1
47,XYY[12] / 46,XY[18]	1
7 metafazın 3'ünde monozomi 21, 4'ünde monozomi 22, 4 metafazda Y kromozom kaybı	1
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

### **FISH MDS Paneli Sonuçları**

FISH MDS paneli için del 5q, Trizomi 8, 20q delesyonu, 7q, MLL geni (11q23), RB1 geni (13q14) standart olarak bakılan parametrelerdir. Bunlara ek olarak, JAK2 V617F mutasyonu ve BCR-ABL füzyonuna da bakılmıştır. 100 hastadan 77' sine sitogenetik inceleme yapılmış olup, 17 hastada (%22,1) anomali saptanmıştır. Hastaların %8,1'i nde del 5q, %9,2' sinde trizomi 8, %1,6' sında 20 q delesyonu, %6,3'ünde 7q ve %5,8' inde 13q14 (RB geni) mutasyonları saptanmıştır. 11q23 (MLL geni) mutasyonu hastaların hiçbirinde saptanmamıştır. Bazı hastalarda birden fazla mutasyonda pozitiflik saptanmıştır. Ayrıca 8 hasta için JAK2 V617F mutasyonu ve BCR-ABL de değerlendirilmiş olup her birinde 1'er hastada (%12,5) pozitiflik saptanmıştır (Tablo-3).

Hem karyotip hem de FISH'de anomali saptanan 69 hasta incelendiğinde Tablo-4'teki sonuçlar elde edilmiştir.

### **Polimorfizm Sonuçları**

**V217M rs35163653** polimorfizmi değerlendirilen 98 hastada (%98) G/G atasal tip, 2 hastada (%2) G/A heterozigot saptanmış, hastaların hiç birinde homozigot mutant **V217M** polimorfizmi saptanmamıştır. **G360A rs35993958** bakılan 99 hastanın hepsi G/G atasal tip saptanmıştır. **P47S rs1800371** bakılan 100 hastanın da hepsi C/C atasal tip saptanmıştır. **P72R rs1042522** 9 hastada (%9,1) C/C atasal tip, 42 hastada (%42,4) C/G heterozigot ve 48 hastada (%48,5) G/G homozigot mutant saptanmıştır (Tablo-5).

**Tablo-3.** FISH MDS panel sonuçları, JAK2 V617F ve BCR-ABL sonuçları.

Mutasyon	Değerlendirilen	Pozitif	Negatif	Oran (%)
5q delesyonu	74	6	68	% 8,1
Trizomi 8	65	6	59	% 9,2
20q delesyonu	62	1	61	% 1,6
7q	63	4	59	% 6,3
13q14 (RB geni)	52	3	49	% 5,8
11q23 (MLL geni)	54	0	54	-
JAK2 V617F	8	1	7	% 12,5
BCR-ABL	8	1	7	% 12,5

**Tablo-4.** FISH ve karyotip sonuçlarının karşılaştırılması.

	FISH normal	FISH anormal	Toplam
Karyotip normal	45	6	51
Yüzde	%88,2	%11,8	%100
Karyotip anormal	8	10	18
Yüzde	%44,4	%55,6	%100
Toplam	54	16	69

**Tablo-5.** Polimorfizm oranları ve alel sıklığı.

Polimorfizm	Atasal	Heterozigot	Homozigot	Alel sıklığı	
<b>V217M</b>	G/G	G/A	A/A	G: %99	A: %1
<b>rs35163653</b>	%98	%2	-		
<b>G360A</b>	G/G	G/C	C/C	G: %100	C: %0
<b>rs35993958</b>	%100	-	-		
<b>P47S</b>	C/C %100	C/T	T/T	C: %100	T: %0
<b>rs1800371</b>		-	-		
<b>P72R</b>	C/C	C/G	G/G	C: %30,3	G: %69,7
<b>rs1042522</b>	%9,1	%42,4	%48,5		

### **Hardy-Weinberg Dengesine Göre Sonuçların Değerlendirilmesi**

Alel sıklık değerlendirilmesindeki sıklık oranları; V217M polimorfizmi için %99 G aleli ve %1 A aleli; G360A polimorfizmi için %100 G aleli; P47S polimorfizmi için %100 C aleli ve **P72R** polimorfizmi için %30,3 C aleli, %69,7 G aleli olarak saptandı. Alellerin oluşturduğu genotipler ile olması beklenen genotipler arasındaki uyum Hardy-Weinberg dengesine göre sadece V217M ve P72R polimorfizimleri için hesaplanabildi. Bu iki polimorfizm için popülasyonun dengede olduğu hesaplanmıştır ( $p > 0,05$ ).

