

Kronik Lenfositik Lösemide Genetik Özellikler ve TP53 Mutasyonu

Işıl Erdoğan Özunal¹, Tuğrul Elverdi², Ayşe Salihoğlu², Ahmet Emre Eşkazan², Muhlis Cem Ar², Şeniz Öngören², Zafer Başlar², Yıldız Aydın², Özden Hatırnaz³, Müge Sayitoğlu³, Uğur Özbek³, Teoman Soysal²

¹İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Erişkin Hematoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

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

³İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Erdoğan Özunal I, Elverdi T, Salihoğlu A, et al. Genetic features and TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cerrahpaşa Med J.* 2021;45(3):221-226.

Öz

Amaç: Bu çalışmada hematoloji polikliniğinde 2001-2013 arasında kronik lenfositik lösemi tanısı konan ve takip edilen 50 hastada tümör protein 53 mutasyon sıklığının değerlendirilmesi, 17p delesyonu ve diğer prognostik faktörlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Hastalardan 10 cc kan alınarak elde edilen cDNA'larda tümör protein 53 geninin 4-11 ekzonlarındaki varyasyonlar polimeraz zincir reaksiyonu ve Sanger dizi analizi yöntemleri ile belirlendi. Yaş, cinsiyet, tanı tarihi, tanıdan tedaviye kadar geçen süre, tanı sırasında evre, floresan in-situ hibridizasyon ile 17p delesyonu varlığı, zeta-zinciri-ilişkili protein kinaz 70 ve CD38 pozitifliğini içeren demografik veriler hasta dosyalarından geriye dönük olarak elde edildi.

Bulgular: Hastaların 28'i (%56) erkekti ve yaş dağılımı 36 ile 68 yıl arasındaydı. Floresan in-situ hibridizasyon ile bakılmış olan 17p delesyonu, 7 hastada (%14) pozitif, 43 hastada (%86) negatifti. Tümör protein 53 mutasyonu 17 hastada analiz edilebildi; 5 hastada yabancı tip (wild type) olduğu, kalan 12 hastanın tümünde 215. pozisyonunda sitozin bazından (C), guanin bazına (G) bir değişiklik olduğu belirlendi. Bu değişiklik tek nükleotid polimorfizmi olarak değerlendirildi. Tümör protein 53 geninde mutasyon saptanan hastaların 9'unda 17p delesyonu negatifti.

Sonuç: Tanı kılavuzları günümüzde kronik lenfositik lösemi hastalarında 17p delesyonu taranmasını önermekte fakat tümör protein 53 mutasyonu açısından tarama yapılmasını içermemektedir. Çalışma grubumuzda 17 hastadan 12'sinde (%70,5) saptanan tümör protein 53 gen polimorfizmi literatürde kötü prognoz ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir. Tümör protein 53 gen polimorfizmi saptadığımız hastalardan 9'unda (%75) 17p delesyonu negatif bulunduğu için kronik lenfositik lösemide gerek tedaviyi yönetmek gerekse izlemde kötü giden hastalarda tedavi rejimini değiştirmek için 17p delesyonu yanında tümör protein 53 mutasyonunun da en azından tedavi planlanırken analiz edilmesi önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Kronik lenfositik lösemi, tümör protein 53 mutasyonu, polimorfizm

Genetic Features and TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia

Abstract

Objective: In this study, we aimed to evaluate the incidence and type of tumor protein 53 mutations and compare this with 17p deletion and other prognostic factors in 50 outpatient patients who were diagnosed with chronic lymphocytic leukemia between 2001 and 2013 in our hematology outpatient clinic.

Methods: In the study, 10 cc of blood was collected from patients and variations in the 4-11 exons of the tumor protein 53 gene in the cDNAs were determined by polymerase chain reaction and Sanger sequence analysis methods. Demographic data as age, sex, time of diagnosis, time interval between diagnosis and treatment, disease stage, 17p deletion status, zeta-associated-protein kinase 70 and CD38 positivity were obtained retrospectively from outpatient files.

