

Kronik Miyeloid Lösemide Genetik Tanı

Genetic Diagnosis in Chronic Myeloid Leukemia

Haktan Bağış Erdem¹, Ayşegül Öztürk Kaymak²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Kliniği, Ankara, Türkiye

²Düzen Laboratuvarlar Grubu, Genetik Tanı Merkezi, Ankara, Türkiye

ÖZET

Kronik miyeloid lösemi (KML), erişkinlerdeki lösemilerin %15-20'sini oluşturan ve nadir hastalıklar grubunda yer alan bir hematolojik malignitedir. KML'de genetik tanı, genetik biliminin kendi alt disiplinleri arasındaki iş birliği ile yürütülmesi gereken ve hastanın klinik bilgilerinin de takip sırasında göz önünde bulundurulması elzem olan uzun bir süreci kapsamaktadır. Sitogenetik, floresan in situ hibridizasyon ve real-time PCR yöntemleri tanı ve takipte; Sanger dizileme ve yeni nesil dizileme yöntemleri ise özellikle prognoz tayini ve tedavi direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Gelecekte yapılacak ekzom, genom ve transkriptom düzeyindeki çalışmalar ile mevcut genetik tanı algoritmalarının revize edilerek tedavilerin daha etkin hale gelmesinin sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kronik miyeloid lösemi, BCR-ABL1, genetik

Geliş Tarihi: 06.03.2020

Kabul Tarihi: 11.03.2020

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematological malignancy that constitutes 15-20% of leukemias in adults and is in the rare diseases group. In CML, genetic diagnosis involves a long process, which should be carried out in collaboration between the sub-disciplines of medical genetics, and that the clinical information of the patient should be taken into consideration during follow-up. While cytogenetics, fluorescent in situ hybridization and real-time PCR methods are used in diagnosis and follow-up; Sanger sequencing and next generation sequencing methods are especially used in determining prognosis and treatment resistance. It is thought that the current genetic diagnostic algorithms will be revised and the treatments will be made more effective with future exom, genome and transcriptom studies.

Key Words: Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1, genetics

Received: 03.06.2020

Accepted: 03.11.2020

ORCID ID:H.B.E. 0000-0002-4391-1387, A.Ö.K. 0000-0003-1116-8346

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Haktan Bağış Erdem, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Kliniği, Ankara, Türkiye E-posta: haktanbagis@atauni.edu.tr

©Telif Hakkı 2020 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2020.60>

GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML) insidansı 1-2 vaka/100.000/yıl olan, erişkinlerdeki lösemilerin %15-20'sini oluşturan ve nadir hastalıklar grubunda yer alan bir hematolojik malignitedir (1). Neoplastik hücrelerin menşei primitif pluripotent kök hücreler olmakla birlikte; kemik iliğinde miyeloid hiperplazi, periferik kanda olgun miyeloid hücrelerden kaynaklanan bazofilinin de görüldüğü lökosit artışı ve splenomegali ile karakteristiktir.

KML'nin kliniğine ve tedavi direncine zemin hazırlayan moleküler etyopatogenez mekanizması, hassas tıp (precision medicine) uygulamalarının geliştirilmesinde kilometre taşı olmuştur. Bilindiği üzere, insan genom projesinin 2003 yılında tamamlanarak tüm insan genom dizisinin çıkarılması, "omik teknolojileri" denilen yeni bir çağ açmıştır. KML'ye yaklaşımın tarihsel gelişimine bakıldığında omik teknolojilerinin temeli aslında günümüzden 61 yıl önceye, yani Philadelphia kromozomu – t(9; 22)(q34; q11) ile KML'nin ilişkisinin gösterildiği tarihe kadar dayanmaktadır (2). Sonrasında yapılan çalışmalar da bu translokasyon neticesinde oluşan BCR/ABL1 füzyon geninin ürünü olan 210 kDa (p210) molekül ağırlığındaki proteinin, tirozin-kinaz aktivitesini etkileyerek kontrolsüz hücre çoğalmasını indüklediğini ispatlamıştır (3). Hastaların çoğunluğunda p210 proteini görülmele birlikte, kromozomal kırık noktalarının varyasyonu sebebiyle %5 oranda p190 proteini, %1'den daha az oranda da e14a3, e13a3, e1a3, e19a3, e6a2, e8a2 ve e18a2 proteinleri tespit edilebilmektedir (4, 5).

