T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALL ve KML' Lİ HASTALARDA BCR ve ABL GENLERİNDEKİ MUTASYONLARIN İNCELENMESİ

Vasfiye Betül KOCABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA – 2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALL ve KML' Lİ HASTALARDA BCR ve ABL GENLERİNDEKİ MUTASYONLARIN İNCELENMESİ

Vasfiye Betül KOCABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hasan ACAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10202019 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

ii. ÖNSÖZ

Tezimin değerlendirilmesinde yardımcı olan sayın Doç.Dr. Tülin ÇORA'ya, tezimin deney materyallerinin toplanmasında yardımını esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Ümran ÇALIŞKAN'a, fikirlerinden her anlamda faydalandığım değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Ercan KURAR'a, beni her türlü konuda maddi ve manevi olarak destekleyen kıymetli büyüğüm Süleyman NERGİZ'e, K562 ve Raji hücre hattını bize hediye ederek çalışmamızı destekleyen Arş. Gör. Ömer Faruk BAYRAK'a, yüksek lisans aşamasında bana verdiği destek ve gösterdiği sabır için Uzm. Dr.Özgür BALASAR'a, hücre hatlarının çalışmalarında yardımını eksik etmeyen arkadaşım Z.Betül BULUT'a, yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Babak Nami MAEOULOU'na, eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma ve ayrıca eğitimim boyunca her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen ailemin birbirinden fedakâr olan her bir ferdine teşekkürü bir borç bilirim.

iii. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1

1.1. Kanserin Tanımı 3

1.1.1. Kanserin Moleküler Biyolojisi 6

1.1.2. Kanserin Genetik Temeli 8

1.2. Kanserin Sınıflandırılması 10

1.2.1. Lösemiler 11

1.2.2. Lösemilerin Etiyolojisi.....11

1.2.3. Lösemilerin Sınıflandırılması.....13

1.2.4. KML ve ALL' nin Genel Özellikleri.....14

1.2.5. KML ve ALL'nin Genetik Temeli 17

1.2.6. KML ve ALL' de *BCR/ABL* Gen Füzyonu, Mutasyonlar ve Sonuçları.....20

1.2.7. KML ve ALL'deki Genetik Anomalileri Tespit Etme Yöntemleri.....24

1.2.8. KML ve ALL'nin Tedavisi ve Genetik Anomaliler ile İlişkisi.....25

2.GEREÇ ve YÖNTEM.....29

2.1. Hasta Seçimi 29

2.2. K562 ve Raji Hücre Hatları ve Kültürleri 29

2.3 Lökosit İzolasyonu 30

2.4. Kandan ve Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu 31

2.5. cDNA Elde Edilmesi 34

2.6. PZR ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm ile Mutasyonların Tespiti 34

2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Kesimi 36

2.8. İstatistiksel Analizler.....37

3. BULGULAR.....38

3.1. Hasta Bulguları 38

3.2. RNA İzolasyonu Bulguları 38

3.3. Hücre Hattı Bulguları 40

3.4. Klasik PZR Bulguları 41

3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP)Bulguları.....43

4. TARTIŞMA.....45

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....51

6. ÖZET.....52

7. SUMMARY.....53

8. KAYNAKLAR.....54

9.ÖZGEÇMİŞ.....61

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

ABL	: Abelson mürin lösemi virüsü
AF	: Akselere faz
AKİT	: Allojenik kök hücre nakli
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
ASO-PCR	: Allel Spesifik Oligonükleotid PCR
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCR	: Kromozom 22'deki kırık nokta toplama bölgesi
BF	: Blast Faz
BKH	: Beyaz Kan Hücresi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FISH	: Fluoresan In Situ Hibridizasyon
HPV	: İnsan papilloma virusü
HTLV	: İnsan T hücresi lösemi/lenfoma virüsü
HTY	: Hematolojik Tam Yanıt
IFN-α	: İnterferon -α
KLL	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
KNL	: Kronik Nötrofilik Lösemi
KSY	: Kısmi Sitogenetik Yanıt

LOH	: Heterozigotluk kaybı
MMY	: Majör Moleküler Yanıt
mRNA	: mesajcı Ribonükleik Asit
mSY	: minor Sitogenetik Yanıt
MSY	: Major Sitogenetik Yanıt
NF1	: Nörofibromatozis tip 1
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
Ph	: Philadelphia
P-loop	: İmatinib bağlanmasını etkileyen bölge
PSA	: Penisilin-Streptomisin-Anfoterisin
Raji	: Burkitt Lenfoma Hücre Hattı
RB	: Retinoblastoma
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
SCF	: Kök hücre faktörü
TBE	: Tris/ Borik Asit / EDTA
THY	: Tam Hematolojik Yanıt
TMY	: Tam Moleküler Yanıt
TSY	: Tam Sitogenetik Yanıt

1.GİRİŞ

1960 yılında Amerika Birleşik Devletlerinin Philadelphia şehrindeki iki araştırmacı Peter Nowell ve David Hungerford tarafından ilk olarak insan kanserlerindeki kromozomal anomali keşfedildi. Bu keşfedilen kromozomal anomaliye ise buldukları şehrin adına atfen Philedelphia (Ph) denildi (Nowell ve ark 1960).