Results: Twenty-eight patients (56%) were male. Age interval was between 36 and 68 years. 17p deletion analyzed by fluorescence in situ hybridization was positive in 7 patients (14%) and negative in 43 patients (86%). Tumor protein 53 mutations could be analyzed in

Received: April 5, 2021 Accepted: July 6, 2021 Available Online Date: August 23, 2021

Corresponding author: Işıl Erdoğan Özunal, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Erişkin Hematoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

e-mail: isilnokaerdogan@hotmail.com

DOI: 10.5152/cjm.2021.21021



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

17 patients; 5 patients were wild type, and all of the remaining 12 patients had a cytosine (C) to guanine (G) alteration at position 215. This alteration was considered as a single nucleotide polymorphism. In 9 of the patients with mutations in the tumor protein 53 gene, 17p deletion was negative.

Conclusion: Current treatment guidelines recommend screening for 17p deletion in chronic lymphocytic leukemia patients, but do not include screening for tumor protein 53 mutations. In our study group, tumor protein 53 gene polymorphism which has been associated with poor prognosis and drug resistance in the literature was detected in 12 (70.5%) of 17 patients. Since 9 of the patients (75%) with tumor protein 53 gene polymorphism were found to be 17p deletion negative, in addition to 17p deletion, the analysis of tumor protein 53 gene mutations can be recommended, at least before planning the treatment or before changing the treatment regimen in poor responsive patients.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, tumor protein 53 mutation, polymorphism

Giriş

Kronik lenfositik lösemi (KLL) yavaş proliferen B lenfositlerin monoklonal neoplastik bir hastalığıdır. Tanıda ortalama yaş 65 olmakla birlikte yaşla görülme sıklığı artar. Klinik gidiş ve yaşam süresi oldukça değişkendir.¹ Evreleme için kullanılan Binet ve modifiye Rai sistemlerinin özellikle erken evre hastalıkta prognozu belirlemede yetersiz kaldığı dikkati çekmektedir. Bu nedenle KLL’de hastalık evresinden bağımsız olarak prognozu belirleyen parametreler geliştirilmiştir.

DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel olayda rol oynayan p53 proteininin tümör baskılayıcı rolünün ortaya konulması sonrasında, p53 proteinini kodlayan gen tümör protein 53 (TP53) olarak isimlendirilmiştir.² TP53 geni 17. kromozomun kısa kolu (17p13.1) üzerinde yer alır, 11 ekzondan oluşur ve DNA hasarına hücresel cevabı düzenlemede ve apoptozun indüklenmesinde esansiyel bir rol oynar.^{3,4} Tedavi almamış KLL hastalarının %4-10’unda TP53 mutasyonu saptanmış ve ilaç direnci veya atipik (prolenfositik) morfoloji ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{2,5-9} Bu çalışmada, KLL tanısı ile takip edilen hastalarda TP53 genindeki mutasyon durumunun belirlenmesi, 17p delesyonu (del17p) ve KLL’de tanımlanmış diğer prognostik faktörlerle ilişkisini incelemek amaçlanmıştır.

Yöntemler

Çalışmaya hematoloji kliniğinde KLL tanısı ile takip edilen ve dosyalarına ulaşılabilen, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) ile tanıda, tedavi öncesinde veya tedavi sırasında del17 p bakılmış olan ve çalışmaya katılmak isteyen 50 hasta dahil edildi. Hastaların polikliniğe ilk başvurdukları tarih itibarıyla KLL tanıları, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia tarafından 2008 yılında güncellenen National Cancer Institute–Working Group kılavuzuna göre doğrulandı. Çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (proje no: 32031) ve Helsinki Deklarasyonu ilkelerine uygun olarak yapılmış, çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.04.2013 tarihinde onaylanmıştır (karar no: A-02).

