

Akut lenfoblastik lösemi hastalarında t(12;21) TEL-AML1 translokasyonunun gerçek zamanlı qRT-PZR ile 5 yıllık sonuçlarının değerlendirilmesi

The evaluation of t(12;21) TEL-AML1 translocation in acute lymphoblastic leukemia patients by real-time qRT-PCR with 5-year follow-up results

Nur Selvi Günel,¹ Burçin Tezcanlı Kaymaz,¹ Vildan Bozok Çetintaş,¹ Aslı Tetik Vardarlı,¹ Sunde Yılmaz Süslüer,¹ Duygu Aygüneş,¹ Ayegül Dalmazrak,¹ Çağdaş Aktan,¹ Ali Şahin Küçükaslan,¹ Tuğçe Balcı,¹ Çağla Kayabaşı,¹ Besra Özmen Yelken,¹ Çığır Biray Avcı,¹ Buket Kosova,¹ Zuhale Eroğlu,¹ Serap Aksoylar,² Nazan Çetingül,² Can Balkan,³ Deniz Yılmaz,³ Yeşim Aydınok,³ Kaan Kavaklı,³ Mahmut Töbü,⁴ Murat Tombuloğlu,⁴ Filiz Büyükkeçeci,⁴ Fahri Şahin,⁴ Güray Saydam,⁴ Cumhuriyet Gündüz¹

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 akut lenfoblastik lösemi (ALL) ön tanılı olgularda t(12;21) translokasyonu gerçek zamanlı kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemi kullanılarak kantite edildi.

Hastalar ve yöntemler: Ocak 2009 - Aralık 2013 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na başvuran 175 pediatrik ve 138 erişkin olmak üzere toplam 313 olguya ait kan ve kemik iliği örneklerinde t(12;22) (p13;q22) translokasyonu RNA sonuçları kantitatif olarak değerlendirildi. Olgulara ait 75 kan ve 484 kemik iliği örneklerinden total RNA veya haberci RNA izole edildi. RNA izolasyonlarının ardından tamamlayıcı DNA sentezi gerçekleştirildi. t(12;21) (p13;q22) translokasyon çalışması LightCycler t(12;21) Kit'i ile füzyon transkriptte özgül biçimde tasarlanmış primer ve problarla (Way2Gene) uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Son adım olarak t(12;21) translokasyon sonuçlarının kantitatif olarak değerlendirilmesi gerçek zamanlı qRT-PZR yöntemi kullanılarak LightCycler2 ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Otuz dört pediatrik olgu (örneğin %19) ve 17 erişkin olgunun (örneğin %12) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) pozitif bulundu. TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) kantitasyon değeri ortalaması pediatrik olgularda 0.90 ± 3.21 , erişkin olgularda ise 0.34 ± 1.20 olarak belirlendi.

Sonuç: Elde ettiğimiz veriler, gerçek zamanlı qRT-PZR yöntemi ile ALL hastalarında yeni tanı döneminde ve tedavi sürecinde t(12;21) translokasyonunun kantitatif tayininin hem tanının kesinleştirilmesinde hem de moleküler remisyon sağlanmasına yönelik tedaviyi yönlendirmesinde değerli bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Akut lenfoblastik lösemi; polimeraz zincir reaksiyonu; revers transkriptaz.

ABSTRACT

Objectives: This study aims to quantify the t(12;21) translocation in cases pre-diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL) using the real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) method.

Patients and methods: Between January 2009 and December 2013, results of RNA t(12;22) (p13;q22) translocation belonging to blood and bone marrow samples of 175 pediatric and 138 adults, a total of 313 patients, who were admitted to the Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Ege University, were evaluated in this study. Total RNA or messenger RNA isolation was performed for 75 peripheral and 484 bone marrow samples belonging to the cases. Following the RNA isolation, we carried out the complementary DNA synthesis. We performed t(12;21) (p13;q22) translocation appropriate to the primer and probes (Way2Gene) specifically designed for the fusion transcripts by using LightCycler t(12;21) Kit. As the final step, we carried out quantitative evaluations of t(12;21) translocation results via the real-time qRT-PCR method of LightCycler2.

