

Der(21)T(17;21) ve 13q Delesyonlu Bir KLL Olgusunun Sitogenetik, FISH ve Qrt-PCR ile İncelenmesi

Investigation of a CLL Case with Der(21)T(17;21) and 13q Deletion with FISH and Qrt-PCR

R. Dilhan Kuru¹, Onur Baykara¹, Melike Yılmaz¹, Işıl Erdoğan², Seniha Hacıhanefioğlu¹

¹ İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

² İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul

Öz

Amaç: Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), lenfoproliferatif bir hastalık olup, ortalama görülme yaşının 65 olduğu heterojen bir klinik gösterir. En yaygın kromozomal değişim 13q14 ve 17p13 delesyonlarıdır. Her iki bölgenin kaybı da kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. 17p13 bölgesi başka kromozomlarla yeniden düzenlenmelere katılmaktadır. Bu düzenlenmelerden biri de t(17;21) translokasyonudur. Son çalışmalar mikroRNA'ların çeşitli solid tümör ve hematolojik kanserlerde rol oynadığını göstermektedir. KLL olgularında delesyona uğrayan 13q14 bölgesi üzerinde yer alan DLEU2 geninin kodladığı miR-15 ve miR-16'nın ifadesinin bu bölgenin delesyonuna bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda evre 0 KLL tanılı kadın olgudan alınan perifer kan örneği konvensiyonel sitogenetik yöntemiyle sitogenetik olarak, kromozom 17 ve kromozom 21'e özgü farklı renkte tüm kromozomu boyayan DNA problemleri kullanılarak metafaz FISH (mFISH) tekniği, 17p delesyonu için P53 delesyon ve 13q delesyonu için D13S319 plus problemleri ile iFISH tekniği ve miR-15a/miR-16-1 ifade düzeylerinin belirlenmesi için qRT-PCR yöntemi uygulandı.

Bulgular: Yapılan çalışma sonucu olguda sitogenetik olarak del(6)(q?), del(13)(q22), der(21)t(17;21)(q11.2;q22) kromozom düzensizlikleri saptandı. FISH tekniği ile del17p13, del13q14, ve der(21)t(17;21) bulguları doğrulanırken, gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) yöntemiyle de miR-15a ve miR-16-1 ifadesinin azaldığı gözlemlendi. Elde edilen bulgulara göre azalan miRNA seviyeleri ile yüksek orandaki mono ve biallelik 13q14 delesyonları arasında korelasyon bulundu.

Sonuç: Konvensiyonel sitogenetik ve iFISH yöntemine ek olarak miR-15a ve miR-16-1 ifade seviyeleri de KLL olgularında belirleyici faktör olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. (**Sakarya Tıp Dergisi 2016, 6(3):141-145**)

Anahtar Kelimeler: KLL, Sitogenetik, FISH, miR-15a/miR-16-1, P53 geni, qRT-PCR

Abstract

Objective: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease with heterogeneous clinical properties mostly affecting older people around the age of 65. Most common chromosomal alterations are deletions of 13q14 and 17p13. Loss of both regions have been associated with bad prognosis. 17p13 region can make rearrangements with other chromosomes and one of them is t(17;21) translocation. Recent studies show that microRNAs play important roles in various solid tumors and hematological cancers. It was shown that expression of miR-15 and miR-16 encoded by DLEU2 gene which is located on 13q14, a frequently deleted region in CLL cases, are decreased due to the deletion of this region.

Materials and Methods: In this study, peripheral blood sample obtained from a female diagnosed with stage 0 CLL was analyzed with various methods including conventional cytogenetic methods, metaphase FISH (mFISH) technique using DNA probes staining the whole chromosome specific to chromosomes 17 and 21, iFISH technique using p53 deletion probes for 17p deletion and D13S319 plus probes for 13q deletion and qRT-PCR method for expression levels of miR15a/miR-16-1.

Results: Chromosomal instabilities of del(6)(q?), del(13)(q22), der(21)t(17;21)(q11.2;q22) were determined. While confirming del17p13, del13q14, and der(21)t(17;21) with FISH, levels of miR-15a and miR-16-1 expression were found to be decreased. We found significant correlation between the high levels of mono and biallelic 13q14 deletions and decreasing miRNA expression levels.

