

AML ön tanılı olgularda inv(16) CFBETA-MYH11 inversiyonunun *real time* RT-PCR ile 5 yıllık sonuçlarının değerlendirilmesi

Evaluation of 5-year results of the inversion of inv(16) CFBETA-MYH11 with real time RT-PCR in patients prediagnosed as AML

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Aslı TETİK VARDARLI ¹ | Burçin TEZCANLI KAYMAZ ¹ | Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ ¹ |
| Sunde YILMAZ SÜSLÜER 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, Türkiye

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

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

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na 2009-2013 yılları arasında akut myeloid lösemi (AML) ön tanısı ile başvuran 402 olgunun (322 yetişkin, 80 çocuk) kan veya kemik iliği örneklerinin inv16 kantitasyon analizlerinin RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Hastalardan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden total RNA/mRNA izolasyonunu takiben cDNA'ları elde edilerek revers-transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle inv16 kantitasyonu LightCycler2 cihazında gerçekleştirildi.

Bulgular: Dört yüz iki olgu, inv(16) CFBETA-MYH11 inversiyonu açısından değerlendirildi. Yapılan analiz sonucunda 12 (% 4) erişkin ve 7 (% 9) çocuk olmak üzere toplam 19 olguda inv16 pozitifliği saptandı.

Sonuç: Inv16 kantitatif analizi, AML hastalarının klinik değerlendirilmesinde, hastalığın seyri ve remisyon sağlanmasına yönelik tedavi protokollerinin uygulanmasında etkili bir yöntem olduğunu desteklemektedir. AML hasta grubunu içeren daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak elde edilen sonuçlar desteklenmelidir.

Anahtar Sözcükler: Akut myeloid lösemi, inv16, CFBETA-MYH11, RT-PCR.

Abstract

Aim: In this study, it was aimed to evaluate the analysis of inv16 blood and bone marrow samples quantitatively by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method of 402 patients (322 adult, 80 children) prediagnosed as acute myeloid leukemia (AML), who were admitted to Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology between years 2009-2013.

Materials and Methods: cDNA's were obtained following the total RNA/mRNA isolation which were taken from patients' blood and bone marrow samples and quantitation of inv16 were performed by reverse transcriptase RT-PCR method at LightCycler2.

Results: Four hundred and two cases were evaluated in terms of inv(16) CFBETA-MYH11 inversion. As a result of the analysis, a total of 19 patient were determined inv16 positivity includes 12 adult (% 4) and 7 children (9%).

Yazışma Adresi: Aslı TETİK VARDARLI

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

Makalenin Geliş Tarihi: 06.03.2014 Kabul Tarihi: 06.05.2014

Conclusion: *Inv16 of quantitative analysis is supported to be an effective method for clinical evaluation of patients with AML, regarding remission of disease and implimentation of the treatment protocols toward achieving remission. More studies with AML patients are required for confirmation of the results.*