Results: We found 34 pediatric cases (19%) and 17 adults cases (12%) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) positive. While the average of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) quantification value was 0.90 ± 3.21 for pediatric cases, it was 0.34 ± 1.20 for adult cases.

Conclusion: Our findings support that quantitative assessment of t(12;21) translocation by real-time qRT-PCR method is a valuable one to lead the treatment towards confirming the diagnosis and achieving the molecular remissions in ALL patients during the new diagnostic period and treatment period.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia; polymerase chain reaction; reverse transcriptase.

Geliş tarihi: 06 Temmuz 2016 **Kabul tarihi:** 11 Ağustos 2016

İletişim adresi: Dr. Nur Selvi Günel. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 35040 Bornova, İzmir, Türkiye.

Tel: 0232 - 390 22 60 e-posta: selvi.nur@gmail.com

Lösemi, hematopoyetik hücrelerdeki proliferasyon ve diferansiyasyon dengesinin bozulması sonucu ortaya çıkan malign bir hastalıktır. Genetik değişikliklerin sonucu olarak transforme olan hematopoyetik hücrelerin klonal olarak proliferasyonu söz konusudur.^[1,2] Çocukluk çağı lösemilerinin en sık görülen formu olan prekürsör B ve T akut lenfoblastik lösemi (ALL)/lenfoblastik lenfoma (LBL) B ve T hücre serisini oluşturacak lenfoblastlardan kaynaklanan neoplazilerdir. Akut lenfoblastik lösemilerin %80-85'i ve LBL'lerin %10'u prekürsör B hücrelerinden, ALL'lerin %15-20'si ve LBL'lerin %90'ı prekürsör T hücrelerinden kaynaklanmaktadır.^[3,4] Pediatrik ALL hastalarının %22-27'sinde, erişkin B-ALL olgularının %3'ünde t(12;21) (p13;q22) gözlenmektedir ve özellikle erken ALL alt tipi ile ilişkilidir. t(12;21) (p13;q22) translokasyonu sonucunda TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) kimerik geni oluşur.^[5,6]

Pediatrik ALL hastalarında t(12;21) translokasyonu sıklıkla gözlenen bir anomalidir. TEL (translocation-Ets-leukemia or ETV6) geninde en sık gözlenen kırılma noktası 5. ekzondadır ve AML-1 geni 2. ekzon ile birleşir. Nadir olarak TEL 5. ekzon ile AML-1 3. ekzon arasında da füzyon gözlenir. t(12;21) (p13;q22) translokasyonu sonucunda TEL-AML1 kimerik geni oluşur.^[7,8] Prognozun saptanması ve tedavi yaklaşımının belirlenmesi açısından bu translokasyonun t(9;22), t(4;11) ve t(1;19) translokasyonları ile birlikte değerlendirilmesi önemlidir.^[9] Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yönteminin hassasiyeti sayesinde t(12;21) translokasyonunun tanısı ve hastanın tedaviye yanıtı ile remisyonunun moleküler takibi kolaylaşmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile t(12;21) translokasyonu kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir. Translokasyon varlığı, klasik sitogenetik yöntemleri ve FISH (Floresan in situ hibridizasyon) yöntemi kullanılarak da tespit edilebilmektedir. FISH analizi interfaz nükleusunda analizi sağlayan kanser genetiğinde sıklıkla kullanılan tekniklerden biridir. Ancak tümör hücrelerinde metafaz kromozom eldesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Özellikle kemik iliği örneklerinde bu moleküler yöntemler ile sorun yaşanabilmektedir. Bu durumlarda, gerçek zamanlı qRT-PZR yöntemi en sık tercih edilen yöntemlerden biridir.