Conclusion: We suggest the use of miR-15a and miR-16-1 expression levels as determining factors in addition to the use of conventional cytogenetics and iFISH methods in CLL cases. (**Sakarya Med J 2016, 6(3):141-145**)

Keywords: ICLL, Cytogenetics, FISH, miR-15a/miR-16-1, P53 gene, qRT-PCR

GİRİŞ

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), lenfoproliferatif bir hastalık olup, erişkinlerde en sık görülen lösemi tipidir. Tanıdaki ortalama yaş 65 olup, hastalık erkeklerde iki kat daha fazla görülür. Kliniği değişkendir.¹ B hücreli ve T hücreli olarak ikiye ayrılır. KLL olgularının %5'i T hücre kökenli (T-KLL) olup ~%95'i ise B hücre kökenlidir (B-KLL). KLL batı ülkelerinde yetişkinlerde tüm lösemilerin %25'i gibi büyük bir oranda gözlenirken doğu ülkelerinde bu oran %5'den daha az olmaktadır. Ancak hastaların yarısından çoğunda uzun süre hiçbir semptom vermeden devam edebilen bir hastalık olduğu için gerçek insidans tam olarak bilinmemektedir.² CD5-pozitif B hücrelerinin klonal genişlemesi özelliğine sahiptir.³ KLL'nin klinik seyri değişkendir. Hastalık Rai ve Binnet olmak üzere iki sisteme göre klinik olarak evrelendirilir. Hastaların %57-80' inde kromozomal anomali gözlenir. Gözlenen en yaygın kromozom yapı anomalileri 13q14(%51) ve 17p13.1 (%2-26) bölgelerindeki delesyonlardır.^{2,4}

KLL hastalarında gözlenen 13q delesyonu değişik (heterojen) boyutlarda oluşmaktadır. 13q14 lokusunda tümör supresör etkisi olan 2 anatomik nokta önerilmiştir. Bunlar, minimal delesyon bölgesi (MDR) ve 13q14.1-q14.2 de lokalize RB1 gen bölgesidir. MDR DLEU1 ve DLEU2 olan 2 genin ekzonlarını içeren 10 kb'lık transkriptle zengin bir bölgedir. MikroRNalar (miRNA) dokuya özgü gen düzenlemesinde rolü olduğu düşünülen 19-25 nükleotidden oluşan kısa ve kodlama yapmayan tek iplikli RNA'lardır. Genellikle hedef mRNA'nın 3' ucuna doğru bağlanarak hedef genin okunmasını (translasyon) engeller. İnsan genomunda üretilen 2000'e yakın miRNA olduğu düşünülmektedir. Çok sayıda solid tümör ve hematolojik kanserlerde önemli rol oynadığı bildirilmektedir.^{1,5,6} 13q14.3 bölgesinde yer alan DLEU2 geni miR15a ve miR-16-1 olarak adlandırılan tümör baskılayıcı özellikte olan ve KLL gelişiminde etkili olduğu düşünülen iki adet miRNA kodlar.^{7,8} B hücreli KLL olgularının yarısından daha fazlasında 13q14 bölgesinin delesyona uğradığı bilinmektedir. Aynı bölge üzerinde yer alan miR15 ve miR-16'nın ifadesinin azaldığı gösterilmiştir.⁹ KLL olgularında en sık gözlenen anomalilerden olan 13q14.3 bölgesinin kaybı biallelik veya monoallelik olmak üzere iki formda meydana gelir. Delesyonlar monoallelik formda daha sık (%76) gözlenirken, biallelik formda nadiren (%24) saptanır. 13qdel taşıyan KLL hastalarında klinik tablonun kötü olduğu bildirilmiştir.¹⁰

P53 geninin bulunduğu 17p13.1 bölgesinde delesyon gözlenen hastaların %80'inde diğer p53 allelinde de mutasyon oluşur. KLL hastalarında kötü prognoz bulgusu olan 17p13 bölgesinin kaybı önemli bir prognostik belirteçtir.¹¹ Yapılan çalışmalarda KLL hastalarının %34-45'inde translokasyonlar olduğu rapor edilmiştir. Dengeli translokasyonlar nadir görülürken, dengesiz yeniden düzenlenmeler sıklıkla görülür ve hastalarda kompleks karyotipler gözlenir.¹² TP53 genini içeren bu bölgenin başka kromozomlarla yaptığı yeni düzenlenmeler de bildirilmektedir. t(17;21)(p11;q11) tarif edilen yeniden düzenlenmelerden birisidir.⁴ P53 geni bir transkripsiyon faktörü olup, bu genin ürünü olan p53 proteininin düzeyi DNA hasarı oluşan hücresel stres alanında post transkripsiyonel ve nontranskripsiyonel (mitokondri dış membranında apoptotik bölge) mekanizmalar tarafından düzenlenir. P53 fonksiyon kaybı hücrelerin apoptozdan kaçmasına ve diğer DNA düzensizliklerinin birikmesine, böylece hastalığın ilerlemesine ve uygulanan tedaviye dirençli olmasına yol açar.¹

