

Akut Lösemilerde MIF Genindeki Polimorfizmlerin Önemi ve Febril Nötropenik Ataklara Etkisi

Importance Of Polymorphisms Of The MIF Gene At Acute Leukemia And Its Effect On Febrile Neutropenic Attacks

¹Uzm. Biyolog Sebahat GÜVEN

²Doç.Dr. Mustafa PEHLİVAN

²Doç.Dr. Mehmet YILMAZ

²Doç.Dr. Vahap OKAN

³Doç.Dr. Sacide PEHLİVAN

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD

³Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

Gaziantep Tıp Dergisi 2009;15(2):05-09.

Özet

Bu çalışmanın amacı; Akut Lösemiler (AL)'de Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktörü (MIF) geninin -173 bölgesine ait polimorfizmleri araştırmak ve kemoterapi sonrası gelişen febril nötropenik (FN) ataklara etkisini değerlendirmektir. Akut Myeloblastik Lösemi (AML) ve Akut Lenfoid Lösemi (ALL) tanısıyla tedavi gören 48 hasta ile 53 sağlıklı kontrolden izole edilen DNA örneklerinde MIF geni -173 bölgesine ait tek nükleotid polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi ile araştırılarak, G ve C allel ve genotip dağılımları hasta ile kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda GG genotipini taşıyan hastaların oranı %70.9, GC'yi taşıyanların oranı %29.1 ve CC'yi taşıyanların oranı %0 olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık ile Hardy-Weinberg dengesinden bir sapma gözlenmemiştir. AL'lerde elde edilen MIF pozitifliği ile infeksiyonların dağılımı, etkenleri, ateşli gün süresi ve nötropeni süresi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; GC allel grubunda, infeksiyonların etkenleri, nötropeni (<500/L) süresi, ateşli gün süresi, fungal pnömoni, kandida enfeksiyonları ve FN mortalitesinde GG allel grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05). Sonuç olarak; Fungal pnömoni, GC alleli taşıyan grupta, GG alleli taşıyan gruba göre (%22/11,5) daha sık izlenmiş olup çalışma grubunun genişletilerek tekrarlanması durumunda anlamlı bir ilişki saptanabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör Geni, -173 G/C polimorfizmi, PCR, Akut Lösemi, DNA.

Abstract

The objective of this study is to research polymorphisms in MIF gene -173 site in variable haematological malignancies and evaluate its effects on febrile neutropenic attacks after chemotherapy in acute leukemia. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -173 site of the MIF gene was analysed with the PCR-RFLP method (restriction endonuclease Alu I) with isolated DNA samples from 48 patients who were treated for ALL and AML and 53 healthy controls, and G and C allel frequencies were compared statistically between patients and healthy controls groups. As a result of the analysis, it was observed that the rate of patients with GG genotypes was 70.9%, with GC genotypes 29.1%, and with CC genotypes 0%. Association is evaluated between MIF positivities in acute leukemias and distribution of infections, its factors, duration of febrile days and neutropenia. Within the GC allel group; no significant differences were observed (p>0.05) in infection factors, duration of neutropenia (<500/L), duration of febrile days, fungal pneumonia, blood infections and FN mortality compared to the GG allel group. In conclusion, fungal pneumonia was observed at a higher rate in the CG allel group (22%) compared to the GG allel group (11.5%); a repeat of the study with an expanded group can yield more information about this relationship.

Key words: Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene, MIF-173 G/C polymorphism, PCR, Acute Leukemia, DNA.

