T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PROJE BAŞLIĞI**

**Kronik myeloid lösemi hastalarında BCR-ABL mutasyonları ve tedaviye cevap ile ilişkisi**

**Proje No**:
TTU-2013-4337

Proje Türü
T.UZMANLIK

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**
Adı Soyadı: Prof.Dr. Ali Ünal
Birimi/Bölümü:Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı:Dr.Muzaffer Keklik
Birimi/Bölümü: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Kasım 2014

KAYSERİ

## TEŞEKKÜR

Bu projenin öneri aşamasından sonuçlanma aşamasına kadar gerekli destekleri sağlayan Erciyes Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER


| | Sayfa No |
|---|---|
| ÖZET | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM | 6 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 7-8 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 8 |
| 4. BULGULAR | 8 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 9-10 |
| 6. KAYNAKLAR | 10-11 |

## ÖZET

**Kronik myeloid lösemi hastalarında BCR-ABL mutasyonları ve tedaviye cevap ile ilişkisi**

Kronik myeloid lösemi (KML); kemik iliğindeki kök hücrelerin neoplastik bir hastalığıdır. Kendini; kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazi, çevre kanında olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve dalak büyümesi ile gösterir. Tüm lösemilerin %15'ini oluşturan KML, 40-50 yaşlarında ve erkeklerde daha sık görülür. Kronik stabil faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere 3 safhası vardır. KML hastalarında %95 oranında Philadelphia (Ph) kromozomu bulunur. Bu anormal kromozom; 9. kromozom üzerindeki abelson (abl) onkogeninin, 22. Kromozom üzerindeki breakpoint cluster region (bcr) bölgesine nakledilmesiyle oluşan translokasyon 9;22 ( t(9;22)) olarak da bilinen kromozomdur ve BCR-ABL füzyon geni olarak ifade edilir. Tirozin kinaz aktivitesi gösteren bu değişim, myeloid seri hücrelerinin proliferasyon artışı ile sonlanır.

Günümüzde KML hastalarında tedavinin amacı, BCR-ABL hücrelerini eradike etmek ve böylece moleküler remisyon ile şifa sağlamaktır. Hedefe yönelik tedavi olarak Tirozin Kinaz inhibitörleri (İmatinib, Nilotinib, Dasatinib) kullanılmaktadır. 2000'li yıllarda İmatinib'e dirençli olguların saptanmasıyla birlikte, BCR-ABL kinaz mutasyonları gündeme gelmiştir. Bu mutasyonların saptanması, risk sınıflamasında tedavi stratejilerini belirlemede yardımcı olacaktır.



**Anahtar Kelimeler:** BCR-ABL mutasyonları, Kronik Myeloid Lösemi, Tirozin Kinaz İnhibitörleri

## ABSTRACT

### BCR-ABL Mutations and Its Association with Treatment Response in Patients with Chronic myeloid leukemia

Chronic myeloid leukemia (CML) is a neoplastic disease of stem cells in bone marrow. It manifests with extensive myeloid hyperplasia in bone marrow, elevated leukocyte count involving mature myeloid cells in peripheral blood and splenomegaly. CML comprises 15% of all leukemias and it is more frequently seen at third and fourth decades as well as among men. It has 3 phases including chronic stable, accelerated and blast phases. Philadelphia (Ph) chromosome is present in 95% of the patients with CML. This abnormal chromosome is also known as (t9;22)) that is formed by translocation of Abelson (abl) oncogene on the chromosome 9 to breakpoint cluster region (bcr) on chromosome 22 and it is denoted as BCR-ABL fusion gene. This alteration indicating tyrosine kinase activity results in proliferation of myeloid cell lineage.

Currently, goal of treatment in patients with CML is eradication of BCR-ABL positive cells; thus, provide cure by molecular remission. Tyrosine kinase inhibitors (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib) are used for this purpose. In 2000s, BCR-ABL mutations came to order by detection of imatinib-resistance cases. Detection of these mutations will help risk stratification and determination of treatment strategies.