KLL hastalarında tedavi protokolü belirlenmeden önce Floresan İn situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile 13q14 ve p53 delesyonuna bakılması, daha sonra uygun tedavi protokolünün belirlenmesi önerilmektedir.¹²

Bu olgu sunumunda KLL tanılı olgudan alınan perifer kanı örneğinden konvansiyonel sitogenetik yöntemiyle kromozomal anomalilerin saptanması, FISH tekniği uygulanarak 13q ve 17p delesyonlarının tespit edilmesi ve qRT-PCR yöntemi ile de miR-15a/miR-16-1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, saptanan sonuçların sunulması ve birbirleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Olgu, KLL (Rai Evre 0) tanılı 85 yaşında kadın hasta, hematoloji servisi tarafından klorambusil tedavisiyle izlenmektedir. Çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Konvansiyonel Sitogenetik: KLL olgusundan alınan heparinli perifer kan materyali, DSP30 ve IL-2 indükleyicilerinin mitotik ajan olarak kullanıldığı 37 °C 'lik etüvde 72 saat kültüre edilmiştir.¹² Kültür çıkışı sonrası hazırlanan preparatlara GTL bant yöntemi uygulanarak ve ISCN (2013)13 kurallarına göre

sitogenetik açıdan incelenmiştir.

FISH: Kromozom 17 ve kromozom 21'e özgü farklı renkte (WCP 17, kırmızı; WCP21, yeşil) tüm kromozomu boyayan DNA probları (Aquarius Cytocell, NY, ABD) kullanılarak metafaz FISH (mFISH) tekniği uygulandı. 17p delesyonu için P53 delesyon ve 13q14'te yer alan DLEU2 gen bölgesinin delesyonu için D13S319 plus iki renkli DNA probları (Aquarius Cytocell, NY, ABD) kullanılarak interfaz FISH (iFISH) yöntemi uygulanan preparatlar floresan mikroskopunda üçlü filtrede (DAPI-FITC-TxRed) incelenmiştir.

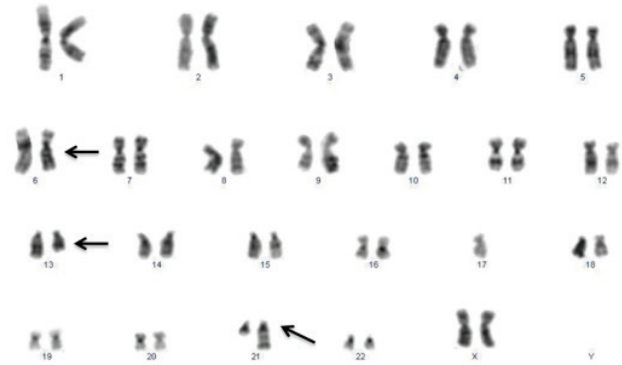
Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR): Çalışmaya dahil olan KLL olgusundan elde edilen perifer kanından üreticinin talimatlarına uygun şekilde miRNA elde edilmiştir (Exiqon miRCURY RNA isolation kit (Exiqon A/S, Danimarka). 10 ng miRNA kullanılarak cDNA sentezlenmiştir miRCURY LNA™ microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (Exiqon A/S, Danimarka). Gerçek Zamanlı PZR- (Real-Time PCR) analizi için SYBR Green yöntemi kullanılmıştır (miRCURY LNA™ microRNA PCR, ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon S/A, Danimarka). hsa-miR-15a-5p ve has-miR-16-1-3p genlerinin ifade analizi Light Cyler 1.5 cihazında yapılmıştır (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Tablo 1). PCR koşulları toplam hacim 10 µl olacak şekilde; 1xPCR Master Mix, 1 µl PCR primer karışımı ve 1:10 sulandırılmış cDNA'dan oluşmuştur. Gene özgü primerler üretici firmadan elde edilerek kullanılmıştır (miRCURY LNA PCR Primer mix for hsa-miR-15a-5p and has-miR-16-1-3p; Exiqon S/A, Danimarka). Normalizasyon için U6 referans gen kullanılmıştır. Rölatif miRNA seviyelerinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılmıştır. Uygulanan gerçek zamanlı PZR koşulları Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1: Gerçek Zamanlı PZR Koşulları

	Hedef ısı	Süre	
Bozunum	95oC	20 sn	
Çoğalma	95oC	10 sn	45 döngü
	60oC	60 sn	
Erime	95oC	60 sn	
	40oC	120 sn	
	95oC	0 sn	
Soğuma	40oC	30 sn	

