

Akut Miyeloid Lösemide Akirin2 Geninin İfadesi

Tülin Özkan¹, Buket Altınok², Aynur Karadağ¹, Arzu Zeynep Karabay³, Yalda Hekmatshoar¹,
Nilgün Sayinalp⁴, Asuman Sunguroğlu¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara, Türkiye

³Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

E-mail: tnozkan@yahoo.com

Özet

Akut miyeloid lösemi (AML), farklı genetik anomaliler gösteren bir grup klonal hematopoetik kök hücre bozukluğudur. Lösemik kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmaları arasındaki hassas dengeyi, çeşitli genler ve bu genlerin düzenlediği sinyal yolları kontrol etmektedir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, β -kateninin regülasyonu aracılığıyla hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini kontrol etmektedir. Akirin2 proteini ise, immünite, NF κ B ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarında çok önemli rolleri olduğu düşünülen yüksek derecede korunmuşluk gösteren bir proteindir. Bu çalışmada β -katenin gen ekspresyonu yüksek olan AML hastalarının CD34+ hematopoetik kök hücrelerinde Akirin2 geninin ifadesi araştırılmıştır. Sonuç olarak Akirin2 gen ifadesinin AML hastalarının CD34+ hematopoetik kök hücrelerinde sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiş ve Akirin2 geninin AML patogenezinde önemli rollerinin olabileceğine dair ilk veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: AML, Akirin2, β -katenin

Abstract

Acute myeloid leukemia is a type of clonal hematopoietic stem cell disorder displaying different genetic abnormalities. The critical balance between the self-renewal and differentiation of leukemia stem cells are regulated by various genes and signaling pathways that are regulated by these genes. Wnt/ β -catenin signaling pathway controls the self-renewal of hematopoietic stem cells by the regulation of β -catenin. Akirin-2 is an evolutionarily conserved nuclear protein which is thought to play important roles in immunity, NF κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways. In this study, expression of Akirin-2 gene was investigated in the CD34+ hematopoietic stem cells of patients with high β -catenin gene expression. Our results showed that the expression level of Akirin-2 gene was significantly higher in CD34+ hematopoietic stem cells of patients compared to healthy subjects and Akirin-2 gene could have an important role in AML pathogenesis.

Key Words: AML, Akirin2, β -catenin

Giriş

Karsinogenez, çok faktörlü ve çok basamaklı bir olgudur. Karsinogeneze yol açtıkları belirlenen protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve delesyonları ve füzyon proteinleri ile sonuçlanan translokasyonlar, kanser genomu üzerine yapılan çalışmalar sayesinde tanımlanmaya devam etmektedir (Holliday vd 2006). Birden fazla gendeki mutasyonlar nedeniyle oluştuğu bilinen bu nedenle genetik bir hastalık olan kanserin yaklaşık %85-90'ı sporadik olarak ortaya çıkarken, %10-15'lik bir kısmı kalıtsal karakterdedir.

Her yıl teşhis edilen kanser vakalarının yaklaşık %7'sini hematolojik malignansiler oluşturmaktadır. Bu malignansiler arasında yer alan akut miyeloid lösemi (AML), erişkinlerde görülen en yaygın lösemidir. AML, erken hematopoetik kök hücrelerde bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulması sonucunda, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücrenin (miyeloblast) birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır (Stone vd 2004). 2010 yılında AML teşhisi koyulan 12330 yeni vaka olduğu ve AML' ye bağlı 8950 ölüm gerçekleştiği belirlenmiştir (Jemal vd 2010). Lösemnin, normal hematopoetik kök hücrelerden farklı olarak, anormal ve zayıf olarak düzenleme gösteren bir organogenez sürecine uğrayan birkaç lösemik kök hücre tarafından başlatıldığı ortaya konulmaktadır (Passegue vd 2003). Bu bağlamda, lösemnin tedavisine yönelik yaklaşımların geliştirilebilmesi için öncelikle, olgunlaşmamış kan hücre tiplerinden olgunlaşmış ve özelleşmiş kan hücrelerinin oluşumu olarak tanımlanan hematopoezis sürecinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu süreçte özellikle lösemik kök hücre oluşumuna yol açan sinyal yollarının aydınlatılarak, bu hücre popülasyonunun kaderinin yönlendirilmesi önem kazanmaktadır.

Lösemik kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmaları arasındaki hassas dengeyi, çeşitli genler ve bu genlerin düzenlediği sinyal yolları kontrol etmektedir. Wnt/ β -katenin, NF κ B, Notch, Hh (Hedgehog), TGF- β (transforming growth factor- β), PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) ve Bmi bu dengeden sorumlu başlıca sinyal yollarıdır ve anormal aktivasyonları lösemi gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (Woodward vd 2005).