1973 yılında Janet Rowley Ph kromozomunun, kromozom 9'un uzun kolundaki q34 kırık noktası ile kromozom 22'nin q11 kırık noktası arasındaki translokasyon sonucu meydana geldiğini tespit etti (Rowley 1973). 1982 yılında ise Erasmus Üniversitesinde Ph kromozomunu mevcut somatik hücre hibritlerinden aldılar ve insan *ABL* (Abelson mürin lösemi virüsü) probunu somatik hücre hibritlerinden DNA'ya (Deoksiribonükleik Asit) hibridize ederek Ph kromozomundaki *ABL* 'in kromozom 9'dan transloke olduğunu keşfettiler (de Klein ve ark 1982). Kromozom 9'dan 22'ye transloke olan kromozom parçasının oldukça küçük olmasının yanı sıra t(9;22) translokasyonunun resiprokal (dengeli) translokasyon olduğunu ilk kez gösterdiler (de Klein ve ark 1982). Ph kromozomu, KML (Kronik Miyeloid Lösemi) hastalarının yaklaşık %95' inde gözlenmektedir ve p210 (210 kD) proteinini kodlayan *BCR/ABL* füzyon geninin bulunmasıyla karakterize bir lösemi tipidir. *ABL* geninin kırılma noktası ekzon 1'den gerçekleşirken *Bcr* geni üzerindeki kırılma noktası ise değişken olup sonuçta değişik moleküler yapıya sahip füzyon protein kinazları kodlayan füzyon genleri ortaya çıkmaktadır (Wetzler ve ark 1993).

Fizyolojik koşullarda *ABL* proteininin tirozin kinaz aktivitesi N terminalinden sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ancak *BCR/ABL* füzyonunun oluşumu sırasında *BCR* geninin N terminalinin kaybı, kimerik proteinde artmış tirozin kinaz aktivitesine yol açar. *BCR/ABL* proteininin mitoz aktivasyonu ve apoptozis inhibisyonu ile kanser oluşumunu tetiklediği bildirilmektedir. Artan tirozin kinaz aktivitesini engellemek için farklı tedavi yöntemleri ortaya konmuştur. Tirozin kinaz ailesini inhibe eden sentetik ilaçların geliştirilmesi ile hastalık tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Geliştirilen imatinib (STI571 veya Gleevec), dasatinib, nilotinib gibi ilaçlarla tedavi sonrasında hematolojik ve sitogenetik cevap alınmasına rağmen bazı hastalarda

ilaçlara karşı direnç gözlenmektedir. Bu bağlamda *BCR/ABL* gen füzyonunun yanı sıra bu genlerdeki değişiklikler ve mekanizmaların belirlenmesi önem arz etmektedir.

Sonuçta, *BCR/ABL* gen füzyonuna pek çok mekanizma etki etmektedir. İlaçlara direncin moleküler temelinin anlaşılabilmesi için özellikle *BCR ve ABL* genlerindeki mutasyonların araştırılması gerekmektedir (Branford ve ark 2002, Talpaz ve ark 2006).

Planlanan araştırmada da *KML* ve *ALL*' li hastalarda *BCR ve ABL* genlerindeki değişikliklerin (örn. Mutasyonların) araştırılması hedeflenmektedir. En uygun tedavi şeklinin belirlenmesi açısından, *KML* hastalarında direncin erken dönemde tanımlanmasının önemi düşünüldüğünde, mutasyon tipinin belirlenmesiyle, mutasyona uygun tedavi şeklinin planlanmasına katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

1.1.Kanserin Tanımı

XIX. yüzyılda Rudof Virchow (1821-1902) tüm hastalıkların kökeninin hücre olduğunu söylemiştir. Aradan 100 yıl geçtikten sonra modern yöntemlerle hemen her zaman tek bir hücreden ortaya çıktığı; monoklonal olduğu belirlenen kanserin, tek bir hastalık olmayıp, daha çok kitle ya da tümör oluşumuna yol açan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan ciddi hastalıklardan biri olduğu kanıtlanmıştır.

Kanser, latince yengeç anlamına gelmektedir. Yengeç, düşmanını kıstırdıktan sonra uzun, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Tedavi edilmediği takdirde, insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda ölümüne neden olan bu hastalığa bu yüzden kanser adı verilmiştir.

Her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olan kanser, kalp hastalıklarının ardından ikinci büyük ölümcül hastalık grubudur. WHO (Dünya Sağlık Örgütü)' nun verilerine göre insanların dörtte birinin kansere yakalanacağı ifade edilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma ağının (NCCN) 2002 istatistiklerine göre erkeklerin kadınlara nazaran kansere yakalanma oranı daha yüksektir. Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanserler akciğer, prostat, mide ve mesane kanserleri iken kadınlarda en çok meme, mide ve yumurtalık kanseri görülmektedir (Tablo1.1). Tüm kanserlerin %16'sı, tüm kanser ölümlerinin %28'i (erkeklerde %35, kadınlarda %19) akciğer kanseridir. Lösemiler ise tüm kanserlerin %2'sini oluşturmaktadır.

Önlem alınmazsa, dünya genelinde kanserin artarak 2030 yılında 26 milyon yeni tanı konmuş kanser vakasına ve 17 milyon ölüme ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ülkemiz de kanserin son yıllarda hızla arttığı ülkeler arasındadır.

Tablo 1.1. Kadın ve erkeklerde karşılaşılan kanser türleri (saglık.gov.tr 1999).