**Keywords:** BCR-ABL Mutations, Chronic myeloid leukemia, Tyrosine kinase inhibitors

## GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Kronik myeloid lösemi (KML); kemik iliğindeki kök hücrelerin neoplastik bir hastalığıdır. Kendini; kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazi, çevre kanında olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve dalak büyümesi ile gösterir. Günümüzde KML hastalarında tedavinin amacı, BCR-ABL hücrelerini eradike etmek ve böylece moleküler remisyon ile şifa sağlamaktır. Hedefe yönelik tedavi olarak Tirozin Kinaz inhibitörleri (İmatinib, Nilotinib, Dasatinib) kullanılmaktadır. 2000'li yıllarda İmatinib'e dirençli olguların saptanmasıyla birlikte, BCR-ABL kinaz mutasyonları gündeme gelmiştir. Bu mutasyonların saptanması, risk sınıflamasında tedavi stratejilerini belirlemede yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada; 18 yaş üzeri yeni tanı Ph(+) KML, tedaviye dirençli KML, tedaviye optimal yanıt alınamayan KML ile ikincil tedaviye yanıtın araştırıldığı KML hastalarında BCR-ABL gen mutasyonlarını inceleyerek tedaviye yanıt ile ilişkisini saptamak amaçlanmıştır. Bu mutasyonların saptanması ile, uzun süredir takipte olan fakat mutasyon nedeniyle mevcut tedaviye cevap alınamayan çok sayıda hastanın iyileşmesi mümkün olabilecektir. Literatüre göre, KML'de mutasyon analizleri, mevcut tedavi altında iken hematolojik ve sitogenetik yanıtsızlık durumunda önerilmektedir. Bizim çalışmamızda, yeni tanı almış olan Ph(+) KML hastalarında da genetik mutasyon analizinin yapılması planlanmıştır. Böylece; mutasyon olan KML hastaları, tedavinin başlangıç aşamasında tespit edilecek ve hedefe yönelik tedavi şansı yakalanacak, etkisiz ilaç uygulaması ile zaman kaybı engellenmiş olacaktır.

## GENEL BİLGİLER

Tüm lösemilerin %15'ini oluşturan KML, 40-50 yaşlarında ve erkeklerde daha sık görülür. Kronik stabil faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere 3 safhası vardır. KML hastalarında %95 oranında Philadelphia (Ph) kromozomu bulunur. Bu anormal kromozom; 9. kromozom üzerindeki abelson (abl) onkogeninin, 22. Kromozom üzerindeki breakpoint cluster region (bcr) bölgesine nakledilmesiyle oluşan translokasyon 9;22 ( t(9;22)) olarak da bilinen kromozomdur ve BCR-ABL füzyon geni olarak ifade edilir. Tirozin kinaz aktivitesi gösteren bu değişim, myeloid seri hücrelerinin proliferasyon artışı ile sonlanır. KML, myeloid dizinin artmasıyla karakterize klonal bir kök hücre hastalığıdır. İlk kez 1962'de Nowell tarafından Philadelphia kromozomu ile ilişkisi tanımlanmıştır. KML, BCR-ABL onkoproteini tarafından tetiklenir. Takip eden 30 yıllık süre içerisinde, kemik iliğinde Ph + metafazların saptanması ve uyarlanması, tedaviye yanıtın monitorizasyonunda önemli katkı sağlamıştır. 1990’lı yıllarda da, bcr-abl transkriptleri spesifik KML tedavi yanıtının başarıyla değerlendirilmesini mümkün kılmıştır. Bununla birlikte; allojeneik kök hücre nakli, alfa-interferon tedavisi ve tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi seçenekleri uygulanmasına rağmen, hastalık progresyonu görülmesi, tanı ve tedavi seçeneklerinin yeniden gözden geçirilmesi gerektiği gerçeğini gözler önüne sermiştir. Mutasyon varlığında KML tedavisinin sonuçsuz kalması ve relaps görülmesi, halen hematoloji camiasını yeni tetkik ve tedavi seçenekleri arayışı konusunda meşgul etmektedir. Tedavi altındaki hastaların bcr-abl kopya sayısının ölçüm teknikleri konusunda da uluslar arası standartlaştırma girişimleri yerleşmeye başlamıştır. Eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RQ-PCR) ile floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri, bir çok merkezde KML takibinde birlikte kullanılmaktadır. Literatürdeki bildirilere göre, KML'de mutasyon analizleri, mevcut tedavi altında iken