Bu çalışmada amacımız, ALL ön tanılı olgulara ait kan ya da kemik iliği materyallerinden t(12;21) translokasyonunun gerçek zamanlı qRT-PZR ile kantite edilip değerlendirilmesidir.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Ocak 2009 - Aralık 2013 tarihleri arasında akut lösemi ön tanısıyla 138 erişkin (57 kadın, 81 erkek) ve 175 pediatrik (71 kız, 104 erkek) olmak üzere toplam 313 olgunun Hematoloji-Onkoloji Klinikleri'nden gönderilen örnekleri dahil edildi. İncelenen örnekler kan ve kemik iliği olmak üzere tarafımıza ulaştırıldı ve örneklerden total RNA veya haberci RNA (mRNA) izole edildi ve çalışmanın yapılacağı zamana kadar -80 °C'de saklandı. t(12;21) (p13;q22) translokasyon çalışması iki aşamalı olarak LightCycler t(12;21) Kit'i ve füzyon transkripte özgül biçimde tasarlandı ve primer ve problara (Way2Gene) uygun olacak şekilde tarafımızdan gerçekleştirildi. İlk aşamada, konvansiyonel bir PZR cihazı ile total RNA veya mRNA'dan 'first-strand'-cDNA sentezlendi. Bu amaçla, her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol için reaktiflerden belirlenen oran ve konsantrasyonlarda reaksiyon karışımı hazırlandı ve her bir örnek için 7.5 µL master mix üzerine sırası ile 2.5 µL izole örnek total RNA veya mRNA'sı ve bidistile H₂O ilave edildi. Örnekler daha sonra PZR cihazına yerleştirilip, termal profile uygun olarak 'first-strand'-tamamlayıcı DNA (cDNA)'ları sentezlendi. Tamamlayıcı DNA için reaksiyon karışımının hazırlanışı Tablo 1'de, PZR protokolü ise Tablo 2'de verilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, t(12;21) translokasyonu kantitatif olarak çalışıldı. Bunun için her bir örnek, pozitif ve negatif kontrolden sentezlenmiş

Tablo 1. Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit reaksiyon protokolü

	µL
Nükleaz serbest su	1.6
10x reaksiyon tamponu	1.0
MgCl ₂	2.0
Deoksiribonükleotid karışımı	1.0
Primer	1.0
RNaz inhibitör	0.5
AMW revers transkriptaz	0.4
<i>Toplam</i>	<i>7.5</i>

AMV: Avian Myeloblastosis Virus.

Tablo 2. Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit eldesi için polimeraz zincir reaksiyonu programı

Derece (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
42	60	1
99	5	1
4	5	1

olan 'first-strand'-cDNA'nın 2.5 µL'si ile reaktiflerin belirlenen oran ve konsantrasyonları ile hazırlanan reaksiyon karışımları ile amplifiye edildi. Amplifikasyon ve kantitatif olarak örneklerin değerlendirilmesi çalışmaları gerçek zamanlı bir PZR cihazı olan LightCycler® (LC, Roche Applied Science, Mannheim, Almanya) ile gerçekleştirildi. LightCycler® cihazında ısı değişiminin 20 °C/sn olması testin çalışma süresini oldukça kısaltmaktadır. Analiz yöntemi ise floresans rezonans enerji transfer (FRET) tekniğine dayanmaktadır. Her döngünün 'annealing' aşaması sonunda ölçülen floresan şiddetinin artmaya başladığı an oluşan amplikonun logaritmik faza girdiği döngüyü belirler. Olguların kantitatif olarak değerlendirilmesi, pozitif kontrol ve negatif kontrolün karşılaştırılması ile örneklerin pozitif ya da negatif olması şeklinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan olgulara ait 75 kan ve 484 kemik iliği örneğinde t(12;21) (p13;q22) translokasyonu kantitatif olarak değerlendirildi. TEL-AML1 kantitatif sonuçları; kopya sayısı (copy number; CN) olarak hesaplandı.