TÜRKİYE'DE ERKEKLERDE EN ÇOK GÖRÜLEN ON KANSER TÜRÜ,1999			
ORGANLAR	Sayı	%	İNSİDANS (YÜZBİNDE)
	16023	100	48.30
Akciğer	4 707	29,38	14.39
Mide	1 315	8,21	3.96
Mesane	1 165	7,27	3.51
Larenks	900	5,62	2.71
Prostat	836	5,22	2.52
Deri	804	5,02	2.42
Kemik iliği	573	3,58	1,73
Kolon	558	3,48	1.68
Beyin	545	3,40	1.64
Rektum	452	2,81	1.36
Diğerleri	4 169	26,02	12.57

TÜRKİYE'DE KADINLARDA EN ÇOK GÖRÜLEN ON KANSER TÜRÜ,1999			
ORGANLAR	Sayı	%	İNSİDANS (YÜZBİNDE)
	9.919	100	30.38
Meme	2.390	24,1	7.32
Mide	693	6,99	2.12
Deri	684	6,90	2.10
Yumurtalık	556	5,61	1.70
Kolon	419	4,22	1.28
Akciğer	404	4,07	1.24
Kemik iliği	391	3,94	1.20
Rektum	381	3,84	1.17
Beyin	349	3,52	1.07
Serviks	310	3,13	0,95
Diğerleri	3342	33,69	10.24

İlk olarak İngiltere'de 1715 yılında Sir Percivall Pott'un baca temizleyicilerinde "skrotum" adı verilen erbezi torbası kanserlerinin sık görüldüğünü bildirmesi ile kimyasal ajanların kansere yol açabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. Bugün için kansere yol açtığı bilinen binlerce kimyasal ve fiziksel madde tanımlanmıştır.

Kanser gelişmesini tetikleyen ajanların bir diğer grubunu ise mikroorganizmalar ve viral ajanlar oluşturmaktadır. İnsanlarda özellikle "*hepatit B ve C*" virüslerinin karaciğer kanserine, "*İnsan papilloma virusünün (HPV)*" rahim ağzı kanserine yol açtığı kesin olarak bilinmektedir. Virüslerin dışında bakterilerin, özellikle ülser bakterisi olarak bilinen "*Helikobakter pilori*" mide kanseri ve "*şistozoma*" adı verilen bir parazitin de "mesane" kanseri riskini arttırdığı iyi bilinen örneklerdendir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. İnsanda kanser mekanizmalarını tetikleyen bazı ajanlar (karsinojenler) (tuba.gov.tr 2009).

Karsinojenler	Hedef Organlar
Kimyasal karsinojenler	
Aflatoksin	Karaciğer
Arsenik	Cilt, akciğer
Asbest	Akciğer, plevra
Benzen	Kemik iliği
Benzidil	Mesane
Benzapiren	Cilt, akciğer
Kadmiyum	Prostat, akciğer
Mustard gazı	Akciğer
Vinil klorür	Karaciğer, akciğer, beyin
Nikel bileşikleri	Akciğer, nazal kavite
Sigara	Pek çok organ
Alkollü içecekler	Ağız, özefagus, pankreas, karaciğer
Tütsülenmiş ve salamura yiyecekler	Gastrointestinal sistem
Fazla yağ tüketimi	Kolon, meme
Fiziksel karsinojenler	
Iyonlaştırıcı Radyasyon	Kemik iliği, Gastrointestinal sistem, akciğer, meme, yumurtalık mesane
Ultraviyole	Cilt
Mineral lifleri (asbest vb)	Akciğer zarı, akciğer, kanın zarı
Elektrik ve manyetik alanlar	Beyin
Virüsler-Bakteriler-Parazitler	
Insan papilloma virüsü (HPV)	Rahim
Hepatit B	Karaciğer
Hepatit C	Karaciğer
Insan T-hücreli lösemi/lenfoma virüsü (HTLV-1)	Kemik iliği, lenf düğümleri
EBV	Burkitt Lenfoma, Hodgkin L. vs.
Insan Immün Yetmezlik virüsü (HIV)	Lenf düğümleri, damar
Epstein-Barr virüsü	Lanf düğümleri
Insan Herpesvirüs Tip 8	Damar
Helikobakter pilori	Mide
Şistozoma	Mesane

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kanserlerin yaklaşık %80' inin mesleki veya çevresel etmenlere bağlı olabileceğini tahmin etmektedir (Yasavul 2003). Kansere yol açan çevresel faktörlerin bir kısmından korunulabileceğine dair birçok kanıt mevcuttur. Bazı ülkelerde sık görülen kanserler bazı ülkelerde çok nadir sıklıkta da görülebilmektedir. Örneğin, rahim boynu kanserinin Brezilya'da görülme sıklığı %83 iken İsrail için bu oran %3'e düşmektedir (Alberts ve ark 2008). Bu da kanser görülme riskinin radyasyon, ultraviyole gibi çevresel faktörlere göre değiştiğinin bir kanıtıdır.