### **SNP, Yaş ve Cinsiyet İlişkisinin Değerlendirilmesi**

G360A ve P47S polimorfizmlerinin hepsi atasal tipte saptanmıştır. Bu sebeple bu iki polimorfizm değerlendirilmeye alınamamıştır. V217M polimorfizminde de sadece 2 hastada heterozigotluk görüldüğü için istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. **P72R** polimorfizmi cinsiyet ve tanı yaşı parametreleri açısından değerlendirildiğinde anlamlı farklılık saptanamamıştır. Homozigot+heterozigot grupta kadın sayısı fazla gözlenmiştir (%56,7) fakat istatistiksel anlamda farklılık saptanamamıştır. ( $P=0,077$ ) (Tablo-6).

### **SNP, Karyotip ve FISH Anormallik Karşılaştırılması**

Tablo-7'de gösterildiği gibi, SNP sonuçları ile karyotip ve FISH anormallik saptanıp saptanamaması açısından değerlendirildiğinde, **P72R** polimorfizmi ile anormal FISH varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır ( $p=0,620$ ). Hastalar ayrıca heterozigot+homozigot olarak gruplandırıldığında da

yine istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır ( $p=0,650$ ).

FISH anormalliği olmayan 59 hastada **P72R** polimorfizmi değerlendirildiğinde, 5 hasta (%8,5) atasal tip, 25 hasta (%42,4) heterozigot ve 29 hasta (%49,1) homozigot mutant saptanmıştır. Buna ek olarak, hastaların %91,5'unda FISH sonucu normal olduğu halde **P72R** polimorfizmi (heterozigot+homozigot) saptanmıştır.

FISH analizi ile **P72R** polimorfizmi arasındaki ilişki çapraz karşılaştırmalar yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir. ( $p > 0,05$ )

**P72R** polimorfizmi ile karyotip anormalliği karşılaştırıldığında; karyotip anormalliği bulunan 20 hastadan 2'si (%10,0) atasal tipte, 10'u (%50,0) heterozigot, 8'i (%40,0) homozigot mutant saptanmıştır fakat polimorfizm ile aralarında istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır ( $p=0,368$ ). Ayrıca hastalar heterozigot+homozigot olarak da gruplanmış; 20 hastanın 18'i (%90) polimorfik saptanmıştır fakat yine polimorfizm ve karyotip anormalliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır. ( $p > 0,05$ )

Bundan başka normal karyotip saptanan 58 hastanın **P72R** polimorfizmi değerlendirildiğinde, 6 hasta (%10,3) atasal tip, 19 hasta (%32,8) heterozigot ve 33 hasta (%56,9) homozigot mutant saptanmıştır. Ayrıca hastaların %89,7' sinde (52/58) karyotip normal olduğu halde **P72R** polimorfizmi (heterozigot+homozigot mutasyon) saptanmıştır.

Karyotip analizi ile **P72R** polimorfizmi arasındaki ilişki çapraz karşılaştırmalar yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir. ( $p$  değeri:  $>0,05$ )

**Tablo-6.** **P72R** cinsiyet ve yaş ile ilişkisinin değerlendirilmesi.

<b>P72R</b>	Atasal tip	C/G	G/G	C/G+G/G (heterozigot+ homozigot)	P1 P2
Cinsiyet (E/K)	7/2	21/21	18/30	39/51	P1: 0,070 P2: 0,077
Tanı Yaşı (ortalama) (min-max)	57,67 (30-84)	62,57 (24-84)	63,60 (31-89)	63,12 (24-89)	P1:0,560 P2:0,629

P1: atasal tip- homozigot- heterozigot karşılaştırılması

P2: atasal tip- (homozgot+heterozigot) karşılaştırılması

**Tablo-7. P72R karyotip ve fish anormallik karşılaştırılması.**

P72R	Atasal tip	C/G (heterozigot)	G/G (homozigot)	C/G+G/G (heterozigot+homozigot)	Toplam	P1* P2**
FISH anormallik/toplam	2/7	5/30	10/39	15/69	17/76	P1:0,620 P2:0,650
Karyotip anormallik/toplam	2/8	10/29	8/41	18/70	20/78	P1:0,368 P2:1,000