Çalışmaya dahil edilen hastalardan, TP53 gen mutasyonlarının taranması amacıyla etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüp içine 10 cc venöz kan örneği alındı. Optimizasyon süreci sonrasında deoksiribonükleik asit (DNA) dizileme işlemi ile TP53 geni ekzon 4-11 arasında mutasyon taraması yapıldı. Beyaz kan hücrelerinden ribonükleik asit (RNA) elde edilerek komplementer DNA

(cDNA) sentezlendi. TP53 geni kodlayan bölgesine özgü primerler cDNA üzerinden tasarlandı. Seçilen primerler “NCBI Blast Search” DNA dizi karşılaştırma sayfasında taranarak bu primerlerin hem TP53 geninde yerleşimli olduğu hem de insan genomunda başka bölgelere bağlanmadığı kontrol edildi. Primerlerin TP53 geni üzerindeki yerleşimleri Şekil 1’de gösterilmiştir. Amplifiye edilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünleri için dizileme ve pürifikasyon hizmetleri ticari firma aracılığı ile alındı. Dizileme sonuçlarına CLC workbench 3.6.1 (Danimarka) programı kullanılarak analiz edildi. Elde edilen cDNA’larda TP53 geninin 4-11 ekzonlarındaki varyasyonlar cDNA üzerinde PZR ve Sanger dizi analizi yöntemleri ile belirlendi. Hastaların demografik özellikleri, fizik muayene bulguları, tanı sırasındaki laboratuvar değerleri ve Binet ve Rai evreleri, tedavi başlangıcına kadar geçen süre ile aldıkları tedavi rejimleri geriye dönük olarak incelendi.

İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizinde SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chiago, IL, ABD) programı kullanıldı. Kategorik değişkenler için Ki-kare (Fisher’ s exact test) kullanıldı ve p değerinin ,05’ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hastaların 28’i (%56) erkekti ve yaş dağılımı 36 ile 68 yıl arasındaydı (ortalama 57 yaş). Başvuru esnasında hastaların 31’i (%62) Binet evreleme sistemine göre erken evredeydi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 1’de özetlenmiştir. Tanı sırasındaki evre ile (Rai erken+orta evre ve ileri evre) Hb değeri arasında anlamlı ilişki saptandı ($P = ,01$). Tanı sırasında LDH düzeyi yüksek olan hastalar ile splenomegali varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı ($P = ,094$). Çalışmaya alınan 50 hastanın 24’ünde ZAP-70 çalışılmıştı, 26 hastanın dosyasından bu veriye ulaşılamadı. ZAP-70 bakılmış olan hastalardan 13’ünde (%54) pozitifken, 11 hastada (%46) negatifti (Tablo 1). CD38 düzeyi 30 hastada bakılmıştı. Pozitiflik için cutoff değeri Youden indeksine göre %30 olarak kabul edildi (Tablo 1).¹⁰

FISH ile bakılmış olan del17p 7 hastada (%14) pozitifken 43 hastada (%86) negatifti. TP53 mutasyonu çalışmaya dahil edilen 50 hastadan 17’sinde analiz edilebildi. 5 hastada yabancıl tip (wild type) olarak tespit edildi. Diğer 12 hastanın tümünde 215. pozisyonda sitozin bazından (C), guanin bazına (G) bir değişiklik olduğu belirlendi. Bu değişiklik 72. kodona denk gelmekte ve arjinin amino asidinden prolin amino asidine dönüşmesine neden olan ve daha önce farklı hastalıklarda da tespit edilmiş olan bir varyasyondur ve