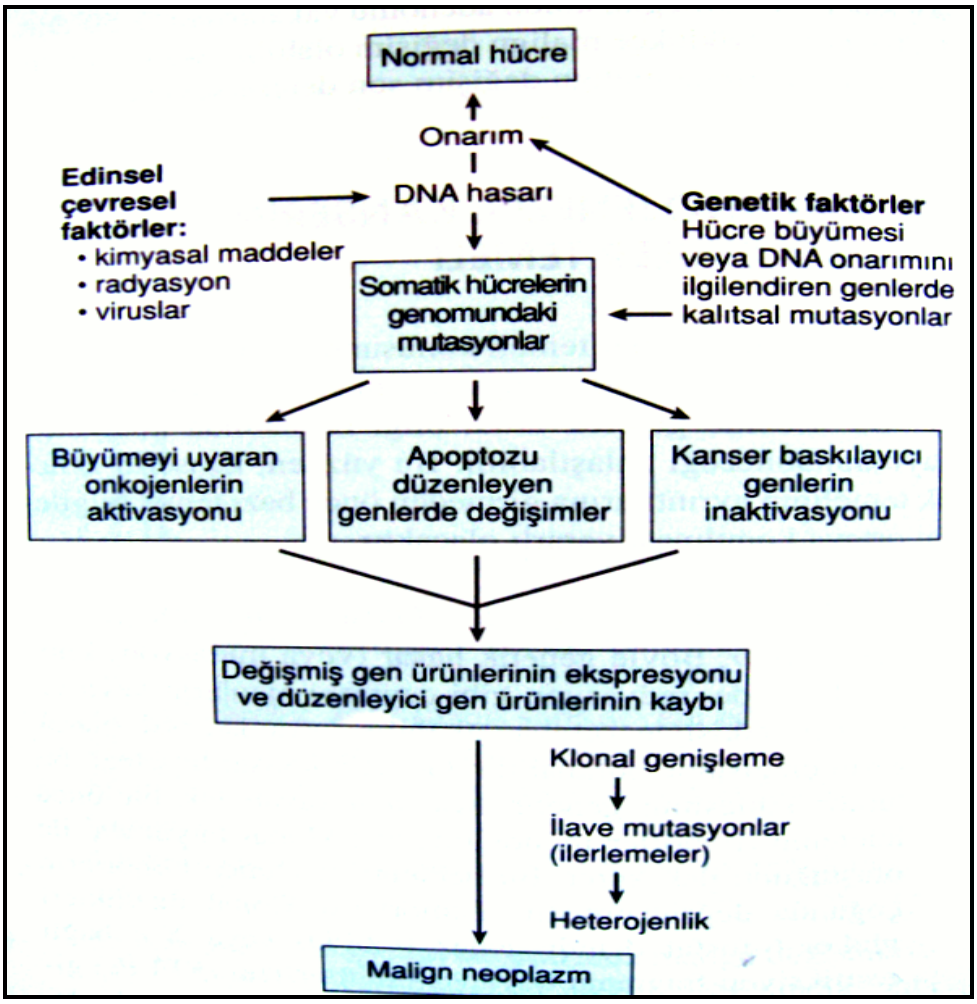
Kanser sadece ölüm nedenlerinden biri olmayıp aynı zamanda kişinin hayat kalitesini düşüren, iş gücü kaybına neden olan bir hastalıktır. Bunlara ek olarak teşhis ve tedavi maliyeti en yüksek hastalıklardandır. Her yıl yüz binlerce kişinin ölümüne neden olan her bir kanser tipinin mekanizmalarını araştıran yüzlerce çalışma yapılmasına rağmen henüz hastalığı yenebilecek etkili bir tedavi geliştirilememiştir.

1.1.1. Kanserin Moleküler Biyolojisi

Yaşamın ve canlılığın en temel birimi olan hücrenin, iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyal iletim sistemleri, normal hücrelerde kontrollü bölünmeyi sağlarken, kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünmeye yardımcı olur.

Kanserleşme sürecindeki ilk basamak olan hızlı ve kontrolsüz bölünme kanserin en temel özelliklerindendir. Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç), ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların (vücut içi ve dışındaki) onarılması amacıyla bölünebilme yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar.

Eğer öncül (kanserleşen ilk hücre) olarak tanımlanan tek bir hücrenin çoğalması hücrenin kontrol sistemi dışına çıkarsa, bu hücreler bir tümör (neoplazma) oluştururlar. Tümör gelişimi çok sayıda ardışık mutasyon ve doğal seçilimle seyreder. Kanserleşme yoluna giren öncül hücreden köken alan hücre klonlarında, oluşan farklı mutasyonlar belli bir süre sonra tümör populasyonunda baskın hale gelir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Karsinogenez mekanizması (Alberts ve ark 2008).

Başlangıç bölgeleriyle sınırlı kalan ve yavaş çoğalan hücrelerden oluşan tümörlere benign tümörler denir. Bu tümörler cerrahi olarak tedavi edilebilir. Ama oluşan birincil tümör (primer tümör-kanser), çevre dokuların içine doğru yayılım gösterebilir. Ayrıca kan dolaşımına veya lenfatik sisteme geçen tümör hücreleri diğer dokulara yayılım göstererek (metastaz) ikincil tümörler oluştururlarsa bu tümörlere malign tümörler denir (Joensuu ve ark 2001, Fröhling ve ark 2008).

1.1.2.Kanserin Genetik Temeli

Her bir hastalığın değişen oranlarda genetik temelinin olduğuna inanılmaktadır. Bunlardan kanser hastalığında 2007 Mayıs ayına kadar etkisi ispatlanmış gen sayısı 421 iken aday gen sayısı ise 6251 olarak gösterilmiştir (Fröhling ve ark 2008).

Genomik yapının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmalar aktiftir. Diğer taraftan tamir mekanizmasından sorumlu ürünleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar tamir edilemediği için birikerek kansere çok genetik anomalili yapı kazandırarak yaygınlaşır.

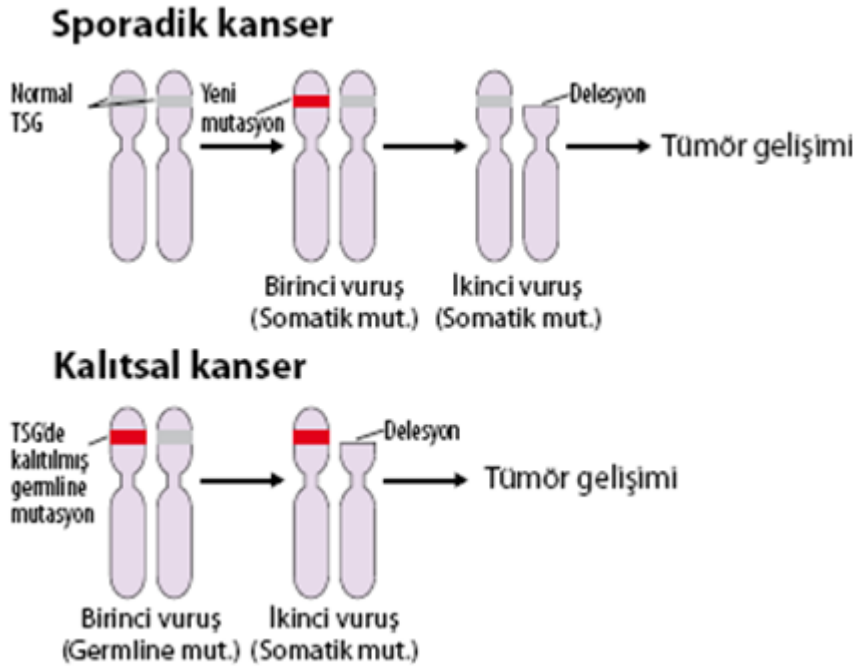
Genomdaki her mutasyon kansere yol açmaz ama bazı genler üzerindeki mutasyonlar kanserle sonuçlanır. Kanser belirleyici genler iki ana grupta incelenebilir. Bunlar; protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir.