KML hastalığının moleküler etyopatogenezine yönelik bu önemli keşifler tedavi anlayışına da yeni bir bakış açısı kazandırmış ve günümüzde birçok hastalıkta kullanıma giren veya henüz araştırma-geliştirme aşamasında olan hedefe yönelik tedavilerin gündeme gelmesini sağlamıştır. Bu minvalde, 2001 yılında piyasaya sürülen tirozin kinaz inhibitörü (TKI) imatinib mesylate molekülü KML hastalarında hala ilk seçenek olarak tercih edilmektedir (6).

Hem hastalık tanısında hem de tedavi direncinin belirlenmesinde KML hastalarında genetik testlerin önemi yadsınamayacak düzeydedir. Yazımızda KML tanılı hastalarda genetik testler açısından uygulanacak algoritma ele alınarak, rutindeki moleküler yöntemlerin detaylı karşılaştırılması sunulacaktır.

SİTOGENETİK

Sitogenetik analizler rutinde genetik hastalıkların prenatal ve postnatal tanısında germline düzeyde ve hematolojik-onkolojik malignitelere de somatik düzeyde uygulanan, kromozomların yapısal ve sayısal anomalilerinin analiz edildiği yöntemdir. KML vakalarında kemik iliği hücre kültürleri, 37°C'de 24 veya 48 saat süresince inkübe edilir. Kültür işleminin sonlandırılmasına 30 dakika kala kolşisin etken maddesi ilave edilerek harvest (çıkartım) aşamasına geçilir. Hazırlanan preparatlara Giemsa bantlaması yapılarak metafaz plağındaki kromozomlar manuel ya da otomatik slayt tarayıcı yardımıyla analiz edilir. Uluslararası standartlar gereğince en az 20 metafaz plağı analiz edilmelidir. Analize dair bulgular güncel yayımlanmış ISCN'ye (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak rapor edilmektedir.

Öncesinde de belirtildiği üzere ilk kez KML'de, bir kromozomal anomali (t(9; 22)(q34; q11)) bir malignite ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Aradan geçen zaman içerisinde farklı kanser türlerinin tanı, evreleme ve prognoz tayininde efektif olarak kullanılabilecek birçok sitogenetik biyobelirteç bildirilmiştir.

Kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan kromozom analizlerinde t(9;22) bulgusuna ek olarak; trizomi 8, ekstra Philadelphia kromozomu, izokromozom 17q, trizomi 19, trizomi 20, Y kromozom kaybı, trizomi 17, monozomi 7, trizomi 21 görülebilir. Trizomi 8, ekstra Philadelphia kromozomu, izokromozom 17q ve trizomi 19 gibi anomalilerin varlığı, prognoza olumsuz etki etmektedir. Özellikle, TP53 geninin 17. kromozom üzerinde yerleşik olması sebebiyle, bu gendeki fonksiyon kayıplarının da doğal olarak prognoza olumsuz yansımaları beklenmektedir. Kronik fazdaki hastalarda ek kromozomal anomali oranı yaklaşık %5 olarak bildirilmişken, blastik faza giden hastalarda bu oran %50-80'e kadar çıkabilmektedir (7).