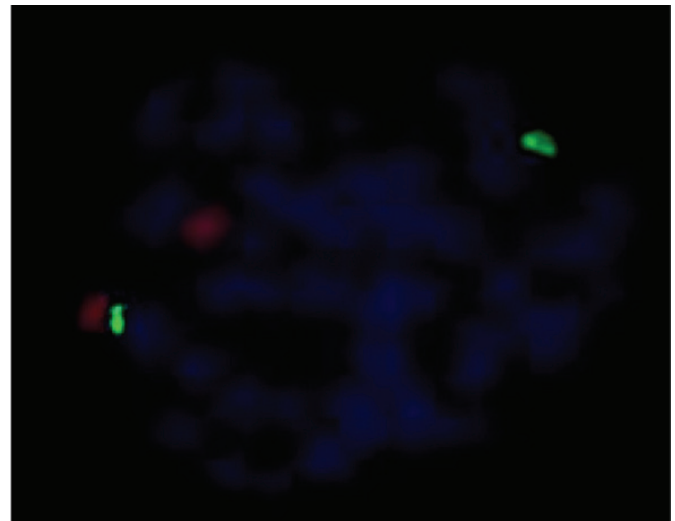
BULGULAR

DSP30 ve IL-2 mitotik indükleyicilerin ilave edildiği kültür ortamında B-KLL hücrelerinin çoğaltılması sağlanarak, bu hücrelere konvansiyonel sitogenetik ve iFISH uygulanmıştır. Sitogenetik inceleme sonucu olgunun karyotip formülü; 38~46, XX, del(6)(q?)[12], del(13)(q22)[24], der(21)t(17;21)(q11.2;q22)[5], -17[5][cp26]/46,XX[2] şeklinde hazırlanmıştır (Resim 1).



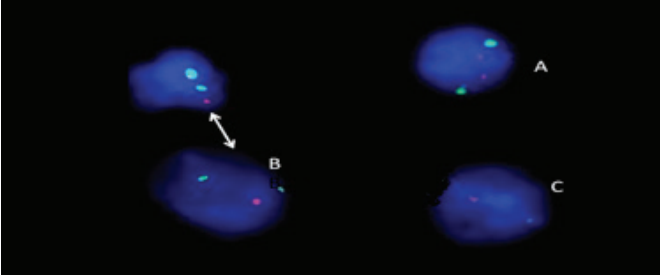
Resim 1: 45, XX, del(6)(q?), del(13)(q22), der(21)t(17;21)(p11.2;q22), -17 karyotipli karyogram örneği.

Konvansiyonel sitogenetik inceleme ile tespit edilen der(21)t(17;21) bulgusu 17. ve 21. kromozoma ait tüm kromozomu boyayan (WCP17 ve WCP21) proplarının kullanıldığı mFISH yöntemiyle de doğrulanmıştır (Resim 2).



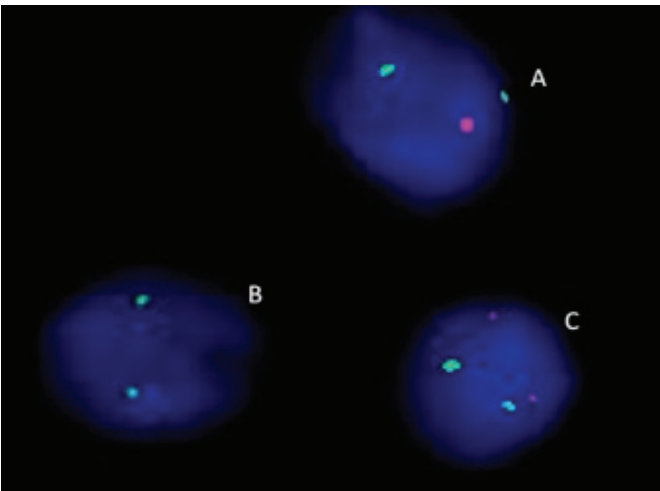
Resim-2 : der(21)t(17;21) yeniden düzenlenmesinin WCP 17 ve WCP 21 proplarının kullanıldığı metafaz FISH ile gösterilmesi (WCP17, kırmızı; WCP21, yeşil).

Yapılan çalışmalarda da 17 ve 21 numaralı kromozomlar arasındaki yeniden düzenlenmeler bildirilmektedir.⁴ p53 delesyon probunun kullanıldığı iFISH yöntemi ile %15 oranında p53 gen bölgesinde delesyon ve %20 oranında da tek bir 17. kromozoma ait sinyal tespit edilmiştir (Resim 3).