\*P1: atasal tip- homozigot- heterozigot karşılaştırılması

\*\*P2: atasal tip- (homozgot+heterozigot) karşılaştırılması

**Tablo-8. P72R polimorfizminin prognoz ile ilişkisi.**

P72R	Atasal tip	C/G	G/G	C/G+G/G (heterozigot+ homozigot)	P1* P2**
AML progresyonu var	1	1	3	4	P1:0,483 P2:0,641
AML progresyonu yok	8	41	45	86	P1:- P2:-
Toplam hasta sayısı	9	42	48	90	P1:- P2:-

\*P1: atasal tip- homozigot- heterozigot karşılaştırılması

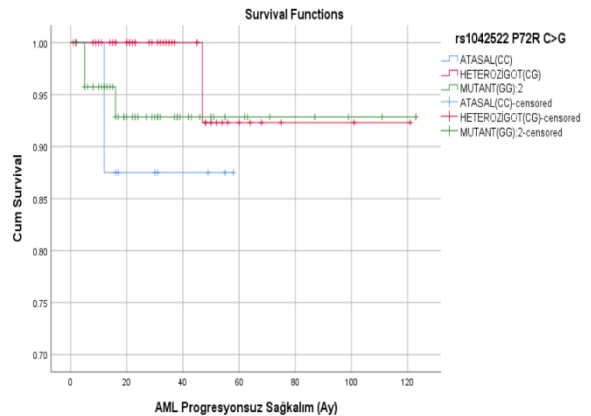
\*\*P2: atasal tip- (homozgot+heterozigot) karşılaştırılması

### SNP Sonuçlarının Prognoz ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

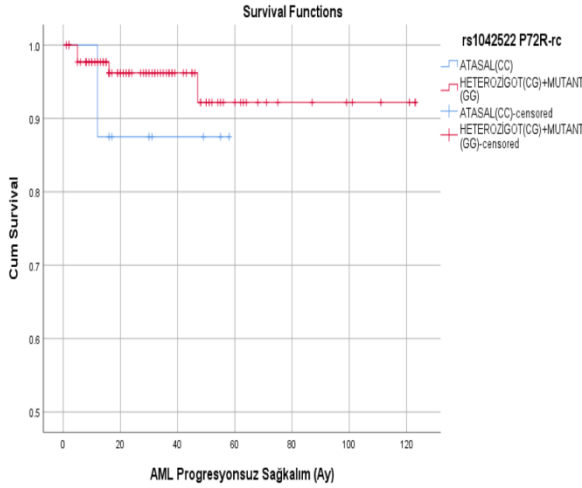
Çalışmadaki 100 hastanın 6'sı AML'ye progresyon göstermiştir. P72R polimorfizmi için analiz edilen 99 hastanın 5'i AML progresyonu göstermiş olup; atasal tip, heterozigot ve homozigot oranları AML progresyonu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır (p değeri: 0,483). Ayrıca bu 5 hasta atasal tip ve heterozigot+homozigot grup olarak ayrıldığında yine AML progresyonu ile aralarında istatistiksel anlamlı ilişki saptanamamıştır (p değeri: 0,641). Geri kalan 94 hastanın AML progresyonsuz ortalama sağ kalımı ile P72R polimorfizmi arasında ilişki saptanamamıştır (Tablo-8). Çalışmamız izlem çalışması olmayıp sadece tanıdan çalışma sonuçlanana kadar ki süreçte AML dönüşüm oranları incelenmiştir.

Kaplan-Meier sağkalım analizinde P72R polimorfizmi incelendiğinde atasal tip AML progresyonsuz ortalama sağ kalım 52,250±5,379 ay, heterozigot tip AML progresyonsuz ortalama sağ kalım 115,308±5,469 ay, homozigot tip AML progresyonsuz ortalama sağ kalım 114,874±4,556 ay olup istatistiksel anlamlı fark saptanamamıştır (Şekil-1).

Kaplan-Meier sağkalım analizinde P72R polimorfizmi için hastalar atasal tip ve heterozigot+homozigot grup olarak ayrıldığında atasal grupta AML progresyonsuz ortalama sağ kalım 52,250±5,379 ay, heterozigot+homozigot grupta AML progresyonsuz ortalama sağ kalım 115,626±3,822 ay olup istatistiksel anlamlı fark saptanamamıştır (log rank değeri: 0,423) (Şekil-2).



