

PHILADELPHIA KROMOZOMU POZİTİF LÖSEMİLERİN MOLEKÜLER YAPISI

Yusuf ÖZKUL*

Anahtar Kelimeler:KML, Philadelphia kromozomu, ALL

Key Words:CML, Philadelphia chromosome, ALL.

ÖZET

Philadelphia kromozomu insanlarda özel neoplastik hastalıkla ilgili tesbit edilen ilk özel karyotip anomalisidir. Ph translokasyonu 9. kromozomda bulunan ABL proto-onkogenin 3'eksonları ve poliadenilasyon/terminasyon sekanslarının 22.kromozomda yerleşen bcr geninin 5' bölgesi ile birleşmesi sonucu oluşur. Bu translokasyonun moleküler sonucu KML'de p 210 kd ve ALL'de p 190 kd'luk hibrid proteinlerdir. Her iki proteinde ABL sekanslarından kaynaklanan artan trozin kinaz aktivitesine sahiptirler. 9.kromozomdaki kırılma bölgesi 200 KB uzunluğunda olabilirken, 22.kromozomdaki bcr geninin kırılma bölgesi genellikle 5 KB'dır. Bununla birlikte Ph' pozitif bazı ALL'lerde kırılma bölgesi bcr geninin ilk ekzonunda gözlenir.

Philadelphia translokasyonu aynı zamanda 9q+ ve 22q-'nin oluştuğu resiprokol bir olaydır. 22 q- ile karşılaştırılırsa 9q+ çok az çalışılmıştır. Son zamanlarda 22.kromozomda bulunan bcr geninin 3' kısmının 9.kromozomda bulunan c-abl geninin ilk eksonları ile birleştiği gösterilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu KML ve ALL'de hibrit bcr-abl ve abl-bcr genlerinin transcriptlerini belirlemede kullanılmaktadır.

SUMMARY

Molecular Structure of Philadelphia Chromosome Positive Leukaemias

The Philadelphia chromosome was the first specific karyotype abnormality associated with a particular neoplastic disease in humans. The Ph translocation generates a hybrid gene consisting of 5' exon sequences of the bcr gene on chromosome 22 fused to 3' exons and polyadenylation/termination sequences of the ABL proto-oncogene from chromosome 9. The molecular consequence of this translocation is the transcription of chimaeric m RNA and transcribed in a novel 210 kd protein (p 210) in CML, an p 190 kd protein in ALL which retain the tyrosine-kinase activity derived from the ABL sequences. Although the breakpoints on chromosome 9 can occur over a 200 KB range the breakpoint on chromosome 22 are usually clusteret within a 5 KB sequence designated the breakpoint cluster region. In some Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemias, however, the break in the bcr gene has been shown to lie further 5' such that only the first exon of bcr is included in the chimaeric m RNA.

The Philadelphia translocation in a reciprocal event with formation of a chromosome 9 q+ concomitantly with that of chromosome 22q-. Compared to chromosome 22q-

chromosome 9q+ has been little studied. Recently it has been shown that the 3' moiety of bcr gene from chromosome 22 is contiguous with the 5' upstream region and the first exon(s) of c-abl on chromosome 9q+.

Polymerase chain reaction has been used to show that RNA from CML and ALL peripheral blood leucocytes contain transcripts of the bcr-abl and abl-bcr chimaeric genes.