Keywords: *Acute myeloid leukemia, inv16, CFBFETA-MYH11, RT-PCR.*

Giriş

Kemik iliğindeki hematopoitik kök hücre formasyonu sonucu kan hücreleri gelişmektedir. Lösemi, hematopoitik hücrelerde proliferasyon ve diferansiasyon aşamalarında meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıkan malign bir hastalıktır. Yetişkinlerde görülen lösemilerin %80'ini akut myeloid lösemi (AML) oluşturmaktadır. AML, normal hematopoitik kök hücrelerde meydana gelen genetik değişiklikler sonucu gelişen, fenotipik olarak hastadan hastaya değişiklik gösteren, birçok hastada intraklonal varyasyon saptanan, malign hematopoitik bir düzensizliktir (1,2). Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlarla indüklenen lösemi, onkogenlerin aktive olmasına ya da tümör süpressör genlerin inaktive olmasına neden olan insersiyonlar, delesyonlar, kromozom kırıkları ve füzyonları içeren kromozomal yeniden düzenlemeler sonucu oluşmaktadır. Bu değişiklikler blastların veya anormal lösemi hücrelerinin diferansiasyonunun bloke edilmesine ve/veya aşırı proliferasyonuna sebep olmaktadır (2). AML hastalarında meydana gelen t(15;17), t(8;21), inv16 ve trizomi21 gibi kromozomal anomaliler iyi prognoz; 5-, 7-, 5q-, 7q-, trizomi 8, belirgin hiperdiploidi ve t(6;9) gibi kromozomal anomaliler ise kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmekte ve tedavi planının elde edilen bulgulara göre düzenlenmesi önerilmektedir. Inv16, 16. kromozomun inversiyonu sonucu CFBF-MYH11 füzyon proteininin oluşmasına neden olan ve Fransa-Amerika-İngiltere tarafından yapılan FAB sınıflamasına göre AML hastalarının %8'ini oluşturan akut eozinofilik miyelomonositer lösemi (M4Eo) alt grubunda sıklıkla gözlenen, iyi prognoz göstergesi olarak kabul edilen kromozomal bir anomalidir (3-5). Bu nedenle hastalık tanı ve takibinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Inv16, 16p13'de lokalizasyon gösteren miyozin ağır zincir 11 geni (MYH11) ile 16q22 lokalize olan çekirdek-bağlayıcı faktör beta (CBFB) geninin füzyonu sonucu oluşmaktadır (5). Bu yeniden düzenlenmeler; standart sitogenetik analiz, Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin yanı sıra günümüzde minimal reziduel hastalıkların görüntülenmesinde oldukça önemli bir yöntem olan revers-transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile de saptanabilmektedir (6). Günümüzde kantitatif RT-PCR, hastaların tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve tedavi sonrasındaki füzyon transkript seviyelerinin kantitasyonuna izin veren bir metoddur (7).

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, 2009-2013 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na

Hematoloji Bilim Dalı ve Çocuk Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı'ndan gelen AML ön tanılı 322 erişkin (106 kan, 264 kemik iliği) ve 80 pediatrik olgunun (11 kan, 116 kemik iliği) 127 kan ve 370 kemik iliği örneğinin inv16 (CBFBETA-MYH11) kantitasyon analizi, RT-PCR yöntemi kullanılarak LightCycler2 cihazında gerçekleştirildi.

Olgulardan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden total RNA (MagNA Pure Compact RNA izolasyon kiti) / mRNA (mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow Roche Applied Science) izolasyonları, kit protokollerine uygun olarak yapıldı. RNA izolasyonunu takiben ters transkripsiyon işlemi ile *first strand* cDNA sentezi (komplementer DNA) "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanılarak "Thermal Cycler"da gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, inv16 tespit kiti (Way 2 Gene) kullanılarak 400 baz çifti içeren inv16 cDNA fragmanı, spesifik primerlerle çoğaltılıp spesifik floresan boylarla işaretli problarla hibridize edilerek amplifikasyonları RT-PCR yöntemiyle LightCycler2 cihazında yapıldı. Sonuçlar F2 kanalında kantite edildi. RNA kalitesinin kontrolünde G6PDH kullanıldı. Olguların kantitatif olarak değerlendirilmesi, inv16 (pozitif olgu gen kopya sayısı) / G6PDH (referans gen kopya sayısı) gen ekspresyonuna göre gerçekleştirilerek örnekler negatif ya da pozitif olarak değerlendirildi.

Bulgular

Hematoloji Bilim Dalı'ndan gelen 322 erişkin ile Çocuk Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı'ndan gelen 80 pediatrik olgunun yaş ortalamaları sırasıyla 50.18±15.57 ve 7.62±4.79 olarak belirlendi (Tablo-1). Üç yüz yirmi iki erişkin olgunun 138'i (%43) kadın, 184'ü (%57) erkek; 80 pediatrik olgunun 35'i (%44) kız, 45'i (%56) erkekti (Tablo-1). Erişkin gruptaki 322 olgunun 37'si, pediatrik gruptan 34'ü, toplam 61 olgu tedavi sırasında takibe alındı. Toplam 402 hastadan 497 örnekte inv16 kantitasyon analizi gerçekleştirildi. Inv16 kantitasyonu gerçekleştirilen 497 örnekte, tanının kesinleştirilmesi ve minimal rezidüel hastalık takibi açısından değerlendirilebilmesi için, 86'sı (%55.13) erişkin gruptan, 70'i (%44.87) pediatrik gruptan olmak üzere toplam 156 olgu için 2-5 tekrar olmak üzere inv16 kantitasyonu gerçekleştirildi. Erişkin gruptaki 322 hastadan 12'si (%4), pediatrik grupta ise 7'si (%9) olmak üzere toplam 19 olgu inv16 kantitasyonu açısından pozitif olarak saptandı. Pozitif olgu kopya sayısının Referans kopya sayısına oranının ortalaması (CN değeri) erişkin grupta 0.09±0.17, pediatrik grupta ise 0.14±0.42 olarak bulundu (Tablo-2).