**Şekil-1. P72R polimorfizm durumuna göre Progresyonsuz Sağkalım (atasal/ heterozigot/ homozigot).**



**Şekil-2.** *P72R* polimorfizm durumuna göre Progresyonsuz Sağkalm (atasal/ heterozigot+homozigot).

## TARTIŞMA

Çalışmamızda ortalama tanı yaşı  $62,7 \pm 13,9$  saptanmıştır, literatürdeki ortalama tanı yaşı 70'dır (1). Çalışmamızdaki hastaların literatüre göre daha genç yaşta tanı almış olduğu görülmüştür. Literatürde MDS erkeklerde daha sık görülmekle birlikte (yılda 100.000'de E/K: 4.5 / 2.7) (11) bizim çalışmamızda kadınlar lehine yükseklik saptanmıştır (E/K: 1/1,1). İzole del 5q hastalarının literatüre göre kadın sayısı üstünlüğü (12) varken bizim çalışmamızda, kadın ve erkek sayısı eşit olarak gözlenmiştir.

Çalışmamızda AML progresyonu göstermeyen hasta sayısı IPSS ve R-IPSS düşük risk hasta gruplarında anlamlı olarak fazla çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). Ayrıca WHO sınıflamasına göre de AML progresyonu sadece artmış blastlı grupta (RAEB-1 ve RAEB-2) görülmüştür. Bulgularımız literatür ile uyumludur (13).

Literatüre göre en sık görülen anomali 5q delesyonuyken (14) çalışmamızda saptanan en sık sitogenetik anomali %9,2 oranıyla trizomi 8' dir.

Bizim çalışmamızda **G360A** rs35993958 ve **P47S** rs1800371 polimorfizmlerinde hiç heterozigotluk ya da homozigotluk saptanmamıştır. **V217M** rs35163653 polimorfizmi %2 heterozigot iken hiç homozigot mutasyon saptanmamıştır. **P72R** rs1042522 polimorfizmi de %42,4 heterozigot ve % 48,5 homozigot mutant ve %9,1 atasal form saptanmıştır. Bu polimorfizmlerden ikisi için (P47S ve R72P) p53 yolağının fonksiyonlarını değiştirdiğine dair yeterli moleküler kanıt bulunurken; diğer iki polimorfizm (V217M ve

G360A) kanser risk artışıyla ilişkilendirilememiştir (15-6). Bir başka çalışmada V217M p53'ün DNA bağlanma alanı (DNA binding domain) yerleşimli olması nedeniyle p53 aktivitesini önemli ölçüde etkileyebileceği düşünülmüştür (15). Bizim hasta grubumuzda V217M polimorfizmi % 98 oranında atasal formda saptanmıştır. Felley-Bosco ve arkadaşları P47S polimorfizmini, sadece Afrika orijinli popülasyonlarda araştırmışlar ve alel sıklığını yaklaşık %5 olarak bildirmişlerdir (17). Önceki çalışmalarda, p53'ün hücre büyümesini baskılama kabiliyetinin, p53-S47 varyantı tarafından etkilenmediği sonucuna varılmıştır (17) fakat apoptozisin uyarılması incelenmemiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, bir "super-transaktivasyon p53' ü meydana getiren p53-S47 varyantı, p53'ün hedeflediği (P53AIP1'i de içeren) 8 tane genin 5 tanesini, doğal fenotip p53'ün uyardığı seviyeden %150 daha fazla düzeyde etkinleştirebilir (16). Biz de çalışmamızda P47S polimorfizminin MDS hastaları üzerindeki etkilerine bakmak istedik fakat hasta grubumuzda hiç heterozigot ya da homozigot birey saptayamadığımız için anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çalışmamızda *P72R* polimorfizmi cinsiyet ve tanı yaşı parametreleri açısından değerlendirildiğinde (atasal tip, heterozigot ve homozigot mutant) anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ayrıca WHO sınıflama sistemi alt grupları, IPSS ve R-IPSS alt gruplarında *P72R* polimorfizmi ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunamamıştır.