hematolojik ve sitogenetik yanıtsızlık durumunda önerilmektedir. Çalışmalarda genellikle Ph(+) KML olup, Tirozin Kinaz İnhibitörlerine dirençli hastalar, İmatinib tedavisine intoleran olup Nilotinib tedavisine geçilmiş olan hastalar ile blastik ve akselere fazdaki hastalar için BCR-ABL mutasyon analizi yapılmıştır. Bizim çalışmamızda, bu hasta gruplarına ek olarak yeni tanı almış olan Ph(+) KML hastalarında da genetik mutasyon analizinin yapılması planlanmıştır. Başlangıçta tanı aşamasında var olan mutasyonun belirlenmesiyle, muhtemel direnç durumu saptanarak, saptanan mutasyon tipine göre hedefe yönelik tedavi uygulanarak hastanın belki de etkisiz bir ilaç uygulaması ile zaman kaybına uğramasının engellenmesi öngörülmüştür.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, 18 yaş üzeri yeni tanı Ph(+) KML, tedaviye dirençli KML, tedaviye optimal yanıt alınamayan KML ile ikincil tedaviye yanıtın araştırıldığı toplam 50 hasta alınmıştır. Hastalardan rutin hematolojik tetkiklere ek olarak, 2 ml EDTA'lı kan alınmıştır. Alınan kanlardan DNA izolasyonu yapılmış, elde edilen DNA'ların kalite ve konsantrasyonlarının değerlendirilmesi için spektroda ölçüm yapılmıştır. Uygun kalite ve konsantrasyondaki hasta DNA'larından T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H, E255K/V, F359V/C/I mutasyonlarını belirlemek amacıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır. PCR ürünlerinden Sanger Dizi Analizi metoduna göre sekanslama yapılmıştır.

## BULGULAR

18 yaş üzeri yeni tanı Ph(+) KML, tedaviye dirençli KML, tedaviye optimal yanıt alınamayan KML ile ikincil tedaviye yanıtın araştırıldığı toplam 50 hastadan rutin hematolojik tetkiklere ek olarak, 2 ml EDTA'lı kan alınmıştır. T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H, E255K/V, F359V/C/I mutasyonlarını belirlemek amacıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılmıştır. Toplam 50 kan örneğinin PCR ürününden yapılan sekanslama sonucunda KML hasta DNA’larında T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H, E255K/V, F359V/C/I mutasyonlarından hiçbiri saptanmamıştır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

KML hastalarında tedavinin amacı, BCR-ABL hücrelerini eradike etmek ve böylece moleküler remisyon ile şifa sağlamaktır. Hedefe yönelik tedavi olarak Tirozin Kinaz inhibitörleri (İmatinib, Nilotinib, Dasatinib) kullanılmaktadır. 2000'li yıllarda ilk tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib'e dirençli olguların saptanmasıyla birlikte, BCR-ABL kinaz mutasyonları gündeme gelmiştir. Bu mutasyonların saptanması ile tedavi stratejileri değişebilmektedir. Örneğin, Lee ve arkadaşlarının çalışmasında, İmatinib'e dirençli olgularda T315I mutasyonu saptanmasıyla tedaviye yanıt alınamamasının sebebi açıklanmış ve tedavi seçeneği değiştirilmiştir. Böylece yeni tirozin kinaz inhibitörlerinin önemi ortaya çıkmıştır. Soverini ve arkadaşları da çalışmalarında; mutasyon analizlerinin ne zaman, nasıl ve hangi şartlarda yapılması gerektiği konusunda izlem yapmış ve mutasyon analizlerinin tedaviyi ve sonuçları nasıl etkileyebildiğini tartışmıştır. Böylelikle, İmatinib’e dirençli KML olgularında iki yeni tirozin kinaz inhibitörü; Dasatinib ve Nilotinib geliştirilmiştir. Bu ajanlarla tedavi sonuçları yüz güldürücü olmakla birlikte, T315I mutasyonunda beklenen etkinliğin sağlanmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda sözkonusu mutasyonların hiçbirisi saptanmamıştır. Muhtemel genetik mutasyon nedeniyle uygulanmakta olan tedaviye dirençli durumdaki kronik stabil faz, akselere faz veya blastik faz KML hastalarının tespiti ile, tedavi seçeneğinin değiştirilmesi ve hastalarda remisyon sağlanması öngörülerek bu çalışma planlanmıştır. Uzun süredir takipte olan fakat BCR-ABL mutasyonu nedeniyle tedaviye cevap alınamayan çok sayıda hastanın major tedavisinin mümkün olabileceği düşünülmüştür. Böylelikle gereksiz ve etkisiz ilaç uygulamasının önüne geçilerek, ulusal ekonomiye katkı sağlanması öngörülmüştür. Bu bağlamda, T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H,