Tablo-1. AML Ön Tanılı Hasta Grubunun Cinsiyet ve Yaş Ortalaması.

| | Erişkin n:322 (% 80.10) | | Çocuk n: 80 (% 19.90) | | Toplam |
|-----------------------|----------------------------|-------|--------------------------|-------|-------------|
| | N | % | n | % | |
| Kadın | 138 (%43) | 79,77 | 35 (%44) | 20,23 | 173 |
| Erkek | 184 (%57) | 80,35 | 45 (%56) | 19,65 | 229 |
| Yaş ortalaması | 50.18±15.57 | | 7.62±4.79 | | 37.41±23.69 |

Tablo-2. AML Ön Tanılı Hasta Grubunda Yapılan Inv16 Kantitasyon Analiz Çalışmasının Değerlendirilmesi.

| | Erişkin n:322 (%80.10) | | Çocuk n: 80 (%19.90) | | Toplam |
|---------------------------|---------------------------|-------|-------------------------|-------|-----------|
| | | % | | % | |
| Takip Hasta Sayısı | 37 | 60.66 | 24 | 39.34 | 61 |
| Kan | 106 (%29) | 90.60 | 11 (%9) | 9.40 | 117 |
| Kemik iliği | 264 (%71) | 69.47 | 116 (%91) | 30.53 | 380 |
| Test Sayısı | 370 | 74.45 | 127 | 25.55 | 497 |
| Test Tekrar Sayısı | 86 (2-4) | 55.13 | 70 (2-5) | 44.87 | 156 (2-5) |
| Pozitif hasta | 12 (%4) | 63.16 | 7 (%9) | 36.84 | 19 |
| Pozitif Test | 14 (%4) | 53.85 | 12 (%9) | 46.15 | 26 |
| CN ortalaması | 0.09±0.17 | | 0.14±0.42 | | 0.11±0.31 |

Tartışma

Günümüzde çeşitli kromozomal yeniden düzenlenmelerin lösemiye neden olduğu bilinmektedir. Lösemi tanı, sınıflandırılma, tedavi ve prognozunun belirlenme basamaklarında sıklıkla bu kromozomal anomaliler kullanılmaktadır. Lösemilerde görülen genetik anomalilerin analizinde kemik iliği veya periferik kan örneklerinden konvansiyonel sitogenetik ile kromozomların karyotip analizi, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve RT-PCR yöntemleri sıklıkla kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (8). FISH metodu spesifik problemler kullanılarak; translokasyonlar, delesyonlar, inversiyon ve kromozomal anöploidileri tespit edilmesinde kullanılan güçlü bir yöntemdir. Bu yöntemin inceleme alanı kullanılan spesifik problemler ile sınırlıdır ayrıca belirli bir anomaliden şüphelenerek analiz yapılması bu tekniğin başlıca dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır (9,10). RT-PCR yönteminin diğer moleküler yöntemlere göre avantajı; yüksek spesifikite, sensitivite ve kısa sürede tanı koyabilme imkanı sağlaması, aynı zamanda pozitif olguların kantitasyon değerinin hesaplanabilmesidir. Ayrıca bu metod özellikle minimal rezidüel hastalık takibi ve relapsların belirlenmesinde de sıklıkla kullanılarak kliniklere büyük katkı sağlamaktadır.

AML'li olguların, özellikle genç hastaların yaklaşık olarak %10-12'sinde, AML (M4Eo) alt grubunda ise inv(16)(p13; q22) genetik anomalisi saptanmaktadır (11,12). Bu anomali sonucu oluşan CFBF-MYH11 füzyon şimerik proteini, myeloid lösemik hücrelerin diferensiasyonunu bloke etmektedir. Lökomogenezin başlayabilmesi için

CBFB-MYH11 şimerik proteinin ekspresyonunun tek başına yeterli olmadığı ve AML'nin gelişebilmesi için ayrıca c-KIT mutasyonu gibi mutasyonların gerçekleşmesi gerektiği bildirilmektedir. Prognoz amaçlı AML-spesifik füzyon genleri, olgu sayısının sınırlı sayıda olması nedeni ile değerlendirilememektedir. Bununla birlikte bugüne kadar CFBF-AML hastalarını içeren geniş çaplı prognoz çalışması henüz rapor edilmemiştir (5,13).