Hamadou ve arkadaşları hematolojik malignite vakalarından oluşan 40 hastanın 36' sında en çok tekrarlayan varyantın P72R olduğunu saptamıştır. Bu 40 hastanın 22'si sporadik akut lösemili ve 18'i de lösemi, lenfoma ve miyeloid sendrom vakalarını içeren ailesel hematolojik malignitelerdir. P72R (rs1042522), en sık görülen varyant olarak vakaların %90' ında saptanmıştır (18). Bizim çalışmamızda da P72R (rs1042522) varyant oranı %90,9 ile literatürü desteklemektedir.

McGraw ve arkadaşları spesifik kanserlerde özellikle hematolojik malignitelerin R72P birlikteliğinden kanser risk artışı ile etkilendiğini göstermişlerdir. 705 MDS hastasında R72P- C alelinin MDS yatkınlığını etkileyebileceğini ve bu hasta grubunun %11,1 inin (78/705) atasal, %41,5 nin (293/705) heterozigot ve %47,4 ünün (334/705) homozigot mutant olduğu saptanmıştır. Bu bulgular en geniş çaplı P72R çalışmasını içermektedir (19). Bizim çalışmamızdaki hasta grubunda R72P- C aleli %9,1 atasal, %42,4



heterozigot ve %48,5 homozigot mutant olarak saptanmıştır ve literatür ile uyumludur.

Weich ve arkadaşları kronik miyeloid lösemili (KML) hastalarda TP53 kodon 72 SNP vakalarında (141 hastada) heterozigot ve homozigot varyantların KML gelişiminde önemli rol oynadığını saptamışlardır. 141 KML hastası ve 141 sağlıklı kontrol grubunda çalışma yapan Weich ve arkadaşları TP53-C alel sıklığının kontrol grubunda %29,8 iken hasta grubunda %22,3 olduğunu ve C alel sıklığının hasta grubunda önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (20). Bizim çalışmamızda C aleli sıklığı %30,3 olarak izlenirken, G aleli sıklığı %69,7 olarak izlenmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu olmadığı için sağlıklı bireyler ve hasta bireyler arasındaki alel frekans farkı gözlenememiştir fakat hasta bireylerde C aleli sıklığının az olduğu (%30,3) saptanmıştır.

P72R meme kanseri hastalarında da çalışılmıştır. Üren ve arkadaşları meme kanseri tanısı almış 508 kadın hasta ve sağlıklı kadından oluşan 367 kişilik kontrol grubu ile olan çalışmalarında rs1042522 polimorfizminin hasta ve kontrol grubu kıyasında istatistiksel anlamlı olarak farklılık olmadığını bulmuşlardır. Alel frekanslarını G aleli hasta grubunda %69,0, kontrol grubunda %31,0; C aleli hasta grubunda %31,0; kontrol grubunda %69,0 olarak ortaya koymuşlardır (21). Çalışmamızda kontrol grubu olmadığı için alel frekans karşılaştırılması yapılamamıştır.

Arenillas ve arkadaşları metafaz sitogenetiği sonuçlarında herhangi bir anormalliği olmayan 62 MDS hastasında SNP dizileme yapmış ve bu hastaların %50 sinde (31/62) SNP anormalliği tespit etmişlerdir. Bu çalışma rutin metafaz sitogenetiğinde anormallik olmayan MDS hastalarının bulunduğu en geniş MDS grubu çalışmasıdır. (22). Biz de çalışmamızda metafaz sitogenetiği ile analiz edilmiş ve karyotipi normal saptanmış 58 hastanın %89,7'sinde (52/58) P72R polimorfizmi görülmüştür. Bulmuş olduğumuz sonuçlarda, normal karyotipe sahip fakat SNP anormalliği olan hasta oranı literatüre göre daha yüksektir. Bu farklılığın sebebi çalışmaya katılan MDS hasta gruplarının farklı etnik köken ve coğrafi dağılımının örtüşmüyor oluşundan kaynaklanabilir. Literatür önerileri, her iki yöntemin (FISH ve konvansiyonel sitogenetik) SNP dizileme yöntemi ile birlikte kullanılması yönündedir (22).

## SONUÇ

Böylece hem tanısal hem de prognostik belirteç olarak SNP tedavide ümit verici görünebilir.