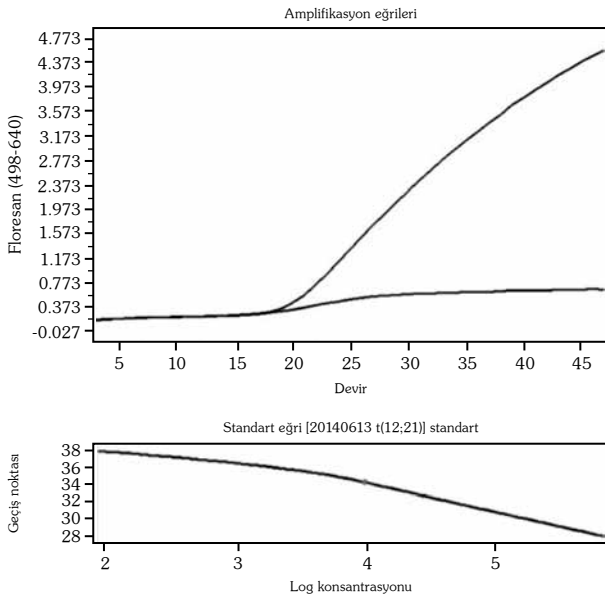
Bu sonuçlara göre, 34 pediatrik (%19) ve 17 erişkin (%12) olmak üzere toplam 51 olguda t(12;21) (p13;q22) translokasyonu pozitif bulundu. TEL-AML1 kantitasyon değeri ortalaması pediatrik olgularda 0.90 ± 3.21 , erişkin olgularda ise 0.34 ± 1.20 olarak belirlendi. Tüm olgulara ait ortalama kantitasyon değeri; 0.74 ± 2.80 olarak hesaplandı. Pediatrik ve erişkin olgular birlikte değerlendirildiğinde, çalışılan toplam 559 t(12;21) translokasyonu testinin 344'ünü (2-10) arasında değişen sayıda tekrar edilen örnekler oluşturdu.

Çalışmamızda, 313 olguda t(12;21) TEL-AML1 kromozomal yeniden düzenlenmenin qRT-PZR yöntemi ile belirlendi, bu olguların 148'inde takip hastası oldu. Bu olgular tedaviye yanıtın izlenmesinde takip edildi aynı zamanda moleküler remisyon açısından da değerlendirildi. Toplam olarak 27 olguda moleküler remisyon izlendi, bu olguların 23'ü pediatrik, dördü erişkin idi. Lightcyler 2.0 cihazında değerlendirilen t(12;21) TEL-AML1 translokasyonu sonuçlarına ait; pozitif ve negatif olan bir olgu Şekil 1 ve 2'de çalışmamıza ait tüm veriler ise Tablo 3'de verilmiştir.

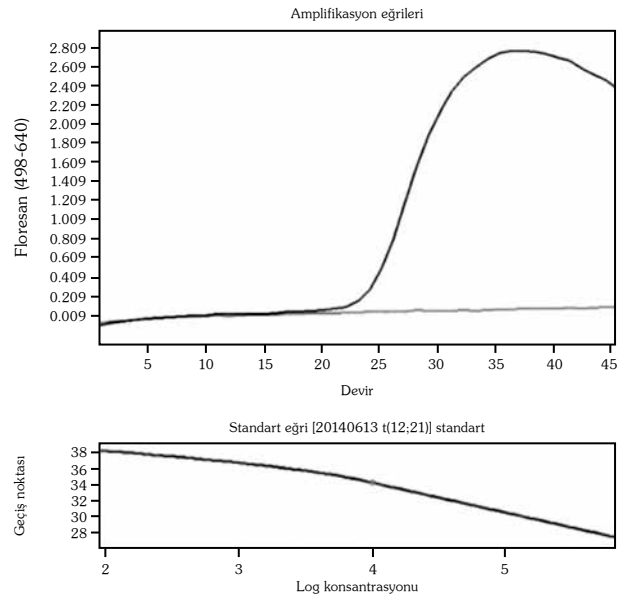
Tablo 3. ALL hasta grubunda yapılan t(12;21) kantitasyon analiz çalışmasının değerlendirilmesi ve olguların demografik özellikleri