E255K/V, F359V/C/I mutasyonlarının saptanmaması, hastaların prognozu açısından olumlu bir sonuç olup, mevcut tedavilerine devam kararını verdirmiştir.

Ayrıca çalışmamızda; 18 yaş üzeri yeni tanı Ph(+) KML hastalarında BCR-ABL mutasyon analizi ile varsa mutasyonun önceden tespiti ve tedavi seçeneğinde değişiklik gerektiren durumların öngörülmesi planlanmıştır. Fakat bu hasta grubunda da T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H, E255K/V, F359V/C/I mutasyonlarından hiçbiri saptanmamıştır. Literatürde yeni tanı Ph(+) KML'de BCR-ABL gen mutasyon analizine ait yeterince veri bulunmadığından, bizim çalışmamızın genetik analizlerin yeni tanı KML hastalarında yapılmasının sağlayacağı katkıları göstermek açısından, diğer çalışmalara öncü olabileceği öngörülmüştür. Mutasyon saptanmaması, hastaların mevcut tedaviye devamı konusunda önemli bir veri olarak katkı sağlamıştır. Nitekim literatürde de tedaviye dirençli KML olgularında T315I, V299L, T315A, F317L/V/I/C, Y253H, E255K/V, F359V/C/I benzeri mutasyon saptanma oranı %3 civarında bildirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda projenin öneri aşamasında ortaya konulan hedeflere büyük ölçüde ulaşılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle hemen hemen örtüşmektedir.

Sonuç olarak yeni tanı Ph(+) KML, tedaviye dirençli KML, tedaviye optimal yanıt alınamayan KML ile ikincil tedaviye yanıtın araştırıldığı KML hastalarında genetik mutasyonların tespiti konusunda ileri çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Lee TS, Potts SJ, Kantarjian H, Cortes J, Giles F, Albitar M. Molecular basis explanation for imatinib resistance of BCR-ABL due to T315I and P-loop mutations from molecular dynamics simulations. Cancer. 2008 Apr 15;112(8):1744-53.

2. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G,et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011 Aug 4;118(5):1208-15.

3. Kim TD, Türkmen S, Schwarz M, Koca G, Nogai H, Bommer C, et al. Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. Haematologica. 2010 Apr;95(4):582-8.

4. Leder K, Foo J, Skaggs B, Gorre M, Sawyers CL, Michor F. Fitness conferred by BCR-ABL kinase domain mutations determines the risk of pre-existing resistance in chronic myeloid leukemia. PLoS One. 2011;6(11):e27682.
5. Zhang H, Trachootham D, Lu W, Carew J, Giles FJ, Keating MJ, et al.Effective killing of Gleevec resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. Leukemia. 2008 Jun;22(6):1191-9.
6. Anand MS, Varma N, Varma S, Rana KS, Malhotra P.Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. Indian J Med Res. 2012;135:42-8.
7. Corbin AS, La Rosée P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW.Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib.
Blood. 2003 Jun 1;101(11):4611-4.
8. Lee TS, Potts SJ, Albitar M. Basis for resistance to imatinib in 16 BCR-ABL mutants as determined using molecular dynamics. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2009 Jun;4(2): 164-73.
9. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results.
Blood. 2006 Jul 1;108(1):28-37.
10. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. Blood. 2009 Sep 3;114(10):2168-71.