Onkogenlerin mutasyona uğramamış olarak organizmada bulunan haline protoonkogen denir. Protoonkogenler normalde hücre bölünmesini uyaran genlerdir. Protoonkogenler onkogenlere dönüştüklerinde hücre bölünmesi üzerine olan etkileri değişir ve kontrolsüz hücre bölünmesini başlatırlar. Onkogenler viral (v-onkogen) ya da hücresel (c-onkogen) olabilirler. Özellikle hücre döngüsü üzerinde etkili olup hücre döngüsünü düzenleyen genlerin işlevini bozarak etki ederler. Bu genlerde ortaya çıkan genetik değişiklikler fonksiyon kazandırıcı mutasyonlardır. Tek bir allelde gerçekleşen mutasyon hücrenin fenotipinde hemen kendisini göstermesi nedeni ile protoonkogenleri onkogenlere dönüştüren mutasyonlar dominanttır. Bu nedenle, bir onkogen her zaman bir protoonkogen karşısında fenotipik etki bakımından baskındır.

Onkogenlerin etkileri hemen ortaya çıktığı için tümör baskılayıcı genlere nazaran tespit etmek daha kolaydır. Araştırmalarda bazı virüslerin hayvanlarda kansere sebep olduğu görülmüş, bu virüsler izole edilerek DNA dizi analizleri yapılmış ve bu virüslerin dizilimleri ile karşılaştırarak protoonkogenler tespit edilmiştir. Ayrıca tümör dokularından izole edilen DNA uygun boyutlarda viral vektörlere yüklenerek fibroblastlara transfeksiyon ile aktarılmış ve fibroblast hücre kültürlerinde ortaya çıkan etki değerlendirilmiştir. İlgili onkogenler tespit edilerek dizi analizleri yapılmış ve genomdaki protoonkogenlerde ortaya çıkan mutasyonlar tespit edilmiştir.

Tümör baskılayıcı genler ise onkogenlerin aksine, hücre büyümesi ve çoğalması üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir ve etkileri resesiftir, yani fenotipik değişikliğe yol açabilmesi için iki allelde birden mutasyon olması gereklidir. Tümör baskılayıcı gen ürünleri, hücredeki hasarı tespit ederek hücrenin kontrolsüz ve programsız bir şekilde çoğalmasını önlemek için bölünmenin başlangıcında hücrenin bölünmesini durdurup mutasyonun tamir edilmesi için çalışır, tamir edemez ise mutasyona uğramış hücreyi apoptoza gitmesi için uyarır (Georges ve ark 2008).

Tümör baskılayıcı genleri tespit etmek onkogenlere nazaran oldukça zordur. Tümör baskılayıcı genleri tespit etmek için malign hücreler normal hücrelerle hibritleştirilmiş ve bu hücrelerin malignitelerini kaybettikleri görülmüştür. Tümör baskılayıcı genlerin kalıtım modelinin belirlenmesine yardımcı olan hipotezlerden bir tanesi de Knudson' ın çift vuruş (two hit) hipotezidir. Alfred Knudson tarafından 1971 yılında ileri sürülen hipoteze göre, ilk keşfedilen tümör baskılayıcı gen olan retinoblastoma (RB) gelişebilmesi için RB geninde iki ayrı mutasyon gerekmektedir. Bu hipotez günümüzde ailesel meme kanseri, nörofibromatozis tip 1 (NF1), kalıtsal nonpolipozis kolon karsinomu ve Li-Fraumeni sendromu gibi pek çok ailesel kanser için model kabul edilmektedir. Bu hücrelerde fonksiyonel tümör baskılayıcı genin kopyası kalıtımsal olarak zaten mutasyona uğrayıp gelmişse, diğer normal allelin fonksiyonunun da sonradan kaybolmasına heterozigotluk kaybı (LOH) denir ve tümör baskılayıcı genin baskılama yeteneği ortadan kalkar (Robert ve ark 2005) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Knudson'ın çift vuruş hipotezi (Albert ve ark 2008).

Son yıllarda kanser etiyolojisi üzerinde yapılan çalışmalar ile genomik yeniden düzenlenmeler ve mutasyonların dışında epigenetik değişikliklerin önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Bunlardan DNA metilasyonu veya histon modifikasyonunun ve kromatin tekrar modellenmesi en önemlileri olarak gösterilmiştir (Lechner ve ark 2010).

1.2. Kanserin Sınıflandırılması

Kanserler, ortaya çıktıkları organa veya köken aldıkları hücre-doku tipine göre sınıflandırılır. Organlara göre akciğer, mide, cilt kanseri gibi isimler alırken, hücre tipine göre karsinom, sarkom, lösemi ve lenfoma gibi ana başlıklar altında adlandırılır. Sonuçta; mide adenokarsinomu, akciğer küçük hücreli karsinomu, kemik sarkomu gibi tanımlandırılır.