Resim-3: p53 geni delesyonu ve 17 monozomisinin p53 delesyon probunun kullanıldığı interfaz FISH ile gösterilmesi. A; Normal, B;p53 delesyon, C; 17 monozomisi (p53 geni;kırmızı, 17 sentromer yeşil).

Böylece, olgumuza ait toplam p53 gen bölgesi kaybı oranı %35 olarak hesaplanmıştır. Oluşan der(21)t(17;21) yeniden düzenlenmesi sonucu 17. kromozomun kısa kolunda yer alan p53 gen bölgesi ve sentromer bölgesi kaybedilmiştir. Bu nedenle de iFISH ile p53 gen kaybı ve 17 monozomisi tespit edilmiştir. Ayrıca kötü prognoza sebep olan ve KLL olgularında az rastlanan del(6q) bulgusuna olgumuzda da saptadık. Sitogenetik olarak saptanan del(13)(q22) bulgusu dışında, olgunun iFISH yöntemi ile %50 oranında monoallel ve %18 oranında da biallelik formda 13q14.3 delesyonu taşıdığı belirlendi (Resim 4).



Resim-4: DLEU2 gen bölgesi delesyonunun D13S319 plus delesyon probunun kullanıldığı interfaz FISH ile gösterilmesi. A; Monoallel delesyon, B; Biallelik delesyon, C; Normal (D13S319; kırmızı, 13qter; yeşil).

TARTIŞMA

Olguya ait gen ifadesi çalışmaları sonucu miR-15a ve miR-16-1 ifadelerinin azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre azalan miRNA seviyeleri yüksek oranda saptanan 13q14 delesyonu ile korelasyon göstermektedir. Bu sonuçlar daha önce bildirilen çalışmalarla uyumlu çıkmıştır.^{10,14} Sonuç olarak, iFISH yöntemiyle araştırılan belli gen bölgesi kayıplarının yada yeniden düzenlenmelerin yanı sıra, bu olgularda gözlenen ilave kromozom anomalileri de sitogenetik incelemelerle tespit edilebilmektedir. Bu nedenle de konvansiyonel sitogenetik yöntemi KLL olgularında kullanılan tanı yöntemlerinden biri olarak önemini korumaktadır. miR-15a ve miR-16-1 ifade seviyelerinin iFISH yöntemiyle gözlenen 13q delesyonlarıyla uyumlu olması, miR-15a ve miR-16-1 ifadelerinin KLL olgularındaki belirleyici rolünü göstermiştir. Bu olgularda miR-15a ve miR-16-1 ifadelerinin prognostik belirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

Çıkar çatışması:

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

1. Codony C, Crespo M, Abrisqueta P, Montserrat E, Bosch F. Gene expression profiling in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:211-222.
2. Kalil N ,Cheson B. Chronic lymphocytic leukemia. *The Oncologist* 1999;4:352-369.
3. Bullrich F, Croce C. Molecular Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Chronic Lymphocytic Leukemias, Revised and Expanded, 2nd edn*: Cheson B (ed). Marcel Dekker, Inc: New York, NY, USA, 2001; p. 9–32.
4. Lopez C, Baumann T, Costa D, Lopez-Guerra M, Navarro A, Gomez C, et al. A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;156:612–618.
5. Undi RB, Kandi R, Gutti RK. MicroRNAs as haematopoiesis regulators. *Adv Hematol* 2013;2013:1-20.
6. Zhong X, Coukos G, Zhang L. miRNAs in human cancer. *Methods Mol Biol.* 2012;822:295-306.
7. Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNAs in the pathogenesis of chronic lymphocytic Leukemia, *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(3):425-437.
8. Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, Chaplin T, Wade R, Gardiner A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011;25:489-497.
9. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Sanatanam U, Alder H, Rassenti L, et al. 13q14 deletion in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood* 2010;19:3916-3922.
10. Humplikova L, Kollinerova S, Papajik T, Pikalova Z, Holzerova M, Prochazka V, et al. Expression of miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013;157(4):284-293.
11. Ward BP, Tsongalis GJ, Kaur P. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Exp Mol Pathol* 2011;90:173-178.
12. Put N, Wlodarskal I, Vandenberghe P, Michaux L. Chronic Lymphocytic Leukemia. In *Genetics of Chronic Lymphocytic Leukemia: Practical Aspects and Prognostic Significance*, Dr. Pablo Oppezso (Ed.), Rijeka, Croatia, 2012, p.269-296.
13. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, L.G.Shaffer, J. McGovan-Jordan, M. Schmid (eds); S. Karger, Basel 2013.
14. Bo MD, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Giudice ID, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes Cancer* 2011;50:633-643.

Kaynaklar