GATGGGATTGGGGTTTTCCCTCCCATGTGCTCAAGACTGGCGCTAAAAGTTTTGAGCTTCTCAAAGTC
 TAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTGGGCTGGGAGCGTG
 CTTTCCACAGCGGTGACACGCTTCCCTGGAATGGCAAGCAGACTGCGTTCCGGGCTCACTGCCATGGAGGA
 GCGGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACTACTT
 CCTGAAACAAACGTTCTGTCCCTTGGCGTCCCAAGCAATGGATGATTGATGCTGTCCCGGACGATA
 TTGAACAATGGTTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGTCTCCCTCGT
 GGCCCTGCAACAGCAGCTCCTACACCGGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCTGTCTATCTTCT
 GTCCCTTCCAGAAACCTACAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCACTTCTGGGACAGCCA
 AGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCTGCCCCCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAGACCTGCCCTGT
 GCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCGCGCACCCGCTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCA
 CAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCC
 CTCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGAAATTGCGTGTGGAGTATTGGATGACAGAAACACTTTTCG
 ACATAGTGTGGTGGTCCCTATGAGCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACCTAC
 ATGTGTAACAGTTCTGCTAGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCAGCTGGAAGACT
 CCAGTGGTAATCTTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGCTGTCTCTGGGAGAGACCGGCG
 CACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCAGAGCTGCCCCAGGAGGACCTAAGCGA
 GCACTGCCCAACAACACAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCC
 TTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCGCTTGGAACTCAAGGATGC
 CCGGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAGGCTCAGTCT
 ACCTCCCGCCATAAAAACCTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGACATCTCCACTCTCT
 TCCCTCACTGACAGCTCCACCCCATCTCTCCCTCCCTGCCATTTTGGGTTTGGGTTCTTTGAACCC
 TTGCTTGCATAGGTGTGCGTCAAGACACCCAGGACTTCCATTGCTTTGTCCCGGGCTCCACTGAAC
 AAGTTGGCTGCACTGGTGTGTTTGTGTGGGAGGAGGATGGGAGTAGGACATACCAGCTTAGATTTTA
 AGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTGCACTTAAGGGTTAGTTTACAATC
 AGCCACATTTCTAGGTAGGGGCCACTTCCCGTACTAACCGAGGAGCTGTCCCTCACTGTGAAATTTTC
 TCTAATCTCAAGGCCCATATCTGTGAATGCTGGCATTGTCACCTACCTCAGAGTGCATTGTGAGGGT
 TAATGAATAATGTACATCTGGCCTTGAAACACCTTTTATTACATGGGGTCTAGAACTTGACCCCTTG
 AGGGTGCTTGTCTCCCTCTCCCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GAGGGAGTTGTCAAGTCTCTGCTGGCCAGGCCAAACCTGTCTGACAACTCTTGGTGAACCTTAGTACC
 TAAAAGGAATCTCACCOCATCCACACCTGGAGGATTTTCATCTCTGTATATGATGATCTGGATCCAC
 CAAGACTGTGTTTATGCTCAGGGTCAATTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGAGA
 CTGGGCTCCGCTTTGTTGCCCCAGGCTGGAGTGGAGTGGCGTGATCTTGGCTTACTGAGCGCTTTGCCCTCC
 CCGGCTCGAGCAGTCCCTGCTCAGCCTCCGGAGTAGCTGGGACCACAGGTTTCATGCCACCATGGCCAGCC
 AACTTTTGCACTGTTTGTAGAGATGGGGTCTCAGAGTGTGCCAGGCTGGTCTCAAAGCTCCTGGGCTCA
 GGCGATCCACCTGTCTCAGCCTCCAGAGTGTCTGGGATTAACAATGTGAGCCACCACTCCAGCTGGAAG
 GGTCAACATCTTTTACATTCTGCAAGCAGATCTGCATTTTACCACCCACCTTCCCTCCTCTCCCTTTT
 TATATCCATTTTATATCGATCTCTTATTTTACAATAAACTTTGCTGCCACCTGTGTGCTGAGGGGT

Şekil 1. TP53 geni mutasyonlarını tespit etmede kullanılan primerler ve yerleşim yerleri.

tek nükleotid polimorfizmi olarak değerlendirildi (Şekil 2). Bu 12 hastadan bir diğerinde c.215C-T polimorfizminin yanı sıra iki farklı mutasyon da belirlendi. Bunlardan ilki TP53 geninin 7. ekzonunda 681 ve 682. nükleotidler arasında bir timin bazı (T) insersiyonuydu ve c.681-682 insT olarak tanımlandı (bu insersiyon sonucunda aspagin amino asidi (D) yerine bir durdurma kodonu [stop kodon] oluşur ve protein kodlanması durur). Bir diğer mutasyon ise 6. ekzonda 569. pozisyonunda delesyona uğrayan bir sitozin (C) bazıydı (bu delesyon sonucunda ise 190. kodonda bir çerçeve kayması [frameshift] mutasyon oluşmaktadır).