Her kanser tipi orijinini aldığı hücreyi yansıtacak karakteristik özellikler gösterir. Örneğin: bazal hücreli karsinoma derinin keratinosit kök hücrelerinden gelişir ve sitokeratin hazırlık flamentler sentezlemeye devam eder. Melanomalar ise derinin pigment hücrelerinden köken alırlar ve oluştukları dokuda pigment molekülleri yapmaya devam ederler. Patolojik tanı koymada bu özelliklerden yararlanılır.

1.2.1.Lösemiler

Kan kanseri anlamına gelen lösemi terimi latince leukos (beyaz) ve haima (kan) sözcüklerinden türetilmiştir ve akyuvarlar açısından zengin kan anlamına gelir.

Lösemiler tam olarak sebebi bilinmemekle birlikte kan hücrelerinin özellikle de lökositlerin normalin üzerinde çoğalması ile kendini gösteren, vücuttaki kan üretim sistemini (lenfatik sistem ve kemik iliği) etkileyen bir kanser türüdür. Afrika ve uzakdoğu kökenlilere göre beyaz ırkta iki kat daha sıklıkla rastlanan lösemi 10 yaş altı ve 50 yaş üzerindeki insanlarda daha sıklıkla görülür.

Lösemide, yüksek sayıdaki olgunlaşmamış ve malign hücreler normal kemik iliği hücrelerinin yerini alır ve iliklerde hasar meydana gelir. Bu nedenle kan pıhtılaşmasında rol oynayan plateletler ve savunmada rol oynayan lökositlerin sayısı azalmaya başlar ve sonunda lösemi hastalarında zedelenmelerin ve kanamaların yoğun görülmesine neden olur. Hastaların savunma mekanizması zayıflar ve enfeksiyon riski artar.

1.2.2.Lösemilerin Etiyolojisi

Lösemilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte diğer kanserler gibi lösemilerin de multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir. İyonize edici ışınlar, kimyasal karsinojenler, infeksiyöz ajanlar ve genetik faktörler etiyolojiden sorumlu tutulan faktörlerdir (Robinson 1987).

Radyasyonun etiyolojideki rolü, tanı ve tedavi amacıyla ışın alan ya da atom bombasının etkisinde kalan bireylerin incelenmesiyle ortaya konmuştur (Gralnick 1997). Hiroşima ve Nagazaki'de atom bombalarından hayatta kalanlar en çok gama ışınlarına maruz kalmışlardır. Bu insanlar arasında lösemi, meme kanseri, tiroit kanseri ve diğer birçok malignite riskinde doza bağlı artışlar gözlenmiştir. Aynı maligniteler için X-ışını ve gama ışınları ile tedavi görmüş kanser hastaları arasında da frekans artışı gözlenmiştir. X-ışınlarına veya gama ışınlarına maruz kalma sonrasında kanser riski seviyesi, radyasyon dozuna ek olarak birkaç faktöre göre değişmektedir. Bu faktörler arasında maruziyetin meydana geldiği yaş, radyasyonun

alındığı sürenin uzunluğu ve maruz kalan kişinin cinsiyeti de yer almaktadır. Yüksek dozda radyasyona maruz kalma, lösemi riskini beş kattan fazla artırmaktadır (Vrijheid ve ark 2007).

Genelde kişilerin maruz kalacağı radyasyona en büyük katkı tıbbi X ışınlarından ve radyofarmasötiklerin kullanımından, silah testlerinin neden olduğu düşük dozlardaki serpintilerden, nükleer kazalardan (Çernobil'deki gibi) ve nükleer tesislerden kazara ve rutin olarak salınan radyasyondan kaynaklanmaktadır. Çernobil nükleer kazasının ardından 20 yılı aşkın bir süre geçmiştir ve 2065 yılına kadar bu kaza nedeniyle Avrupa'da 16.000 tiroid kanseri vakası ve 28.000 başka kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir. Tıbbi olarak maruz kalma hem hastalıkların ve yaralanmaların teşhisinde (örneğin radyografi) hem de kanser ve diğer bazı benign hastalıkların tedavisinde (örneğin radyoterapi) gerçekleşmektedir. İyonlaştırıcı radyasyona mesleki olarak maruz kalınması nükleer sanayi ve tıp da dahil olmak üzere pek çok meslekte görülmektedir. Kanserle ilgili ölümlerin %1–2' sinin iş sırasında düşük dozda ve uzun süreli maruz kalınan radyasyona atfedilebilir olduğu belirtilmiştir (Cardis ve ark 2005) Lösemi dışında, en önemli ilişki akciğer kanserinde ve multiple miyelomda görülmüştür (Vrijheid ve ark 2007).

Kimyasal karsinojenlerden benzenin erişkin lösemilerinin etiyolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir (Gralnick 1997). Günümüzde en çok viral etiyoloji üzerinde durulmaktadır. Dünya genelinde kanserlerin takriben %15-20' si enfeksiyon yapıcı ajanlara bağlanabilir. Ancak bu oran, kaynakları düşük seviyedeki ülkelerde (%26) gelişmiş ülkelere (%8) oranla daha yüksektir. Belirli enfeksiyon ajanlarının tetiklediği yaygın kanserler arasında insan T hücresi lösemi/lenfoma virüsü (HTLV) ile ilişkilendirilen lösemi de sayılabilir. Dünya genelinde kanser vakalarının %0.1' inden sorumlu HTLV1, karsinogenezde hücre döngüsünün, telomer/telomeraz sisteminin, hücre ölümünün ve diğer hücresel süreçlerin düzenlenmesini değiştirerek hızlandıran onkoproteini kodlayarak doğrudan bir rol oynar. Kanser etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen virüsler: Retrovirüsler, EBV (endemik Burkitt, nasofarengeal Ca), HTLV-I (İnsan T hücreli lösemi virüsü), HTLV-II (Hairy cell lösemi)' dir (Raza ve ark 2007).