Giriş

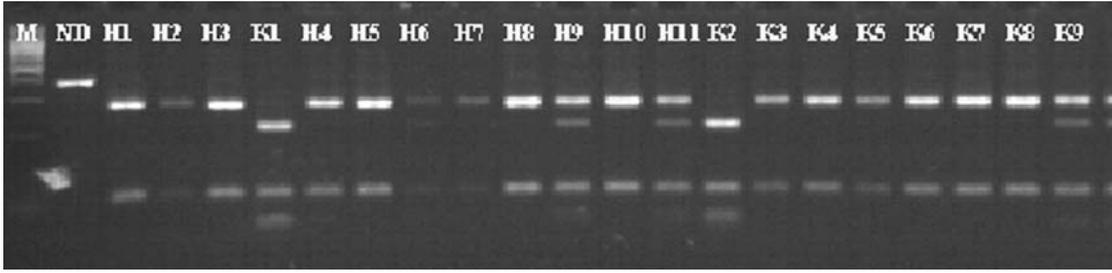
Makrofaj migrasyon inhibitör faktörü (MIF); proinflamatuvar, hormonal ve enzimatik aktivitelere sahip bir protein olup, inflamasyon öncesi süreçlerde ve inflamasyon sahasında makrofajların aktivitesi ile immunitenin düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Son zamanlarda, glukokortikoidler tarafından baskılanmak yerine arttırıldığı bilinen tek sitokindir. Ayrıca glukokortikoidlerin immunosüpresif etkilerini düzenlemede ve immün yanıtın derecesinin kontrolünde de görev yapar. MIF'in diğer sitokinlerden farkı, yapısal olarak devamlı ekspresyonunun olması ve ön hipofiz ile mononükleer hücrelerde depolanmasıdır (1). MIF, kobaylarda makrofajların göçünü engelleyen faktör olarak, ilk keşfedilen lenfokindir (2).

MIF'in ifadesi, insanlarda gecikmiş aşırı duyarlılık ve hücresele bağışıklık ile ilişkilidir. MIF'in inflamasyon sahasında ekspresyonu, makrofajların konak savunmasını düzenleyici olarak aracı rol oynadığını destekler (3). MIF oldukça küçük bir genidir ve 22.kromozomun q11.23 bölgesine lokalize olmuştur. 189 baz çifti (bp) ve 95 bp uzunluğunda 2 intronla ayrılmış 3 adet exondan oluşur (Exonlar; 173, 205 ve 203 bp), uzunluğu 1 kilobazdan (kb) azdır. Northern Blot analiziyle, tüm insan dokularında MIF mRNA'sının tek bir boyutta (yaklaşık 800 nükleotid) olduğu gösterilmiştir (4).

İnsan MIF geninin promotör bölgesinde iki önemli polimorfizm keşfedilmiştir. Bunlardan birisi -173G/C tek nükleotid polimorfizmi, diğeri de -794 bölgesinde bulunan CATT₅₋₈ tekrarlarıdır (5,6). MIF promotöründeki -173G/C tek bazlık polimorfizm son yıllarda tanımlanmış ve MIF -173C allelinin, hem in vivo hem de in vitro koşullarda artmış MIF ekspresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Sepsiste; Lipopolisakkaritler (LPS), sitokinler ve glukokortikoidler MIF'i sentezlemek için makrofajları, T hücreleri ve hipofizi uyararak sepsisin erken döneminde MIF serum konsantrasyonunu arttırmasına neden olmaktadır.

Doç.Dr. Sacide PEHLİVAN Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Adres: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi 27310 Şehitkamil / GAZİANTEP
Tel: 0342 360 60 60 / 77772 Fax: 0342 360 16 17 E-mail: psacide@hotmail.com





Şekil 1. MIF genine ait PCR ürünü ve AluI restriksiyon enzimi yapılan örnekler için görüntü. M:Markör (Fermantas #SM0388); ND:Kesilmemiş PCR ürünü; GG genotipi:H1-3,H4,H5,H7,H8,H10 K3-8, GC genotipi: H6,H9,H11,K9; CC genotipi:K1,K2.

Tablo 1. MIF -173 polimorfizminin, çalışılan gruplardaki dağılımı.

	Genotip	Akut Lösemi		Sağlıklı Kontrol		p
		n ^a	(%)	n ^b	(%)	
MIF^e	GG	34	(70.9)	31	(58.5)	0.129
	GC	14	(29.1)	20	(37.7)	0.438
	CC	-	(0)	2	(3.8)	0.182
Allel	G	82	(85.4)	82	(77.4)	0.143
	C	14	(14.6)	24	(22.6)	

^an=48, ^bn=53

MIF, kültürde ve in vivo koşullarda bakteriyel LPS uyarımına yanıt olarak ön salgı hücrelerinden en fazla salgılanan protein olarak tanımlanmıştır. Bu sebeple, endotoksemi ve olası septik şoka yanıtta önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (8).