Daha geniş çaplı çalışmalar ile polimorfizmlerin prognostik önemi belirlenerek MDS skorlama sistemlerine daha geniş katkı sağlanabilir ve bu doğrultuda tedavi konusunda öngörülerde bulunulabilir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

## Kaynaklar

1. Jabbour E, Short NJ, Montalban-Bravo G, Huang X, Bueso-Ramos C, Qiao W, Yang H, Zhao C, Kadia T, Borthakur G, Pemmaraju N, Sasaki K, Estrov Z, Cortes J, Ravandi F, Alvarado Y, Komrokji R, Sekeres MA, Steensma DP, DeZern A, Roboz G, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Randomized phase 2 study of low-dose decitabine vs low-dose azacitidine in lower-risk MDS and MDS/MPN. *Blood* 2017; 130 (13): 1514-22
2. Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, Prieto F, Granada I, Hernández JM, Cigudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marqués ML, Arranz E, Ríos R, Martínez Climent JA, Vallespí T, Florensa L, Woessner S. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 2000; 108 (2), 346-56.
3. Paydaş, S. Young age MDS: differences between Western and Eastern countries. *Leukemia Research* 2006; 30 (3), 362.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127, 2391-405.
5. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, O'Donnell MR, Shami PJ, Stein BL, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P, Wheeler B, Shead DA, Naganuma M. Myelodysplastic Syndromes: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2013; JNCCN, 11 (7), 838-74.

6. Greenblatt M.S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994; 54, 4855-78.
7. Soussi, T., p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2017 (26(15)), 2145-56.
8. Soussi, T. and Wiman, KG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 2007; (12(4)), 303-12.
9. Ekmekçi A., Konaç E., Önen H.İ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 2018, 21(3), 282-95.
10. Kokate P., Dalvi R., Koppaka N. ve Mandava S. Prognostic classification of MDS is improved by the inclusion of FISH panel testing with conventional cytogenetics . *Cancer Genetics* 2017, 120–7.
11. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *The American Journal of Medicine* 2012, 125, 2-5.
12. Kanehira K., Ketterling R.P. and Van Dyke D.L. del (5q) in myeloid neoplasms. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2009; 314-6.
13. Schanz J., Tüchler H., Sole F., Mallo M., Luno E., Cervera J., Granada I. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *American Society of Clinical Oncology (Journal Of Clinical Oncology)* 2012, 820-9.
14. Zahid M.F., Malik U.A., Sohail M., Hassan I.N., Ali S., Shaukat M.H.S. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2016, 231-9.
15. Tidow H, Melero R, Mylonas E, Freund SM, Grossmann JG, Carazo JM, Svergun DI, Valle M, Fersht AR. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104 (30), 12324-9.
16. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; (100(14)), 8424-9.
17. Felley-Bosco, E., Weston, A., Cawley, H. M., Bennett, W. P. & Harris, C. C.. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *American Journal of Human Genetics*1993; (53), 752-9.
18. Hamadou W.S., Besbes S., Bourdon V., Youssef Y.B., Laatiri M.A., Noguchi T., Khelif A., Sobol H. and Soua Z. Mutational analysis of TP53 gene in Tunisian familial hematological malignancies and sporadic acute leukemia cases. *Familial Cancer* 2017; 153-7.
19. McGraw K.L., Zhang L.M., Rollison D.E., Basiorka A.A., Fulp W., Rawal B., Jerez A. The relationship of TP53 R72P polymorphism to disease outcome and TP53 mutation in myelodysplastic syndromes . *Blood Cancer Journal* 2015; 1-7.
20. Weich N, Ferri C, Moiraghi B, Bengió R, Giere I, Pavlovsky C, Larripa I, Fundia A. TP53 codon 72 polymorphisim predicts chronic myeloid leukemia susceptibility and treatment outcome. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2016; 129-33.
21. Üren N., Korak T., Altınok D., Ergül E., Güllüoğlu B., Şimşek T. Canturk N.Z., Utkan N.Z, Sazci A. (2016). TP53 (RS1042522) POLYMORPHISM IN BREAST CANCER. *Journal of Health Sciences of Kocaeli University* 2016; 2, 28-31.
22. Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, Larráyoiz MJ, De Paz R, Tormo M, Abáigar M, Pedro C, Cervera J, Such E, José Calasanz M, Díez-Campelo M, Sanz GF, Hernández JM, Luño E, Saumell S, Maciejewski J, Florensa L, Solé F. Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping: A Diagnostic and Prognostic Tool in Myelodysplastic Syndromes with Unsuccessful Conventional Cytogenetic Testing. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2013, 1167-77.