Tek nükleotid polimorfizmi saptanan hastaların tanı sırasındaki evreleri, tanı-tedavi arasında geçen süre, fizik muayene bulguları ve tanıdaki laboratuvar değerleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

TP53 mutasyonu olan 12 hastadan 3’ünde (%25) del17p pozitif iken, 9’unda (%75) del17p olmaksızın TP53 mutasyonu saptandı. TP53 mutasyon analizi yapılan hastaların FISH ile del17p durumu Tablo 3’te verilmiştir.

Wild type TP53 saptanan hastaların 4’ü erkek, 1’i kadındı ve hepsinde tedavi öncesi periferik kandan FISH ile bakılan del17p negatifti. Yaşları 36 ile 61 arasında değişmekteydi. Bu hastaların hepsi tanıda erken evredeydi, 4’ünde tanıdan sonra sırasıyla 8-11-20 ve 48. aylarda tedavi gereksinimi olmuştu ve birinde izlemde 10. yılda kemik iliğinde prolen-fositik transformasyon gelişmişti.

Tartışma

KLL’de hastalık evrelemesi için kullanılan Binet ve modifiye Rai sistemlerinin özellikle erken evre hastalıkta

prognozu belirlemede yetersiz kaldığı için evreden bağımsız olarak prognozu belirleyen parametreler (immunglobulin ağır zincirinin değişken bölgesinde (IGHV) mutasyon yokluğu, laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, zeta-zinciri-ilişkili protein kinaz 70 (ZAP-70) ve CD38 ekspresyonu, serum beta-2 mikroglobulin (beta 2MG) ve timidin kinaz düzeyi, çözünebilir CD23 düzeyi, lenfosit sayısının iki katına çıkma zamanında kısalma vb.) geliştirilmiştir.

KLL, programlanmış hücre ölümü için klasik bir örnek ve hücreler çoğunlukla hücre siklusunun G0 fazındadır, ana apoptotik yola mitokondri sitokrom-c yolağıdır. TP53 geninin artışı (up-regülasyon), sitozol içinde iç ve dış mitokondriyal membran arasında sitokrom-c salınımına yol açarak DNA’da hasarın başlamasına neden olur.¹¹ Del17p ve/veya TP53 gen mutasyonu nedeniyle değişmiş TP53 fonksiyonu KLL’de kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.^{2,5-8,12} Bir grup KLL’de del17p olmadan TP53 mutasyonu görülür.^{2,4} Bu bilgiden yola çıkarak planladığımız çalışmamıza dahil edilen 50 hastada tedavi öncesi veya izlem sırasında FISH ile bakılan del17p, 7 hastada (%14) pozitif, 43 hastada (%86) negatifti. Literatürde tedavi almamış KLL hastalarının %4-10’unda TP53 mutasyonu olduğu bildirilmiştir.² Çalışmamızdaki bu sonuç literatür verileri ile uyumludur.

Del17p pozitif olan KLL’lerin yaklaşık üçte ikisinde TP53 mutasyonu görüldüğü bilinmektedir.^{2,4} Çalışmamızda DNA dizi analizi yapılabilen 17 hastadan 5’inde TP53 wild type saptanırken 12 hastada TP53 geninde tek nükleotid polimorfizmi tespit ettik. Polimorfizm olan 12 hastanın 9’unda (%75) del17p negatifti. Çalışmamızda del17p pozitif olan 7 hastanın 3’ünde TP53 mutasyonu vardı. Bu oran literatür

Tablo 1. Hastaların özellikleri

Parametre	
Toplam hasta sayısı	50
Cinsiyet (E/K)	28/22
Yaş (medyan, aralık)	57 (36-68)
Evre (Binet)	A: 31 (%62) B: 9 (%18) C: 10 (%20)
Evre (Rai)	0: 9 (%18) I: 13 (%26) II: 17 (%34) III: 5 (%10) IV: 6 (%12) medyan/aralık
Tanı-tedavi arasında geçen süre (ay)	6 (0-100)
Tedavi rejimi sayısı	1 (0-6)
Splenomegali (var/yok)	27/23
Nodal alan	2 (0-3)
Hb (gr/dL)	12,2 (6,7-17,4)
Trombosit (/mm ³)	158,500 (5,000-300,000)
Lenfosit (/mm ³)	22,845 (1,450-332,280)
LDH (normal/yüksek)	38/12
Beta-2 mikroglobulin (normal/yüksek)	7/43
FISH ile del17p (pozitif/negatif)	7/43
CD38 (pozitif/negatif)*	5/25
ZAP-70 (pozitif/negatif)**	13/11
TP 53 mutasyonu (wild type/tek nükleotid polimorfizmi)***	5/12
*CD38 düzeyi 30 hastada bakılmıştı. Pozitiflik için cutoff değeri Youden indeksine göre %30 kabul edildi. ¹⁰	
**ZAP-70, Zeta zinciri ilişkili protein kinaz 70; çalışmaya alınan 24 hastada bakılmıştı.	
***TP53 mutasyonu (polimorfizmi) 17 hastada analiz edilebildi.	