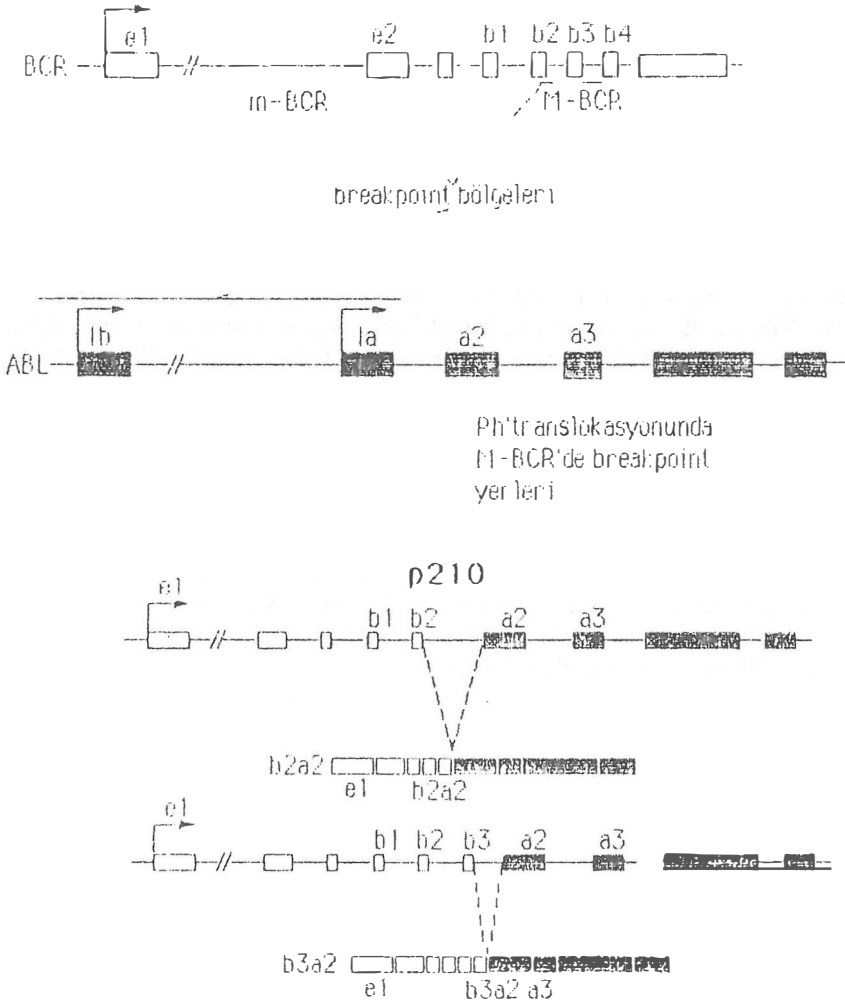
Normal hücrelerin lösemik hücrelere dönüşmesine translokasyonlar, delesyonlar ve duplikasyonlar eşlik edebilir. Genellikle etkilenen genlerin ürünleri hücre büyümesi ve farklılaşmasında görev yapmaktadırlar. Bu genlerdeki değişiklikler lösemik kloni gelişmesinde ve oluşmasında anahtar rol oynayabilirler(1). Bir DNA virusu olan Epstein-Barr virusu Burkitt's lenfomada, insan T-cell lymphotropic virus diğer adıyla insan akut lösemi/ lenfoma virusu (HTLV-1) ise bazı T hücreli lösemilerde ve lenfomalarda gözlenmiştir. İyonize radyasyon ve bazı kimyasal maddeler (benzen ve bazı antineoplastikler) lösemi sıklığında artmaya neden olmaktadır. Down send ve Fanconi anemisi gibi bazı genetik hastalıklarda da lösemiye yatkınlıklar olabilmektedir. Etiolojide ajan ne olursa olsun önce stem hücrelerden birisi mutasyona uğrar, hücreler anormal bölünmeye başlar ve sonra farklılaşma yeteneklerini kaybederler. Bu tip hücreler growth faktörlere az duyarlı ve daha kısa hücre siklusuna sahiptir(2).

Philadelphia (Ph') kromozomu, kronik miyeloid lösemili (KML) hastaların % 90'ında, erişkin akut lenfositler lösemili (ALL) hastaların % 20'sinde ve çocukluk çağı ALL hastalarının % 5'inde gözlenen bir marker kromozomudur(3). 9.kromozomun q34 bölgesi 22.kromozomuna transloke olur t(9:22) ve p210 veya p190 kd proteine çevrilebilen BCR-ABL hibrit geni oluşur. Her iki proteininde yüksek trozin kinaz aktivitesi vardır ve hücreleri transforme edebilirler(4,5).