Genetik faktörlerin de lösemi etiyolojisindeki rolünü açıklayan pek çok çalışma yapılmıştır. Mongollarda lösemi insidansı normale göre 20 kat fazladır. Fankoni anemisinde, Bloom sendromunda ve Ataksia telenjiektazilerde lösemi insidansı yüksektir ve bu hastalıkların hepsinde genomda bozukluklar görülmektedir (Müftüoğlu 1986).

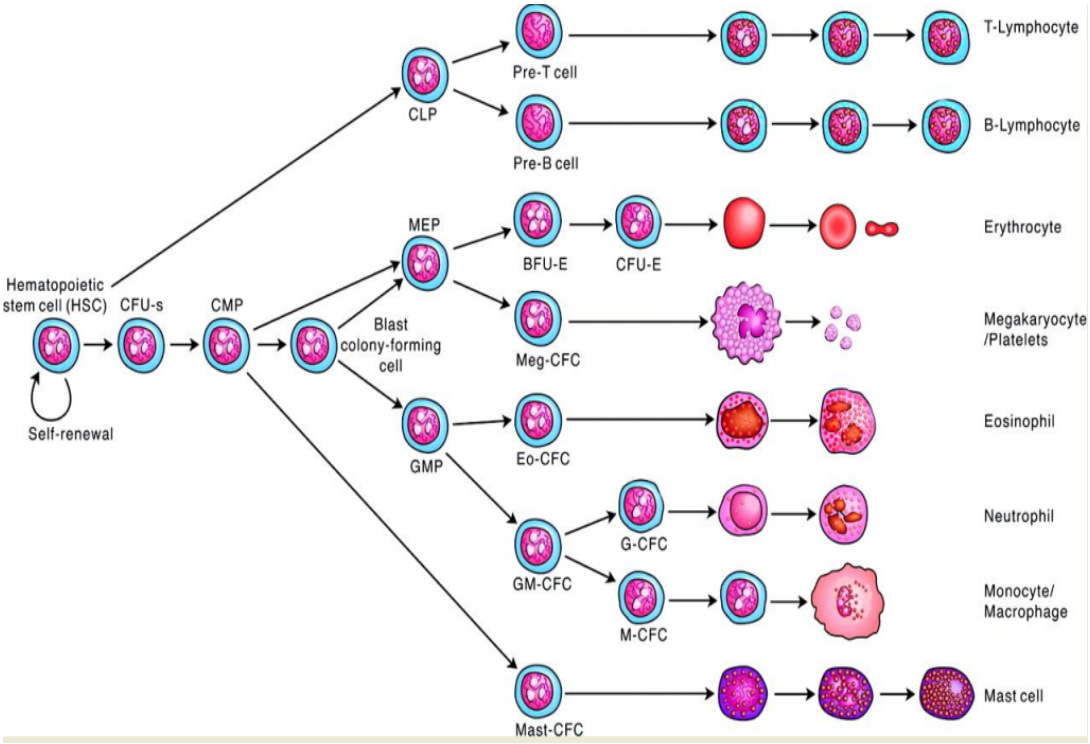
Pek çok kanser kemoterapi ilacı, DNA ile etkileşim içine girmekte ve normal hücrelerde hasar ile sonuçlanabilmektedir. Kemoterapi tedavisi ile bağlantılı en önemli neoplazma lösemidir. Buna karşın karaciğer, serviks veya cilt kanserleri gibi seçilmiş solid tümörlerin ve özellikle virüslerle ilgili olan tümörlerin riski de artabilmektedir.

1.2.3.Lösemilerin Sınıflandırılması

Lösemi**,** vücuttaki kan yapım sistemini etkileyen ve kan hücrelerinin özellikle de lökositlerin normalin üzerinde çoğalmasıyla ortaya çıkan kanser türüdür. Genel olarak lösemiler tüm kanserlerin %2 sini oluştururlar. Çok sayıda olgunlaşmamış ve malign hücrenin normal kemik iliği hücrelerinin yerini alması ile kemik iliğinde hasar meydana gelir. Böylece kan pıhtılaşmasında rol oynayan trombositlerin ve savunmada rol oynayan lökositlerin sayısı azalır veya normal olur. Bazen de sayı aşırı artar ve lökositler görevini yapamaz.

Yetişkinlerde lösemi tanısı konma sıklığı çocuklardan 10 kat daha fazladır ve risk yaşla birlikte artmaktadır. Çocuklar arasında ise 5 yaş altında daha sık gözlenir. En sık olarak 2-5 yaşlarında görülürler. Tüm çocukluk yaş grubu kanserlerinin % 25-30'unu lösemiler oluştururlar (National Cancer Institüe 2010).

Lösemilerin akut ve kronik olmak üzere iki ana tipi olup etkilenen hücrenin tipine göre miyeloid ve lenfoid olarak kendi içinde de ikiye ayrılır (Şekil 1.3). Akut lösemi (birden ortaya çıkan hızla ilerleyen) akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut myeloid lösemi (AML) olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır. Kronik lösemi ise daha yavaş seyirli, hastayı birden kötüleştirmeyen tiptir. Kronik miyeloid lösemi (KML) ve kronik lenfoblastik lösemi (KLL) olmak üzere iki ana tipi içermektedir.



Şekil 1.3. Hematopoietik kök hücre oluşumu (tuba.gov.tr 2010).

Akut lösemide kanda lökosit sayısı düşük, normal ya da yüksek olabilirken kronik lösemide kanda lökosit sayısı genellikle artmaktadır. Akut lösemilerin sınıflandırılması temel olarak olgunlaşmayan hücrelerin tipleri esas alınarak yapılır. Kronik lösemiler ise, görünüşte olgun ancak normal olgun kan hücrelerinin yaptıklarını yapamayan kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterizedir.