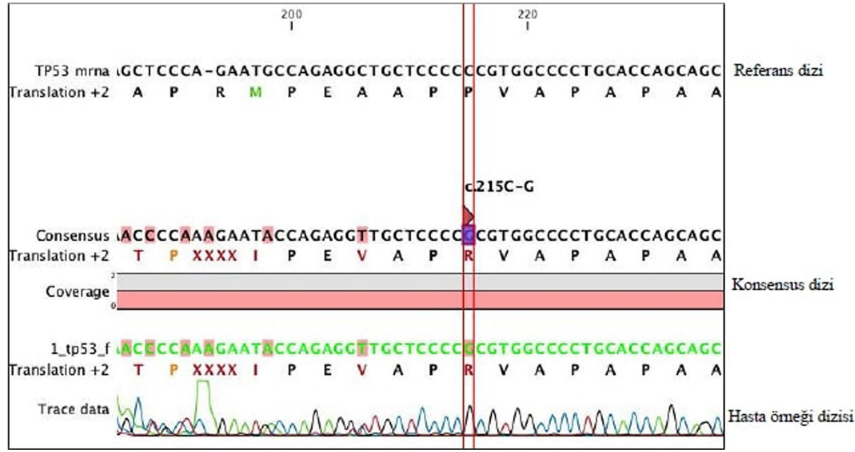
ile benzerlik göstermektedir. Hastaların %95'inde mutasyonlar protein kodlayan bölgeleri içeren ekzon 2-11 bölgesinde saptanır. Ekzon 4-9 bölgesi ise mutasyonların %90'ını içine alır. Bizim çalışmamızda da ekzon 4-11 arası taranmıştır. Ancak DNA dizileme analizi sırasında bazı hastalarda analizi tekrarlamak gerekliliği doğduğu için 50 hastadan 17'sinde mutasyon analizi yapılabilmektedir. Mutasyon taranabilen 17 hastadan 12'sinde (%70,5) TP53 mutant saptanmıştır.

Literatüre göre bu oranın yüksek gibi görünmesinin sebebi tüm hastalarda mutasyon analizinin yapılamamış olması olabilir. Takipte tek nükleotid polimorfizmi saptanan 12 hastadan 2'si çalışma sırasında halen tedavisiz izlenmekteyken 10 hastada tedavi endikasyonu gelişmiştir. TP53 geninde şimdiye kadar 200'ün üzerinde tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir ve bunların bir kısmının farklı kanser türlerinde klinik seyre etkili olabileceği bilinmektedir.¹³ Zhang ve Guo¹⁴ T53 polimorfizminin KLL'nin oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ve farklı polimorfizmlerin KLL hastalarında yüksek lökosit ve düşük trombosit sayısı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda hasta sayısının az olması nedeniyle bu açıdan karşılaştırma yapılamış olmakla beraber tek nükleotid polimorfizmi görülen 12 hastadan 10'unda tedavi endikasyonu doğmuş olması bu bilgiyi destekleyebilir özelliğindedir. TP53 genindeki çoğu mutasyon farklı pozisyonlardaki tek aminoasit değişikliğinden kaynaklanan missense mutasyonlardır, prematür stop kodon oluşmasına neden olan nonsense mutasyonlar ve,veya veya insersiyon ve,veya delesyonların neden olduğu frameshift mutasyonlar daha az sıklıkla gelişir.¹⁵ Bizim çalışmamızda da bir hastada c.215C-T polimorfizminin yanı sıra biri stop kodon oluşmasına neden olan, diğeri frameshift mutasyon olan iki farklı mutasyon belirlenmiştir.