KML olgularında özellikle ilk tanıma olmak üzere, tedavi takibi ve prognoz belirlemede kemik iliğinden yapılan sitogenetik analiz önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle floresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminde t(9;22)'nin klasik sinyal paterni ile uyumsuz (atipik) durumlarda; kompleks karyotip yapısını tespit etmek için diğer kromozomal bantlama yöntemleri (C-bantlama, R-bantlama, NOR (nucleolar organizer region) gümüş boyama), spektral karyotipleme gibi ileri sitogenetik teknikler ve alternatif moleküler genetik yöntemler tercih edilmelidir.

FLORESAN IN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)

FISH yöntemi, metafaz ya da interfaz aşamasında durdurulmuş hücrelere, ilgili bölgeye yerleştirilen spesifik problemlerin floresan ışımaya ile sinyal vermesi esasına dayanarak uygulanmaktadır. İnterfaz aşamasında analiz edilecek örnekten hücre kültürü yapılmasına gerek olmadığından, metafaz aşamasındaki FISH uygulamalarına göre daha kısa sürede ve daha fazla sayıda hücrede analiz gerçekleştirilmektedir. FISH sinyallerinin değerlendirilmesi, floresan mikroskop yardımı ile yapılmaktadır. Kaynaşmış ışımaları translokasyon ışımaları olarak değerlendirilmekte, normalde 2n DNA miktarında beklenen BCR ve ABL1 bölgelerine ait sinyal paternleri ikişer tane görülmesi gerekirken translokasyon sebebiyle birer tane görülecektir. Kompleks yeni düzenlemeler ve kromozom analizlerinde bulunan kompleks kromozomal değişikliklerin gerçekleşmesi sonucunda atipik sinyal paternleri ortaya çıkabilir. Bu durumlarda eğer şimdiye kadar yapılmamışsa kemik iliğinden kromozom analizi endikasyonu mevcuttur. Ayrıca, kemik iliği transplantasyonu süresince hastalar kemik iliğini baskılayıcı tedavi aldıklarından, sitogenetik analiz için yeterli kadar metafaz elde edilemeyebilir. FISH, bu tip durumlarda kullanışlı bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır.

Hassasiyet açısından FISH yönteminin, konvansiyonel sitogenetik yöntemlere göre daha hassas olduğu bilinmektedir. Konvansiyonel sitogenetik ile Philadelphia kromozomu %1 kopya oranına kadar tespit edilebilirken, FISH yönteminde bu oran %0.2'ye kadar inebilmektedir (8).

REAL TIME-PCR (RT-PCR)

KML hastalarının özellikle tedavi takibi sırasında nüks ve remisyon durumlarının saptanmasında en sık kullanılan yöntem RT-PCR yöntemidir. Bu yöntemin çalışma prensibi, BCR/ABL1 füzyon genine ait transkriptlerin, ABL1 genine ait transkriptlere oranlanması esasına dayanır. Bu sayede kandaki rezidüel lösemik hücrelerin miktarı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. RT-PCR yöntemi 100.000 hücre içerisindeki bir lösemik hücreyi saptayabilecek hassasiyete sahiptir (9). Tedaviye moleküler yanıt takibi, çalışma sonucunda elde edilen IS (international scale) değerine göre yapılmaktadır (10). BCR/ABL1'in ABL1 kontrol genine oranının %0.1'in altına düşmesi (≥ 3 log azalma), majör moleküler yanıt (MMR – majör molecular response) olarak tanımlanmaktadır. Bu oranın sıfır olması ise komplet moleküler yanıt (CMR – complet molecular response) ulaşıldığını ifade eder (11).