MIF, glukokortikoidlerin fizyolojik konsantrasyonlarına yanıtta T hücreleri ile makrofajlardan salınır ve bu özellik MIF'e özgüdür. MIF'in salgılanması sıkı bir şekilde düzenlenir ve yüksek anti-inflamatuar steroid konsantrasyonlarında azalır. Salındığında, steroidlerin immün hücre aktivasyonu ve sitokin üretimi üzerindeki immüno-supresif etkilerini baskılar ya da düzenler.

Glukokortikoidler konağın enfeksiyona veya dokuda invazyona karşı savunmasının önemli bir parçası olduğu için, MIF inflamasyon alanında veya lenf düşümünde, steroidlerin immün yanıtta baskılayıcı etkilerini de düzenlemektedir (9). Bu çalışmanın amacı, akut lösemilerde MIF genindeki -173 G/C polimorfizmini araştırmak ve kemoterapi sonrası gelişen febril nötropeni ataklarına etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Akut Miyelositer Lösemi (AML) ve Akut Lenfositler Lösemi (ALL) tanısıyla tedavi gören 48 hasta ile 53 sağlıklı kontrolün kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı ve ad-soyad, cinsiyet, yaş, infeksiyonların dağılımı, etkenleri, ateşli gün ve nötropeni süresi gibi bilgiler kayıt edildi. Tüm bireyler bilgilendirip onayları alındı.

DNA izolasyonu için Invitex DNA izolasyon kiti kullanıldı (Katalog No: CA050036). İzole edilen bu DNA'lar, MIF -173 bölgesindeki polimorfizmi saptayabilmek için, polimeraz zincir reaksiyonu ile oligonükleotid primerler (forward: 5'- ACTAAGAAAGACCCGAGGC -3' ve reverse: 5'- GGGGCACGTTGGTGTTCAC -3') kullanılarak PCR ürünleri yatay elektroforezde %2'lik agaroz jel kullanılarak, 366 baz çifti aralığında görüntülendikten sonra AluI restriksiyon enzimi ile kesildi (11) (Şekil 1). Elde edilen genotip dağılımı ve allel sıklıkları X² testi ile analiz edildi. "Hardy-Weinberg" dengesi (HWE) De-Finetti programı kullanılarak hesaplandı (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>). Diğer istatistik analizlerde SPSS 13.0 programı kullanıldı.

Tablo 2. MIF -173 G/C polimorfizmi ile klinik parametrelerin karşılaştırılması.

	MIF GG alleli	MIF GC alleli	p
Hasta sayısı	33	15	
Yaş (Medyan)	42 (16-69)	35 (17-67)	
Cins (E/K)	15/18	7/8	
Tanı AML M0,M1,M2,M3,M4,M5	2/7/10/1/4/4/-	-/-/3/1/2/3//1	
ALL L2,L3	1/4	-/5	
Febril nötropenik atak sayısı	52	27	
Kemoterapi Ara-c/İda (7+3 / 6+3)	26/9	11/4	
FLAG-İda	10	6	
Hoelzer I-II	7	6	
Nötropeni süresi (<500/ μ L)(medyan gün)	17 (6-56)	14 (7-42)	0.405
Febril nötropeni süresi (medyan gün)	5.5 (1-21)	5 (1-30)	0.419
Kandolaşım infeksiyonu	25 (48%)	11 (41%)	0.535
Gram pozitif	15 (29%)	7 (26%)	0.784
Coagulase-negative Staphylococci	3	3	
Staphylococcus aureus	7		
Enterococcus spp.	5	1	
Gram negatif	13 (25%)	5 (19%)	0.515
Pseudomonas aeruginosa	2	2	
Klebsiella spp	3	-	
Escherichia coli	5	1	
Acinetobacter spp.	-	2	
Enterobacter spp.	1	-	
Stenotrophomonas maltophilia	2	-	
Polimikrobiyal infeksiyon	4 (7.6 %)	-	0.139
Kandidemi	1 (1.9 %)	-	0.468
Fungal pnömoni	6 (11.5%)	6 (22%)	0.210
Febril nötropeni mortalitesi	8 (8%)	3 (11%)	0.603