Çalışmamızda TP53 wild type olan 5 hastanın tamamında periferik kandan FISH ile bakılan del17p de negatifti. Polimorfizm saptanan bir hastada tanıdan 2 yıl sonra kemik iliğinde 17p13.1'de tek allelde mikrodelsiyon saptanırken tanıdan sonra 3. yılda periferik kandan FISH ile bakılan del17p negatif saptanmıştı.

KLL'de lösemik hücrelerdeki ZAP-70 pozitifliği, IGHV mutasyon durumu ile yakın bir ilişki gösterdiği bilinmektedir.¹⁶ Özellikle erken evre KLL'de ZAP-70 pozitif saptanan hastalarda tedavi ihtiyacının daha kısa sürede gerçekleştiği gösterilmiştir ve tanı sırasında ZAP-70 düzeyinin belirlenmesinin erken dönemde hastalık progresyonunun değerlendirilmesinde önemli bir parametre olduğu ileri sürülmüştür.¹⁶ KLL'de prognozu belirleyen parametreler arasında sitogenetik, IGHV mutasyonu ve ZAP-70 pozitifliği özellikle önemli prognoz göstergeleri olarak öne çıkmalarına rağmen tetkik edilmelerindeki bazı teknik güçlükler nedeniyle güncel klinik pratikte yeterince yararlanılabilir duruma gelmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da çalışmaya alınan 50 hastanın 24'ünde ZAP-70 çalışılmış, 13 hastada (%54) pozitif, 11 hastada (%46) negatif bulunmuştu.

TP53'te herhangi bir şekilde bozulma barındıran KLL tanıda olumsuz biyolojik ve klinik özellikler taşımaktadır.² TP53 gen aberasyonları tedavi edilmemiş KLL hastalarının ortalama %10-15'inde gelişir ancak fludarabine dirençli KLL'de insidans %40-50'ye kadar artar.^{9,17} Del17p'ye ek olarak TP53 mutasyonunun kronik lenfositik lösemide bağımsız prognostik faktör olduğu gösterildiğinden bu hastaların yeni terapötik ajanlarla tedavisi veya klinik çalışmalarla ele alınması önerilebilir.¹⁸ Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar özellikle del17p olmayan olgularda da TP53 mutasyonu saptanmış olması kronik lenfositik lösemi tanılı hastalarda prognozu belirlemek tedavi rejimini seçmek tedavi yanıtını değerlendirmede kötü prognozu öngörebilmek ve remisyona giren hastalarda tedavinin allojenik kök hücre nakli ile devamı açısından hastaları değerlendirmek için TP53 mutasyon durumunun tayinini



Şekil 2. c.215 C-G polimorfizminin bir hastada belirlenmesi.

Tablo 2. Tek nükleotid polimorfizmi saptanan hastaların özellikleri

Hasta	FISH ile del17p	Cins	Yaş	Rai/ Binet	Tanı-tedavi arası süre	LAM*	SM	Beta-2 MG	LDH	ZAP70	CD38
1	(-)	K	48	1/A	71 ay	1	(-)	N	N	yok	(+)
2	(-)	K	56	1/A	49 ay	1	(-)	Y	N	(+)	(-)
3	(-)	K	68	0/A	42 ay	0	(-)	Y	N	yok	(+)
4	(+)	K	65	2/B	29 ay	3	(+)	Y	N	(-)	(-)
5	(-)	K	62	0/A	Tedavisiz	0	(-)	Y	N	(-)	(-)
6	(-)	E	54	2/A	Tedavisiz	1	(+)	N	N	(-)	(-)
7	(-)**	E	56	3/B	0 ay	3	(+)	Y	N	(+)	(-)
8	(+)	E	62	2/B	1 ay	3	(+)	Y	N	yok	(-)
9	(-)	E	56	2/A	5 ay	2	(+)	Y	N	yok	Yok
10	(-)	K	63	1/A	27 ay	2	(-)	Y	N	yok	(-)
11	(+)	K	64	0/A	100 ay***	0	(-)	Y	Y	yok	Yok
12	(-)	E	64	2/B	2 ay	3	(+)	Y	N	yok	Yok

Kısaltmalar: N, normal; Y, yüksek; SM, splenomegaly; yok, dosyada bulunamayan veriler.