Ph' Pozitif KML Hastalarının Analizleri

KML puliripotent bir stem cell'in neoplastik transformasyonu sonucunda oluşan bir kan hastalığıdır. KML nin sitogenetik markeri olan Ph'kromozomu ilk kez 1960'da Nowell ve Hungerford tarafından kemik iliği metafaz plaklarında gözlenmiştir(6). Ph'kromozomuna 22q- veya marker 22 de denir. Genel olarak kabul edilen Ph' koromozomudur. Ph' translokasyonu 1973'de Rowley tarafından daha detaylı tanımlanarak, 9. ve 22. kromozomlardaki kırılma yerleri belirlenmiştir(7). Translokasyona daha detaylı bakıldığında; 9.kromozomun q.34 bölgesinde lokalize olan v-ABL geninin hücresel homologu olan c-ABL geni alternatif ilk eksonları olan ekson lb ve la ile 2. ekson arasından kırılarak 22.kromozomun qll bölgesinde bulunan BCR geninin 5' kısmı ile birleşir ve yeni bir BCR-ABL hibrit genini oluşturur. BCR genindeki kırılma yerleri özel iki alanda toplanmıştır. Bunlardan birincisi, KML hastalarında gözlenen ve BCR geninin orta bölgesinde bulunan 5.8 kb uzunluğundaki bölge olup major breakpoint cluster region=M-BCR bölgesidir. Diğeri ALL'li hastalarda da gözlenen ve BCR geninin 1. eksonu ile 2.eksonu arasında yer alan intron bölgesidir. Bu bölge de minor breakpoint cluster region=m-BCR olarak adlandırılır. M-BCR bölgesi eksonlarına 1 den 5'e kadar özel sayılar verilmiştir. KML hastalarının tamamında ve ALL hastalarının bir kısmında bu bölgede kırılmalar gözlenir. M-BCR bölgesindeki kırılmalar genellikle ekson 2 ile 3 veya ekson 3 ile 4 arasında olur. Bunun sonucunda birbirlerinden 75 bp yada 25 amino asit farklı hibrit gen oluşabilir(sırası ile b2a2 veya b3a2). Bunlara ilaveten ALL hastalarında m-BCR bölgesinde de kırılmalar olabilir ve

oluşan hibrit gen $lea2$ şeklinde gösterilir. KML hastalarında oluşan BCR-ABL hibrit geninin p210 kd protein ürünü gözlenirken ALL hastalarında hem p210 hem de p190 kd protein ürünleri gözlenebilir. Her iki protein de yüksek trozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücreleri transforme edebilir(Şekil 1). ABL geninin aktivitesi için birçok yol vardır. Bunlardan en yaygın olanı ABL geninin BCR geninin promotorunun kontroluna girmesidir. Bunun yanında ABL geninin 5' kısmındaki delesyonlar, ABL geninin trozin (try) kinazın aktivitesinin pozitif ve negatif aktivitesinden sorumlu bölgeler olan SH3 ve SH2 mutasyonlar da geni aktive edebilir. Ayrıca ABL geninin duplikasyonları yine try kinaz bölgesini aktif edebilir(8).

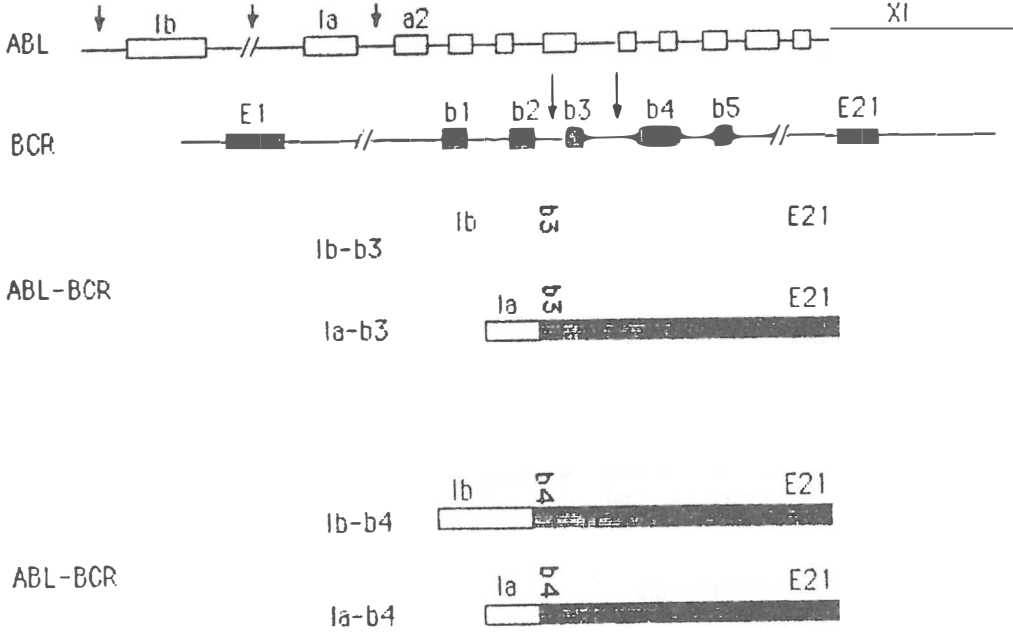


Şekil 1: KML ve ALL hastalarında 9:22 resiprokal translokasyonu sonucu oluşan BCR-ABL hibrit genini birleşim şekilleri, p^{210} ve p^{190} kd protein ürünleri.