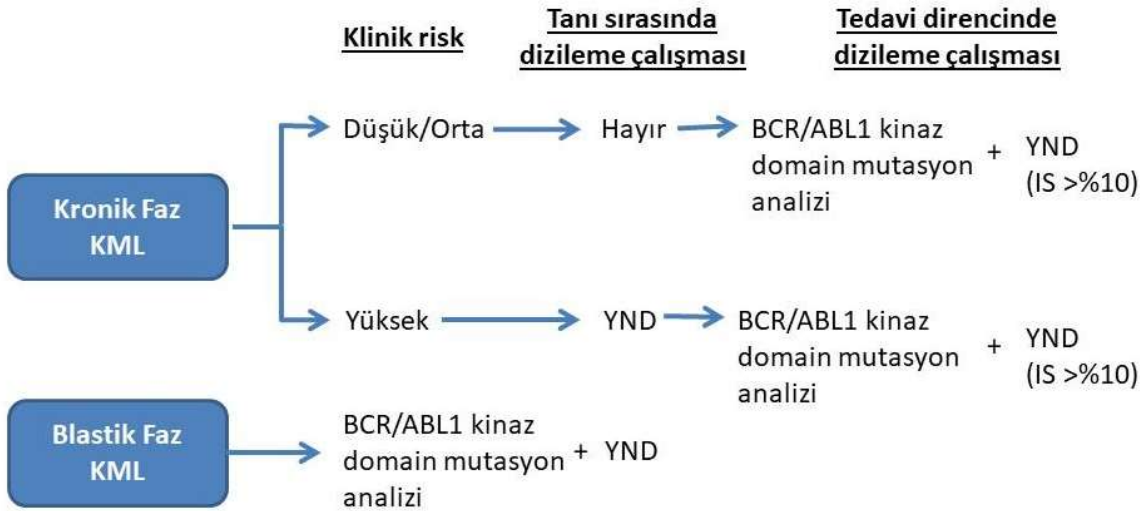
Günümüzde, RT-PCR yöntemi hala KML'ye moleküler yanıt takibinde en çok kullanılan yöntemdir. Rezidüel hücrelerin takibi özellikle minimal rezidüel hastalığın (MRD – minimal residual disease) erken tanısında kritik önem taşımaktadır. Bu kapsamda rutinde uygulanabilir daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi, minimal rezidüel hastalık zemininde gelecek relapsın tespiti için gereklidir. Bu konuda RT-dijital PCR yöntemi kullanışlı bir alternatif olarak ön plana çıkmıştır. Son yıllarda gen ekspresyonu çalışmalarında, hot-spot mutasyonların ve kopya sayısı değişikliklerinin (CNV – copy number variation) tespitinde RT-dijital PCR yönteminin kullanımı gittikçe artmaktadır (12). Hassasiyet açısından yapılan yöntem karşılaştırma çalışmaları da RT-dijital PCR yönteminin başarısını desteklerken, bu farkın düzeyi hakkında yorum yapabilmek için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır (13-15).

YENİ NESİL DİZİLEME (YND)

Son on yılda YND teknolojilerinin yaygınlaşması ile hematolojik malignitelere hem germline hem de somatik genomik değişikliklerin anlamlandırılması için birçok çalışma yapılmıştır. KML başlığındaki çalışmalar ise özellikle tedavi direnci ve prognoz tayini üzerine yoğunlaşmaktadır. Ekzom düzeyinde başlayan bu çalışmalar sonrasında kopya sayısı değişikliklerini de değerlendirmeye katarak tüm genom analizine, son dönemde de tüm transkriptom sekanslama (RNA-seq) aşamasına ulaşmıştır (16). Özellikle Philadelphia kromozomu etrafındaki kromozomal yeniden düzenlenmeler RNA-seq verisi üzerinden tespit edilebilmektedir. Bu tür yeniden düzenlenmelerin tedaviye dirençli hastalardaki oranı %33 olarak bulunmuşken, TKI'lara optimal yanıt veren hastalarda da %11 düzeyinde tespit edilmiştir.

Kişiyöze tedaviler ve hassas tıp uygulamaları, fenotipik olarak benzer özelliklere sahip malignitelerin genomik profillerinin çıkarılması halinde her birinin kendine has bir karakter ortaya koyduğunu göstermiştir. Şimdiye kadar ASXL1, RUNX1, IKZF1, TP53 ve SETD1B genlerinin KML ile ilişkisi gösterilmiştir (17). Bu genlerin patojenik mutasyonlarının da TKI direncine katkı sağladığı düşünülmektedir.