	Pediatri			İç Hastalıkları hematoloji			Toplam		
	n	%	Ort.±SS	n	%	Ort.±SS	n	%	Ort.±SS
	Dağılım			Dağılım			Dağılım		
Test sayısı	392			167			559	29.87	
Hasta sayısı	175	70.13		138			313	44.09	
Takep hasta sayısı	73	74.49		75			148	25.51	
Test tekrar sayısı	285	82.85	2-10	59		2-5	344	17.15	2-10
Cinsiyet									
Kadın	71	41		57	41		128	44.53	
Erkek	104	59		81	59		185	43.78	
Yaş ortalaması			7.72±5.23			45.70±117.41			19.68±20.66
Pozitif hasta	34	19		17	12		51	33.33	
Pozitif test	44	11	0.90±3.21	17	10	0.34±1.20	61	27.87	0.74±2.80
CN (kopya sayısı) ortalaması									
Kan	16	4		59	35		75	78.67	
Kemik iliği	376	96		108	65		484	22.31	

Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma.



Şekil 1. t(12;21) translokasyonu pozitif bulunan bir olgu.



Şekil 2. t(12;21) translokasyonu negatif bulunan bir olgu.

TARTIŞMA

Prekürsör B ve T ALL / LBL B ve T hücre serisini oluşturacak lenfoblastlardan kaynaklanan neoplazilerdir ve çocukluk çağı lösemilerinde oldukça sık görülür.^[10,11]

Klonal özellik taşıyan kromozomal sayısal ya da yapısal düzensizliklerin moleküler analizlerinin yapılması; hastalığın biyolojisinin anlaşılması ve bu düzensizliklerin “lökomogenesis” deki rollerinin aydınlatılması açısından da oldukça önemlidir.^[12] Pediatrik ALL hastalarının, erişkin B-ALL olgularında t(12;21) (p13;q22) translokasyonu gözlenmektedir ve özellikle erken ALL alt tipi ile ilişkilidir.^[13,14] Bu spesifik kromozomların hastalığın tanısı ve tedavisi süresince ve sonrasında kalitatif ve kantitatif olarak saptanması, terapötik ilaca verilen yanıtın değerlendirilmesi ve minimal rezidüel hastalık takibi bakımından da oldukça önemlidir.^[15] Günümüzde floresan ışımaya tekniklerinin gelişimi RT-PZR ile çalışma imkanı sağlamış bu teknik ile kısa sürede sonuç alınabilmesi lösemi hastalıklarının tanı ve tedavisinde büyük kolaylıklar sağlamıştır. Yeniden düzenlenmenin olduğu bölgeye ait özgü primer ve problemlerin seçimi yöntemin hassasiyetini ortaya koymakta ve diğer moleküler yöntemlere göre özgüllüğünü göstermektedir Gerçek zamanlı PZR ile bireysel genetik değişimler kolaylıkla takip edilebilmekte böylece bireysel

tedaviye katkıda bulunabilmektedir.^[16,17] Iğbal’in^[8] yaptığı çalışmada, 167 olgunun 17’sinde (%10.2) TEL-AML1 pozitif bulunmuştur. TEL-AML1 pozitif bulunan hastaların %82.4’ünde (14/17) erken remisyona gözlenmiştir.^[18] Başka bir çalışmada ise, çalışmamıza benzer olarak TEL-AML1 geni revers transkriptaz PZR yöntemi ile çalışılmış ve 63 kan ve kemik iliği örneğinde, %34.9 pozitiflik bulmuşlardır.^[18] Gandemer ve ark.^[19] ise 60 pediatrik olguda gerçekleştirdikleri çalışmada, qRT-PZR yöntemi ile 16 olguda TEL-AML1 pozitifliği, 44 olguda ise TEL-AML1 negatifliği bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda ise 175 pediatrik ve 138 erişkin örneğinin t(12;21) translokasyonu sonucu, pediatrik olgularda 34 (%19) pozitiflik bulunurken, erişkin olgularda 17 (%12) pozitiflik bulundu. Bu hastaların 148’i takip hastası oldu ve bu olguların 27’sinde moleküler remisyona izlendi.