KML genelde iki faza ayrılır. Yaklaşık üç yıl süren kronik fazda, kan ve kemik iliğinde miyeloid hücreler çoğalır(9). Bu hastalarda KML tanısı tesadüfen yapılan kan tahlilleri ile belirlenebilir. Bu dönemde KML nin sitogenetik işareti olan Ph' koromozomu hastalığın teşhisinde önemlidir. Moleküler yöntemler uygulanırsa (Southern blot ve PCR) BCR-ABL hibrit geninin varlığı tesbit edilebilir. KML de terminal faz blastik krizdir. Bu dönemde genellikle miyeloblastlar veya lenfoblastlar dominanttır(10). Miyeloid hücreler son farklılaşma yeteneğini kaybederler ve kanda olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin öncüleri artar. Blastik krizde ilave kromozomal anomaliler de gözlenir. En çok gözlenen anomaliler +8, +19, +Ph', i(17q), 14q+ ve +21'dir. Daha az olarak ta -7 ve -Y gözlenebilir(11,12,13,14,15). Bunlara ilave bu fazda bir proto onkogen olan RAS ve bir tümör süpresör gen olan P53 de mutasyonlar gözlenmiştir(16,17).

KML hastalarına sitogenetik ve moleküler yöntemlerle teşhis konabilir. Sitogenetik teşhiste; heparinli kemik iliği veya periferik kan alınarak kısa veya uzun süreli lenfosit kültürü yapılır ve rutin yöntemlere göre kromozom preparatları hazırlanır. Preparatlar Ph' kromozomu yönünden incelenerek % Ph' olarak değerlendirilirler. KML tanısında kullanılan moleküler yöntemler daha komplekstir. Bu konuda iki tip yaklaşım vardır. Genomik DNA izole edilir iki veya dört restriksiyon endonükleaz ile kesilir agaroz jele uygulanır ve Southern blot yapılarak genomik DNA işaretli prob ile hibritleştirilir ve teşhis konulur. Diğer yöntem ise Revers Traskriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonudur (RT-PCR). Yöntem oldukça duyarlı ve komplekstir. Öncelikle kan veya kemik iliğinden RNA izole edilir. Bu RNA revers transcriptaz için kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezlenir ve PCR için kalıp olarak kullanılır. RT-PCR ile bir milyon normal hücre içinden bir hatalı hücreyi yakalamak mümkündür.

Melo J. ve arkadaşları, Özkul Y. ve arkadaşları 9.kromozomda resiprokal translokasyon sonucu oluşan ABL-BCR hibrit genini belirlemek için 1993 yılında bir dizi çalışmalar yapmışlardır(18,19). Ph'translokasyonu sonucunda 22.kromozomda BCR-ABL hibrit geni oluşurken 9.kromozomda da 9q+ ABL-BCR hibrit geni oluşmaktadır. BCR geninin 3'kısmı ABL geninin alternatif eksonları olan ekson 1a veya ekson 1b ile birleşebilir ve hibrit ABL-BCR geni oluşur. ABL ve BCR genindeki kırılma yerlerine görede 1a-b3, 1a-b4 veya 1b-b4 birleşimleri gözlenebilir(Şekil 2).



Şekil 2: ABL ve BCR genlerinin genomik düzenlenimleri ve ABL-BCR hibrit geninin birleşim şekilleri

Ph' Negatif KML Vakalarında Moleküler İncelemeler

Ph' kromozomu KML hastalarının % 90'ında gözlenirken % 10 KML vakasında sitogenetik olarak Ph' translokasyonu gözlenmez. Bu grup Ph' negatif diye adlandırılır. Uygulanan moleküler yöntemlere göre % 30-50 oranında BCR-ABL hibrit geninin varlığı tesbit edilebilir. Bu grup hastalar Ph' negatif BCR-ABL pozitif şeklinde tanımlanırlar(20,21,22).

KML hastalarının çok azında, yaklaşık % 2, BCR-ABL translokasyonu sitogenetik ve moleküler yöntemlerle tesbit edilememektedir. Ph' negatif BCR negatif olarak adlandırılmaktadırlar(23,24,25).