Bu sinyal yolları arasında yer alan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, embriyonik gelişimde ve erişkinlerde organ ve dokuların devamlılığın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Wodarz vd 1998). Geçtiğimiz 20 yıl boyunca yapılan pek çok çalışma, Wnt kanonikal sinyal yolağının, çeşitli kanserlerin de aralarında bulunduğu geniş bir hastalık grubunun patogenezinde görev yaptığını ortaya koymuştur. Son zamanlardaki çalışmalar Wnt yolağının aynı zamanda, β -kateninin regülasyonu aracılığıyla hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini de kontrol ettiğini göstermektedir (Reya vd 2003, Murdoch vd 2003). AML, normal erken hematopoetik hücrelere benzeyen farklılaşmamış öncü hücre kümelerinin varlığı ile karakterize olmasından dolayı bu hastalığın lösemiyojenezinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı kritik bir rol oynamaktadır.

Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması incelendiğinde, istirahat halindeki normal hücrede, Wnt aktivasyonu yokluğunda, β -kateninin hücre membranında yerleşik olduğu ve hücre yüzeyinde E-kaderin ve α -katenin ile kompleks oluşturarak hücre iskeleti ile bağlantı yaptığı, (Perez-Moreno vd 2003) Wnt sinyal aktivasyonunun ardından β -kateninin çekirdeğe taşındığı ve bir transkripsiyon faktörü gibi çekirdekte TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor)'e bağlanarak çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive ettiği belirlenmiştir (İlyas vd 2005).

Bu çalışmada Wnt/ β -katenin sinyal yolağında önemli rol aldığı bilinen Akirin2 geninin, AML patogenezindeki ifade düzeyi araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda AML hastalarının ve sağlıklı bireylerin CD34+ hematopoetik kök hücreleri izole edilmiş ve bu hücrelerde Akirin2 geninin ifade düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalından AML tanısı almış, 4 hasta ve

daha önceden her hangi bir malign hastalık tanısı almamış 2 sağlıklı bireyin kemik iliği (K.İ)/kan örnekleri dahil edilmiştir.

RNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair izin kağıtları kendilerinden ve/veya yakınlarından alınmıştır. (Hacettepe Ü. Tıp Fak. Etik kurul tarafından 26.02.2009 tarih ve TBK 09/9-47 karar nolu etik kurul ile onaylanmıştır.)

CD34⁺Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu

İlk olarak hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerden (kemik iliği/kan) CD34⁺ hematopoetik kök hücre izolasyonu yapılmıştır. CD34⁺ hücrelerin eldesi için EasySep CD34⁺ izolasyon kitinin (Stem cell, Kanada) protokolü izlenmiştir.

RNA Ekstraksiyonu

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerden CD34⁺ hücre izolasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerden Trizol (Invitrogen, ABD) ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiş ve daha sonra %1'lik Agaroz Jel'de yürütülerek RNA bütünlüğü görüntülenmiştir.

Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak Akirin2 geni ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk olarak CD34⁺ hematopoetik kök hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden 500 ng kullanılarak "Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit" (Roche, Almanya) ile c-DNA sentezlenmiştir.

qRT-PCR uygulamalarında kullanılacak olan Akirin2 ve Hprt (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) genlerine özgü primerler (Alpha DNA,USA). "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlanmıştır.

Akirin 5'F: ACGAGTTTCCAACAGACAG

Akirin 5'R: TTCACAGATCATCCCAACC

Hprt: 5'F: TGACACTGGCAAAACAATGCA

Hprt: 5'R: GGCCTTTTCACCAGCAAGCT

"SYBR Green" (Roche, Almanya) floresans boyası kullanılarak 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye olacak şekilde kantitasyon (qRT-PCR) yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

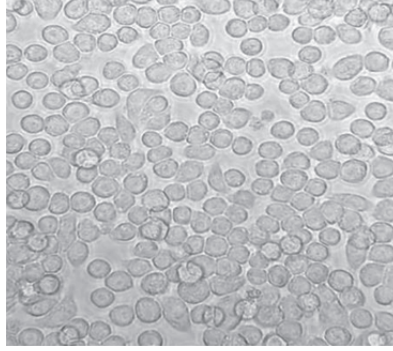
Eş zamanlı PCR sonuçları one sample t test'e göre analizlenmiştir. p≤0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar

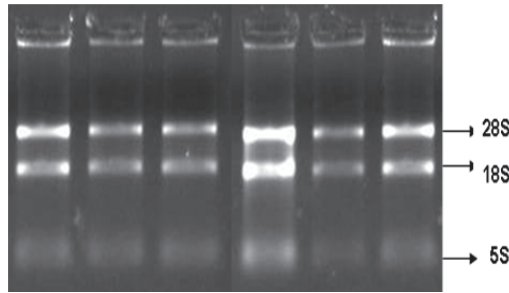
Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerden CD34⁺ hematopoetik kök hücre izolasyonu EasySep CD34⁺ izolasyon kitinin (Stem cell, Kanada) protokolüne göre yapılmıştır (Şekil 1).

İzole edilen hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş (Şekil 2) ve 500ng'dan cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra qRT-PCR yapılarak hastaların CD34⁺ hücrelerindeki Akirin2 geni ifadesi sağlıklı bireylerin CD34⁺ hücrelerindeki Akirin2 geni ifadesine göre kıyaslanmıştır.