* median day

Bulgular

Akut Lösemili hastaların (10 ALL, 38 AML) 26'sı kadın, 22'si erkek olup medyan yaş 41 (16-69)'dir. Hasta grubunda, MIF geni GG allel dağılımı 34 (%70.9), GC allel dağılımı 14 (%29.1), CC allel dağılımı 0 (%0) ve G allel frekansı 82 (%85.4), C allel frekansı 14 (%14.6) bulunmuştur (Tablo 1). MIF geni alet dağılımı ve sayısında AL grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 1). "Hardy-Weinberg" dengesine göre gözlenen genotip dağılımının beklenenden farklı olmadığı saptanmıştır.

AL'li hastalarda gelişen 79 febril nötropenik atak değerlendirildiğinde, nötrofil < 500/ mL gün sayısı medyan 17 (6-56) ve febril nötropeni süresi medyan 5 (1-30) gündür. GC allel grubunda; infeksiyonların etkenleri, nötropeni (<500/ mL) süresi, ateşli gün süresi, fungal pnömoni, kandolaşım infeksiyonları ve FN mortalitesinde GG allel grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tartışma

Deneyel çalışmalarda; MIF'in sepsiste ekspresyonunun artarak mortaliteyi arttırdığı ve anti-MIF antikoları veya MIF gen delesyonunun olması durumunda; sitokin üretimi, LPS veya gram pozitif ekzotoksinler tarafından uyarılan mortalitenin azaldığı bildirilmiştir (9).

Sepsiste MIF'in yüksek plazma düzeyleri kötü prognoz ile ilişkili bulunmasına karşın MIF düzeyleri ile mortalite arasında paralellik olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (12). Kardiyak cerrahi sonrası gelişen sepsislerde kültür pozitifliği ile yüksek MIF düzeyleri arasında korelasyon olduğu ve erken dönemde MIF düzeyinin yüksekliğinin bakteriyel sepsisin ön belirtisi olabileceği ileri sürülmüştür (13). MIF geninin -173 bölgesinde G'den C'ye transisyon belirlenmiş ve sistemik juvenil romatoid artritli 117 hastada ve 172 sağlıklı kontrolde bu polimorfizm taranmıştır.

MIF-173C allelini taşıyanlarda hastalık riskinin arttığı bulunmuştur ($p=0.0005$) (10). MIF; glukokortikoidlerin (lenfositlerin çoğalmasının baskılanması dahil) immunosüpressif etkileriyle başa çıkabilen tek proinflamatuvar sitokindir. MIF promotöründeki -173G/C tek bazlık polimorfizm son yıllarda tanımlanmış olup hem in vivo hem de in vitro koşullarda artmış MIF ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Juvenil idiyomatik artritli hastalarda MIF-173 C alleli taşıyıcıları sistemik ve intra-artikular glukokortikoid tedavilerine zayıf yanıt göstermişlerdir (14).

Sistemik juvenil romatoid artritli 136 hastayla çalışılmış ve MIF-173C allelinin, MIF'in serum ve synovial sıvıda seviyelerinin artması, glukokortikoid tedavisine zayıf yanıt, aktif hastalığın direnci ve zayıf fonksiyonel sonuç ile ilişkilendirilmiştir (7).