Akut Lenfositler Lösemide (ALL) Ph' kromozomu

Ph' kromozomu erişkin ALL hastalarının % 20-30, çocuk ALL'li hastaların da % 2-5'inde gözlenebilir(3). KML hastalarındaki kırılma bölgelerine ek olarak BCR geninin ilk intronunda (minor breakpoint: cluster region:m-BCR) kırılma olmaktadır ve kırılan bölge c-ABL'nın ikinci eksonu ile birleşmektedir(1a2). Hibrit BCR-ABL geni 7 kb uzunluğunda olup p190 adlı yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteine çevirmektedir ve hücreleri transforme edebilir(26).

KML hastalarına HLA uyumlu kardeşlerden kemik iliği nakli geçerli bir tedavi şeklidir. Farklı cinsiyetlerden yapılan kemik iliği naklinden sonra iki vakada alıcının hücrelerinde lösemnin geliştiği rapor edilmiştir(27,28). Mini prob kullanılarak kemik iliği naklinden sonra lösemi gelişen hücrelerin alıcıya veya vericiye ait olup olmadığını belirlemek mümkündür(29). Yüksek polimorfizm gösteren insan miyogloblin geninin intronları bu amaç için kullanılabilir. Bu yöntem aynı zamanda ikizlerin babalık tayininde de kullanılabilir(30).

Ph' pozitif KML hastalarında yapılan G6PD analizleri sonucunda Ph' translokasyonun ikincil bir olay olabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir(31). Ph' pozitif kolonilerde ikinci bir Ph' translokasyonu da gözlenebilir. Her iki olayda BCR genindeki yeni düzenim ortaktır. İkinci bir Ph' translokasyonu belkide farklı bir koloniden kaynak alabilir. Kemik iliği naklinden sonra BCR gen düzenimi benzer olan dört hastada orijinal Ph' pozitif koloninin relaps'dan sorumlu olduğu tesbit edilmiştir. Hematolojik relaps olmaksızın Ph' koromozomlu metafaz plaklarının kemik iliği naklinden sonra gözlendiğini de rapor eden çalışmalar da mevcuttur(32). Bu olay kemik iliği naklinde mutlaka Ph' kromozomunun da değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Kemik iliği naklinden sonra yeniden lösemnin gelişmesini açıklamak için bir çok görüş vardır. Örneğin transformasyon yeteneğine sahip bir DNA sekansının nakil yapılan kök hücrelere etki yaparak bu hücreleri transforme edebileceği belirtilmektedir. Başka bir yaklaşım ise alıcıda bazı hücrelerin radiorezistant olabileceği ve bu hücrelerin kemik iliği naklinden sonra vericiye ait kök hücreleri transforme ederek yeniden lösemi gelişimine neden olabileceğidir. Nitekim bu konuda yapılan bir çalışmada verici hücrelerin % 5'den daha az olmak üzere transformasyona uğradığı bulunmuştur. Bu oranın düşük bulunmasının nedeni verici kök hücrelerinin lösemi gelişimine dayanıklı olmalarına bağlanmaktadır(30). Günümüzde minisatellit ve bcr problemler ile kemik iliği naklinden sonra hastaları gözlemek ve lösemi geliştiğinde koloninin verici veya alıcıya ait olup olmadığını tesbit etmek mümkündür.

KAYNAKLAR

- 1- Otter DW, Kolen JW, Vegt BV, et al:Oncogenesis by mutations in anti-oncogenes. Anticancer Research 10, 475-488, 1990.
- 2- Robert B:The Merck manual of diagnosis and therapy. U.S.A. Merck Co inc.pp 1233-1252, 1992.
- 3- Raimond SC:Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 81(9), 2237-2251, 1993.
- 4- Clark SS, McLaughlin J, Timmons M, et al:Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph'-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). Science 239, 775-777, 1988.
- 5- Kito K, Shimizu N, Miwa H:A granulocytic population with rearranged immunogenotype in chronic myelocytic leukaemia blast crisis and Philadelphia chromosome positive acute leukaemia with cross-lineage nature. Leukemia 7(2), 251-257, 1993.
- 6- Nowell PC, Hungerford DA:A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science, 132, 1497, 1960,