Liu ve ark. (12), 308 AML'li olguda yaptıkları çalışmada 18 olguda (%6) CFBF-MYH11 geni saptamışlardır. Poirel (14) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, 241 AML'li olgudan 206'sında inv16 pozitifliği saptanmıştır. Martin ve ark. (15), yapmış oldukları başka bir çalışmada ise AML'li hasta grubunda 16 olgudan 15'inde CFBF-MYH11 pozitif olarak bulmuşlardır. Bu olgulardan 8 tanesinde 18 ay içinde relaps gözlenmiştir. Kömür ve ark. (16), AML'li 34 olguda yaptıkları çalışmada ise 1 (%3) olgu CFBF-MYH11 geni açısından pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ise erişkin gruptaki 322 olgudan 12'si (%4), pediatrik gruptan 80 olgudan 7'si (%9) olmak üzere toplam 19 olguda inv16 pozitifliği saptanmıştır. Inv16 pozitifliği saptanan 3 pediatrik olguda tanıdan 1 ay sonra remisyon gözlenmiştir.

Sonuç

Genetik anomaliler, lösemilerde prognoz belirlenmesinde önemli role sahiptir. AML'li olgulardan elde ettiğimiz sonuçlar, farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. AML hasta grubunu içeren, daha geniş kapsamlı prognostik çalışmalar yapılarak elde edilen sonuçlar desteklenmelidir.

Kaynaklar

1. Adriaansen HJ, te Boekhorst PA, Hagemeijer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993; 81(11):3043-51.
2. Elias JJ, Eliheu E, Hagop MK. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(2): 247-60.
3. Bart L, Yue H, Kristie LD, and Scott WH. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1transcriptional corepressor. *PNAS* 1999;96(22):12822-27.
4. Kristie LD, Bart L, Tanawan K, Alan DF, Scott WH. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol* 2003;23(2):607-19.
5. Carlos AT, Federico V, Laura K, et al. Acute myeloid leukemia with inv(16) with CBFBeMYH11, 30 CBFb deletion, variant t(9;22) with BCR-ABL1, and del(7)(q22q32) in a pediatric patient: Case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;200(1):54-9.
6. Kobayashi T, Ichikawa M, Kamikubo Y, Kurokawa M. Acute myeloid leukemia with cryptic CBFb-MYH11 type D. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(1):110-2.
7. Susanne S, Martin W, Claudia S, Wolfgang H, Torsten H, Wolfgang K. New score predicting for prognosis in PML-RARA, AML1-ETO, or CBFb- MYH11 acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003;102(8):2746-55.
8. Yasemin S, Muhterem B, Cengiz Y, Ahmet İ, Emin K. Lösemilerin genetik tanısında sitogenetik ve floresan in situ hibridizasyon yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Derg* 2009;10(1):41-7.
9. Fischer K, Scholl C, Salat J, Dohner H. Design and validation of DNA probe sets for a comprehensive interphase cytogenetic analysis acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;88(10):3962-71.
10. Anastasi J. Genetic and molecular genetic studies in the diagnosis of myeloid diseases. *Hum Pathol* 2003;34(4):306-13.
11. Marlton P, Keating M, Kantarjian H, et al. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia* 1995;9(6):965-71.
12. Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, et al. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995;85(9):2289-302.
13. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, et al. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): A survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003;102(2):462-9.
14. Poirel H, Radford-Weiss I, Rack K, et al. Detection of the chromosome 16 CBF beta-MYH11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias. *Blood* 1995;85(5):1313-22.
15. Martin G, Barragan E, Bolufer P, et al. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica* 2000;85(7):699-703.
16. Kömür M, Erbey F, Bayram İ, Yanyeli A. Incidence and prognostic importance of molecular genetic defects in children with acute myeloblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11(5):1393-5.