BCR/ABL1 kinaz domain mutasyon testi TKI direnci şüphesinde ilk tercih genetik testtir. TKI direnci olan hastaların yaklaşık %50'sinde bu bölgede mutasyon tespit edilebilir. Bu bölge mutasyonlar arasında en sık saptanan ve en bilineni T315I mutasyonudur (18). İlk aşamada konvansiyonel dizileme yöntemiyle çalışılmaya başlanan BCR/ABL1 kinaz domain mutasyonları, hem teknolojik olanakların yaygınlaşması hem de teknik üstünlük sebebiyle günümüz rutininde YND teknolojileri ile analiz edilmektedir. Henüz üzerinde kesin bir görüş olmamakla birlikte KML olgularında izlenecek moleküler genetik tanı yaklaşımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. KML'de genetik tanı algoritması

SONUÇ

KML'de genetik tanı, genetik biliminin kendi alt disiplinleri arasındaki iş birliği ile yürütülmesi gereken ve hastanın klinik bilgilerinin de takip sırasında göz önünde bulundurulması elzem olan uzun bir süreci kapsamaktadır. Gelecekte yapılacak ekzom, genom ve transkriptom düzeyindeki çalışmalar ile mevcut genetik tanı algoritmalarının revize edilerek tedavilerin daha etkin hale gelmesinin sağlanacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

KAYNAKLAR

- 1.Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. New England Journal of Medicine 1999; 340: 1330-40.
- 2.Loizzo CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. 1975.
- 3.Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. Blood, The Journal of the American Society of Hematology 2009; 113: 1619-30.
- 4.Al-Achkar W, Moassass F, Youssef N, Wafa A. Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. J BUON 2016; 21: 444-9.
- 5.Vinhas R, Cordeiro M, Pedrosa P, Fernandes AR, Baptista PV. Current trends in molecular diagnostics of chronic myeloid leukemia. Leukemia & Lymphoma 2017; 58: 1791-804.
- 6.Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. New England Journal of Medicine 2002; 346: 645-52.
- 7.Bacher U, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S, Kern W, Schoch C. Additional clonal abnormalities in Philadelphia-positive ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. Cancer genetics and cytogenetics 2005; 157: 53-61.

- 8.Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase-and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. Leukemia 2002; 16: 53-9.
- 9.Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willer A, et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. Leukemia 1999; 13: 1825-32.
- 10.Müller M, Cross N, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. Leukemia 2009; 23: 1957-63.
- 11.Press RD. Major molecular response in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors: the paradigm for monitoring targeted cancer therapy. The oncologist 2010; 15: 744.
- 12.Mazaika E, Homsy J. Digital droplet PCR: CNV analysis and other applications. Current protocols in human genetics 2014; 82: 7.24.1-13.
- 13.Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, et al. RT-qPCR and RT-digital PCR: a comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia. Clinical chemistry 2017; 63: 525-31.
- 14.Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. The Journal of Molecular Diagnostics 2014; 16: 174-9.
- 15.Bahsi T, Erdem HB. Comparison of RT-qPCR and RT-Digital PCR for Detection and Quantification of BCR-ABL1 Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia. Gazi Medical Journal 2019; 30: 421-4.
- 16.Branford S, Wang P, Yeung DT, Thomson D, Purins A, Wadham C, et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. Blood, The Journal of the American Society of Hematology 2018; 132: 948-61.
- 17.Branford S, Shanmuganathan N. NGS in CML-New standard diagnostic procedure? HemaSphere 2019; 3: 48-50.
- 18.Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Breeden M, Garcia-Manero G, O'brien S, et al. Characteristics and outcomes of patients with chronic myeloid leukemia and T315I mutation following failure of imatinib mesylate therapy. Blood, The Journal of the American Society of Hematology 2008; 112: 53-5.