- 7- McGee JOD, Isaaccon PG, Bright NA:Oxford textbook of pathology. Oxford University Press, pp 1717-1731, 1992.
- 8- Westbrook A, Hooberman AL, Bpino C, et al:Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblast leukemia. A cancer and leukemia group B study. *Blood* 80(12), 2983-2990, 1992.
- 9- Kurzrock R, Talpoz M:The molecular pathology of chronic myelogenous leukaemia. *British J Haematol* 79, 34-37, 1991.
- 10- Morgan JG:The clinical application of molecular techniques in Philadelphia-positive leukaemia. *British J Haematol* 80, 1-5, 1992.
- 11- Hirata J, Takatsuki H, Unemura T, et al:Recurrent appearance of 14 q+ chromosome associated with lymphoid crisis of Ph-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 66, 103-107, 1993.
- 12- Lion T, Gaiger A, Henn T, et al:Pure red cell aplasia in a case of Ph negative BCR/ABL rearranged CML with t(12:14)(9:23:P11) *Cancer Genet Cytogenet* 56, 189-195, 1991.
- 13- Nabera CB, Marit G, et al:A second case of trisomy 8 in Philadelphia chromosome (Ph)-negative cells during the course of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Genes, chromosomes and cancer* 6, 255-256, 1993.
- 14- Ramirez GM, Macera MJ, and Verma RS:Two new chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 38, 115-119, 1989.
- 15- Tien HF, Chuang SM, et al:Chromosomal characteristics of Ph-positive chronic myelogenous leukemia in transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 39, 89-97, 1989.
- 16- Lee JM, Bernstein A:P53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5742-5746, 1993.
- 17- Neubaer A, He M, Schmidt, CA, et al:Genetic alterations in the P53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia:Analysis by polymerase chain reaction based techniques. *Leukemia* 7 (4):592-600, 1993.
- 18- Melo JV, Gordon DE, Tuszynski A, et al:Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 10, 2488-2491, 1993.
- 19- Özkul Y, Menevşe A, Young BD:KML de BCR-ABL ve ABL-BCR mRNA'larının belirlenmesinde RT-PCR yöntemi., 3.Klinik moleküler patoloji kongresi, Ankara, 2-3 Aralık 46, 1993.
- 20- Cogswell PC, Morgan R, Dunn M, et al:Mutations of the ras protooncogenes in chronic myelogenous leukemia:A High Frequency of Ras mutations in bcr/abl rearrangement negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 74(8), 2629-2633, 1989.
- 21- Inazawa J:Clinical fetures, chromosomes, and molecular characteristics in Philadelphia chromosome negative chronic myelogeneous leukemia. *Acta Haematol* 53(8), 1549-1558, 1990.
- 22- Martiat P, Michaux JL, Rodhain J:Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML):Comparison with Ph+CML and Chronic Myelomonocytic leukemia. *Blood* 78(1):205-211, 1991.
- 23- Dhingra K, Kurzrock R, Kantarjian H, et al:Minimal residual disease in interferon-treated chronic myelogenous leukemia. Results and pitfalls of analysis based on polymerase chain reaction. *Leukemia* 6(8):754-760, 1992.

- 24- Dobrovic A, Morley AA, Seshadri R, et al: Molecular diagnosis of Philadelphia negative CML using the polymerase chain reaction and DNA Analysis: Clinical features and course of M-bcr negative and M-bcr-positive CML. *Leukemia* 5(3), 187-190, 1991.
- 25- Nakamura Y, Hirose S, Aoki N: Consistent involvement of the 3' half part of the first BCR intron in adult Philadelphia-positive leukaemia without M-bcr rearrangement. *British J Haematol* 83, 53-57, 1993.
- 26- Sadamura S, Umerura T, Hirata J, et al: P190-type bcr/abl expressed in myeloid colonies in a patient with Ph⁺-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 6(8), 791-795, 1992.
- 27- Marmond A, Frasson F, Bacigalup A: Recurrence of Ph⁺ positive leukaemia in donor cells after marrow transplantation for chronic granulocyte leukaemia. *N.Engl.J.Med.* 310,930, 1984.
- 28- Thomas ED, Clift RA, Fefer A: Transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Ann.Int.Medicine*, 104,155, 1986.
- 29- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*. 316,76, 1985.
- 30- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature*. 316,631, 1985.
- 31- Fialkow PL, Martin RJ, Najfeld V. et al: Evidence for the multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukaemias. *Blood*, 58, 158-162, 1981.
- 32- Apperley JF, Jones L, Arthur C: Incidence of relapse after T cell depleted marrow transplant for chronic granulocytic leukaemia in 1st chronic phase. *Blood*. 68 Suppl 1. 270a. 1986.