Makrofaj migrasyon inhibitör faktörün p53'ü inaktive ettiği ve kronik inflamasyon bölgesinde oluşan tümörlerin büyümesi ve angiogenezinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (15). Vivarelli ve ark.'ları İdiopatik Nefrotik Sendromlu (INS) 257 çocuk hastada bu polimorfizmi çalıştıklarında; INS progresyonu ve glukokortikoid tedavisine cevapta MİF -173 C allelinin önemli rolü olabileceğini göstermişlerdir (16). Rigante ve ark.'ları Kalıtsal Periyodik Ateş (KPA)'li 22 hastada MİF -173 polimorfizmi ve serum düzeylerine baktıklarında; C allel sıklığı ve serum konsantrasyonunun normale göre bu hastalarda yüksek olduğunu saptamış ve inflamatuvar cevapta önemli olabileceğini bildirmişlerdir (17). Avandare ve ark.'ları Yüksek Dansiteli Parazitemi (YDP) ve Şiddetli Malarial Anemili (ŞMA) grupta MİF -173 polimorfizmini çalıştıklarında; YDP'ye duyarlılıkta bu polimorfizmin etkili olabileceğini göstermişler ama ŞMA'da anlamlı bir ilişki saptamamışlardır (18).

Bu çalışmada, MIF geninin -173 bölgesindeki nokta mutasyonları sonucu oluşan heterozigot/homozigot (GC/GG) allel dağılımı ile akut lösemilerde kemoterapi sonrası gelişen FN ataklarında; infeksiyonların dağılımı, etkenleri, kandolaşım infeksiyonları, ateşli gün süresi, 28. günde febril nötropeni mortalitesi ve nötropeni (<500/L) süresi ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05). Ancak Fungal pnömoni; GC aleli taşıyan grupta, GG aleli taşıyan gruba göre (%22/11.5) daha sık izlenmiş olup çalışma grubunun genişletilerek tekrarlanması durumunda anlamlı bir ilişki saptanabileceği düşünülmüştür.

Kaynaklar

1. Denkinger CM, Metz C, Fingerle-Rowson G, Denkinger MD, Forsthuber T. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Ex.* 2004;52:389-400.
2. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 1966;153:80-82.
3. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR., et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Nat Acad Sci Immunol.* 1989;86:7522-7526.
4. Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics.* 1994;19:48-51.
5. Zhong XB, Leng L, Beitin A, Chen R, McDonald C, Hsiao B, et al. Simultaneous detection of microsatellite repeats and SNPs in the macrophage migration inhibitory factor gene by thin-film biosensor chips and application to rural field studies. *Nucleic Acid Res.* 2005;33:e121.

6. Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M, et al. Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:1014-1018.

7. De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, et al. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1398-1407.

8. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* 1993;365:756-759.

9. Bucala R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *Faseb J.* 1996;10:1607-1613.

10. Donn RP, Shelley E, Ollier WER. A novel 5-prime-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1782-1785.

11. Sambrook JJ, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 1989; 2nd Edition, Cold Spring Laboratory Pres, Cold Spring Harbor.

12. Bozza FA, Gomes RN, Japiassú AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. et al. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock.* 2004;22(4):309-13.

13. de Mendonça-Filho HT, Gomes GS, Nogueira PM, Fernandes MA, Tura BR, Santos M, et al. Macrophage migration inhibitory factor is associated with positive cultures in patients with sepsis after cardiac surgery. *Shock.* 2005;24:313-317.

14. Afig B, Arif RÖ, Zülal Ü. Association of macrophage migration inhibitory factor gene -173G/C polymorphism with prognosis in turkish children with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatol In.* 2005;10:296-305.

15. Shun CT, Lin JT, Huang SP, Lin MT, Wu MS. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2005;1: 3767-377.

16. Vivarelli M, D'Urbano LE, Stringini G, Ghiggeri GM, Caridi G, Donn R, et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173*C allele with childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2008;23:743-748.

17. Rigante D, Flex A, Federico G, Pola R, Candelli M, Manna R, et al. Serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the intercritical phase of hereditary periodic fevers and its relationship with the MIF-173G/C polymorphism. *Scand J Rheumatol.* 2007;36:307-310.

18. Awandare GA, Ouma C, Keller CC, Were T, Otieno R, Ouma Y, et al. A macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphism is associated with high-density parasitemia in children with malaria. *Genes Immun.* 2000;7:568-575.