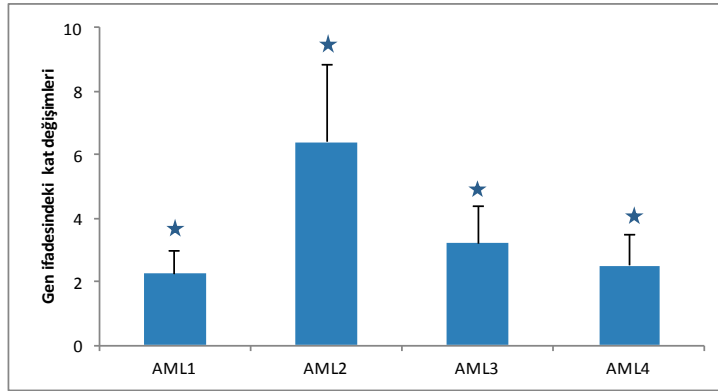
Yapılan analizler sonucunda çalışılan tüm örneklerde Akirin2 geni ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hastalardaki akirin2 geni ifadesindeki kat artışı sırasıyla 2.2, 6.3, 3.2 ve 2.4 kat olarak tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 1. İzole edilen CD34+ hücrelerin mikroskopik görüntüleri (10X 40 büyütme)



Şekil 2. CD34+ Hücrelerden izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü



Şekil 3. Akirin2 geni ifadesi sonuçları. AML hastalarının CD34+ hücrelerindeki Akirin2 geni ifadesinin sağlıklı bireylerdeki CD34+ hücrelerindeki Akirin2 geni ifadesine oranı. ★ $p \leq 0.05$

Tartışma

NFκB ve Wnt/β-katenin sinyal yollarının bir çok kanserde çok önemli rollerinin olduğu bilinmektedir ve bu yüzden bu yollar kanserin tedavisinde sıklıkla hedeflenmektedirler. Akirin2, immünite, NFκB ve Wnt/β-katenin sinyal yollarında çok önemli rolleri olduğu düşünülen yüksek derecede korunmuşluk gösteren bir proteindir (Beutler vd 2008, Goto vd 2008). Ancak bu zamana kadar Akirin2'nin kanserdeki rolü tam olarak açıklanamamıştır. İmmün yanıt yollarında görev aldığı bilinen Akirin2'nin NFκB bağımlı genlerin regülasyonunda görev aldığı ve bu regülasyonu NFκB'ye tanımlanmayan bir protein aracılığıyla bağlanarak yaptığı düşünülmektedir. Akirin2 genetik olarak Wnt sinyal yolağıyla etkileşmektedir ve bu interaksiyonun β-katenin ile doğrudan bir etkileşimle ya da adaptör proteinler aracılığıyla gerçekleştiği önerilmektedir (Beutler vd 2008). Bunun yanı sıra Wnt/β-

katenin yolağının löseminin ilerlemesi ve ilaç direnciyle de yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Scheller vd 2013). Bu çalışmada daha önceden β -katenin geni ifadesi yüksek bulunan hastalarda Akirin2 geninin de ifadesi araştırılmış ve AML hastalığının patogenezindeki rolüne dair ön bulgular elde edilmiştir. Akirin2 gen ekspresyonunun AML hastalarının CD34+ hematopoetik kök hücrelerinde sağlıklı CD34+ hematopoetik kök hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Bu bulgular Akirin2'nin AML patogenezinde önemli rolü olabileceğine dair ilk bulgulardır. Akirin2 geninin AML'deki rolünün daha iyi anlaşılması için daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Kaynaklar

- Beutler B, Moresco EM. 2008. Akirins versus infection. *Nat Immunol*, 9:7-9.
- Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutenkeuler D, Takeuchi O, Hoffman JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM. 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat Immunol*, 9: 97-104.
- Holliday, R. 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1: 76–80.
- Ilyas, M. 2005. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*, 205: (2):130–144.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. 2010. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2010;60:277–300.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M, et al. 2003. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:3422–3427.
- Passegué, E., Jamieson, CH., Ailles, LE., Weissman, IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;100 Suppl, 1:11842-9.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112, 535-548.
- Reya, T., Duncan, AW., Ailles, L., Domen, J., Scherer, DC., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., Weissman, IL. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423:409-414.
- Scheller M, Schonheit J, Zimmermann K, Leser U, Rosenbauer F, Leutz A. 2013. Cross talk between Wnt/ β -catenin and Irf8 in leukemia progression and drug resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, 210: 2239-2256.
- Stone, R.M., O'donnell, M.R., Sekeres, M.A. Acute Myeloid Leukemia. 2004. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 98-117.
- Tan, X. 2008. Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology*, 47:1667–1679.
- Wodarz, A., Nusse, R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:59–88.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Rosen, J.M. On mammary stem cells. 2005. *J Cell Sci*, 118 (Pt 16):3585-94.