Akut lenfoblastik lösemili olgulardan elde ettiğimiz sonuçlar farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Sonuç olarak, qRT-PZR ile bireysel genetik değişimler kolaylıkla takip edilebilmekte böylece bireysel tedaviye katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca özellikle kemik iliği örneklerinde FISH (Floresan in situ hibridizasyon) yöntemi ile sonuç elde edilemediği durumlarda da RT-PZR ALL hastalarının tanı ve takibinde büyük katkılar

sağlamaktadır. Diğer yandan, moleküler yöntemlerin katkısı aynı zamanda tanı ve tedavideki ilerlemeler riske göre tedaviyi gündeme getirmiştir.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Linka Y, Ginzel S, Krüger M, Novosel A, Gombert M, Kremmer E, et al. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer J* 2013;3:151.
- Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:655-74.
- Borst L, Wesolowska A, Joshi T, Borup R, Nielsen FC, Andersen MK, et al. Genome-wide analysis of cytogenetic aberrations in ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;157:476-82.
- Kantner HP, Warsch W, Delogu A, Bauer E, Esterbauer H, Casanova E, et al. ETV6/RUNX1 induces reactive oxygen species and drives the accumulation of DNA damage in B cells. *Neoplasia* 2013;15:1292-300.
- Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 2004;23:4275-83.
- Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, van Wering ER, Janka-Schaub GE, et al. Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:2974-80.
- Costa O, Schneider P, Coquet L, Chan P, Penther D, Legrand E, et al. Proteomic profile of pre - B2 lymphoblasts from children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in relation with the translocation (12; 21). *Clin Proteomics* 2014;11:31.
- Iqbal Z. Molecular genetic studies on 167 pediatric ALL patients from different areas of Pakistan confirm a low frequency of the favorable prognosis fusion oncogene TEL-AML1 (t 12; 21) in underdeveloped countries of the region. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:3541-6.
- Fueller E, Schaefer D, Fischer U, Krell PF, Stanulla M, Borkhardt A, et al. Genomic inverse PCR for exploration of ligated breakpoints (GIPFEL), a new method to detect translocations in leukemia. *PLoS One* 2014;9:104419.
- Borowitz MJ, DiGiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia. In: Knowles DM, editor. *Neoplastic hematopathology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1643-66.
- Knowles DM. Lymphoblastic lymphoma. In: Knowles DM, editor. *Neoplastic hematopathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin; 2001. p. 915-52.
- Yakut T, Gülten T. Çocukluk çağı lösemilerindeki genetik değişiklikler ve klinik önemi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005;31:57-66.
- Aksu Uzunhan T, Karakaş Z. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi. *Çocuk Dergisi* 2012;12:6-15.
- Seyfarth J, Madsen HO, Nyvold C, Ryder LP, Clausen N, Jonmundsson GK, et al. Post-induction residual disease in translocation t(12;21)-positive childhood ALL. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:82-7.
- Stock W, Estrov Z. Studies of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:1289-305.
- Salari F, Shahjehani M, Shahrabi S, Saki N. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: optimal methods and clinical relevance, pitfalls and recent approaches. *Med Oncol* 2014;31:266.
- Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007;21:622-6.
- Rahnemoon AR, Zaker F, Izadyar M, Ansari S, Poopak B, Tadavosyan Y. Prevalence of ETV6/RUNX1 Fusion Gene in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Iran. *Iran J Pediatr* 2013;23:681-6.
- Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, Sibut V, Mottier S, Ly Sunnaram B, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. *BMC Genomics* 2007;8:385.