*Nodal alan sayısı belirtilmiştir.

**7 no'lu hastada tanıdan 2 yıl sonra kemik iliğinde 17p13.1'de tek allelde mikrolezyon saptanırken tanıdan sonra 3. yılda periferik kan-dan FISH ile bakılan 17p delesyonu negatif bulunmuştur.

***11 no'lu hasta tanıdan sonra 8 yıl tedavisiz izlenmiş, izlemin 9. yılında tedavi başlanmış ve 11. yılında bakılan del17p pozitif bulunmuştur.

Tablo 3. TP53 mutasyon analizi yapılan hastaların FISH ile del17p durumu

Parametre	del17p pozitif	del17p negatif	Toplam
TP53 wild type	0	5	5
Tek nükleotid polimorfizmi	3	9	12
Toplam	3	14	17

destekler niteliktedir. Ancak TP53 polimorfizm varlığı veya yokluğunun ya da polimorfizm türlerinin uzun vadeli prognoz değerinin saptanması için kuşkusuz daha fazla hasta sayısı ve takip süresi gerekmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Tarih: 02.04.2013; Karar no: A-02) alınmıştır.

Hasta onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan tüm hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – I.E.Ö., T.S.; Tasarım – I.E.Ö., T.S., Ö.H.N., M.S., U.Ö.; Denetleme – T.S.; Kaynaklar – I.E.Ö., T.S.; Malzemeler – T.E., A.S., A.E.E., M.C.A., Ş.Ö., Z.B., Y.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – I.E.Ö., Analiz ve/veya Yorum – I.E.Ö., T.S.; Literatür Taraması – I.E.Ö.; Yazıyı Yazan – I.E.Ö.; Eleştirel İnceleme – T.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (proje no: 32031).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval for this study was received from İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: April 2, 2013; Decision number: A-02).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from all patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – I.E.Ö., T.S.; Design – I.E.Ö., T.S., Ö.H.N., M.S., U.Ö.; Supervision – T.S.; Resources – I.E.Ö., T.S.; Materials – T.E., A.S., A.E.E., M.C.A., Ş.Ö., Z.B., Y.A.; Data Collection and/or Processing – I.E.Ö., Analysis and/or Interpretation – I.E.Ö., T.S.; Literature Search – I.E.Ö.; Writing Manuscript – I.E.Ö.; Critical Review – T.S.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The study was supported by İstanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP) (project no: 32031).

References

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456. [\[CrossRef\]](#)
2. Rossi D, Cerri M, Deambroggi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):995-1004. [\[CrossRef\]](#)
3. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749-758. [\[CrossRef\]](#)
4. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6):1580-1589. [\[CrossRef\]](#)
5. Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008;112(8):3322-3329. [\[CrossRef\]](#)
6. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-4479. [\[CrossRef\]](#)
7. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2223-2229. [\[CrossRef\]](#)
8. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009;23(1):117-124. [\[CrossRef\]](#)
9. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer SJNRC. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *J Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50. [\[CrossRef\]](#)
10. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023-1029. [\[CrossRef\]](#)
11. Greer JP, Arber DA, Glader BE, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
12. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114(26):5307-5314. [\[CrossRef\]](#)
13. Bilous N, Abramenko I, Saenko V, et al. Clinical relevance of TP53 polymorphic genetic variations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017;58:1-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Zhang WJ, Guo SL, Yin G, et al. Association between TP53 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(23):12073-12079. [\[CrossRef\]](#)
15. Olivier M, Hollstein M, Hainaut PJCS. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008. [\[CrossRef\]](#)
16. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(9):893-901. [\[CrossRef\]](#)
17. Zenz T, Häbe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009;114(13):2589-2597. [\[CrossRef\]](#)
18. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-1461. [\[CrossRef\]](#)