1.2.4. KML ve ALL' nin Genel Özellikleri

Akut lenfoblastik lösemi(ALL) lenfoblastların anormal bir şekilde kontrolsüz ve aşırı çoğalmasıyla meydana gelir. Lenfoblastlar kemik iliğinde çoğalır ve buradan kana ve beyin-omurilik gibi diğer organlara geçerler. Lenfoblastların olgun hücreler (lenfosit) meydana getirememeleri nedeniyle bağışıklık sistemi bozulur. Biriken lenfoblastlar eritrosit, granülosit ve trombosit gibi diğer olgun hücrelerin yapılmasını da etkilerler. Bu nedenle kansızlık, lökopeni ve trombositopeni meydana gelir. ALL, en sık gözlenen çocukluk çağı kanseridir ve 15 yaş altındaki çocuklarda gözlenen lösemilerin %80' i ALL'dir. Bazen yetişkinlerde de görülebilmekle birlikte, 50 yaşın üzerinde ALL son derece nadirdir.

Erken döneme ait belirtiler genelde gözden kaçmaktadır çünkü bu dönemdeki şikayetler nezle veya diğer sık gözlenen hastalık şikayetlerine benzer. Halsizlik, nefes darlığı, eritrositlerin eksikliğinden kaynaklanan solgun görünüm, lökositlerin eksikliğinden dolayı sık sık enfeksiyona yakalanma, trombosit eksikliğinden kaynaklanan kesiklerin çok güç iyileşmesi görülebilir.

Hastaya tam bir ALL tanısı, hastadan alınan kan ve kemik iliği örnekleri mikroskop altında incelendiğinde ve çok sayıda blast oluşumu gözlemlendiğinde konulabilir. Görülen hücrelerin %70-95'ini blast hücreleri oluşturur. Megakaryositlerde de azalma vardır. Daha sonra yapılan kemik iliği sonuçları ile tanı kesinleşmiş olur.

Akut lösemilerde tedavinin amacı, remisyona getirmek ve bunu idame ederek mümkünse hastalığı tamamen ortadan kaldırmaktır. Bununla birlikte hastalık yeniden ortaya çıktığında (relaps) tekrar iyileşmesini (remisyon) sağlamak için tedavi protokolleri uygulanmaktadır. ALL hastalarının tedavisinde hastalığın teşhisinden itibaren hemen kemoterapi uygulaması başlatılmalıdır. Kemoterapide amaç normal kan hücrelerinin üretimini onarma ve hastada remisyon elde edilmesidir. Tedavide hangi ilaçların kullanılacağı hastanın yaşı, kanda bulunan lösemi hücrelerinin sayısı ve tipi gibi faktörlere dayanarak belirlenir. Kemoterapötik ilaçlar lösemi hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek öldürür. Ne yazık ki kemoterapi sağlıklı hücrelerin de ölümüne yol açar, bu nedenle ALL hastalarında bulantı, halsizlik, yüksek enfeksiyon riski gibi yan etkiler görülür. Hastalığın tekrar nüks etmesi durumunda kök hücre transplantasyonuna başvurulur. Şu an nakillerde kullanılan kök hücreler kemik iliği, kordon kanı ve periferik kandan elde edilmektedir. İki tip kök hücre transplantasyonu söz konusudur ve ikisi de ALL tedavisindekullanılmaktadır:

1.Otolog kök hücre transplantasyonunda hastanın kendi kök hücreleri kullanılmaktadır.

2.Allojenik kök hücre nakillerinde ise bir vericiden alınan kök hücreleri kullanılmaktadır.

Otolog kök hücre nakillerinde, hastanın kemik iliğinden kök hücreler toplanır ve dondurulur. Yüksek doz kemoterapi ve/veya radyoterapiden sonra kök hücreler hastaya geri verilir. Her ne kadar bazı ALL hastalarında otolog nakil yapılsa da allojenik nakiller tercih edilmektedir. Çünkü otolog nakil sonrası relaps görülme sıklığı yüksektir (Müftüoğlu 1986)

Kronik miyeloid lösemi (KML) ise pluripotent hematopoietik kök hücrenin malign transformasyonuyla oluşan klonal bir bozukluktur (Faderl ve ark 1999). KML, yetişkinlerde tüm lösemilerin yaklaşık %20'sini oluşturur. Genellikle orta ve ileri yaşlarda görülür. KML, üç fazlı bir hastalıktır. KML'nin klinikopatolojik seyri; (1)Kronik Faz (KF), (2)Akselere Faz (AF) ve (3) Blast Faz (BF) dır.

KML hastalarının çoğuna lökosit veya plateletlerin sayıca artışıyla ve kemik iliğindeki blast sayısının %10'dan daha az olmasıyla kronik fazda tanı konulur. Akselere faz ise %10-30 blast sayısındaki artışla ve trombositopeni ile belirlenebilir. Blast fazda kemik iliği ve kandaki blast sayısı %30'dan fazladır. Tipik olarak bu hastalık birkaç yılda kronik fazdan akselere faza ve tedaviye yanıt alınamazsa veya farkedilemezse hızlı bir şekilde blast faza ilerler (Goldman 2003). Hastalık blastik faza ilerlediğinde vakaların yaklaşık %85'inde ek kromozomal anomaliler geliştiği bilinmektedir. Klonal evulüsyon esnasında en sık gözlenen ilave anomaliler; trizomi 8, trizomi17, izokromozom i(17)(q10), ilave Ph kromozomu (+der(22)t(9;22)) ve trizomi 19 dur. KML tanısı alan hastaların ortalama yaşı 65 iken ALL de bu rakam 13'e düşmektedir (SEER Cancer Statistics Review 2007).

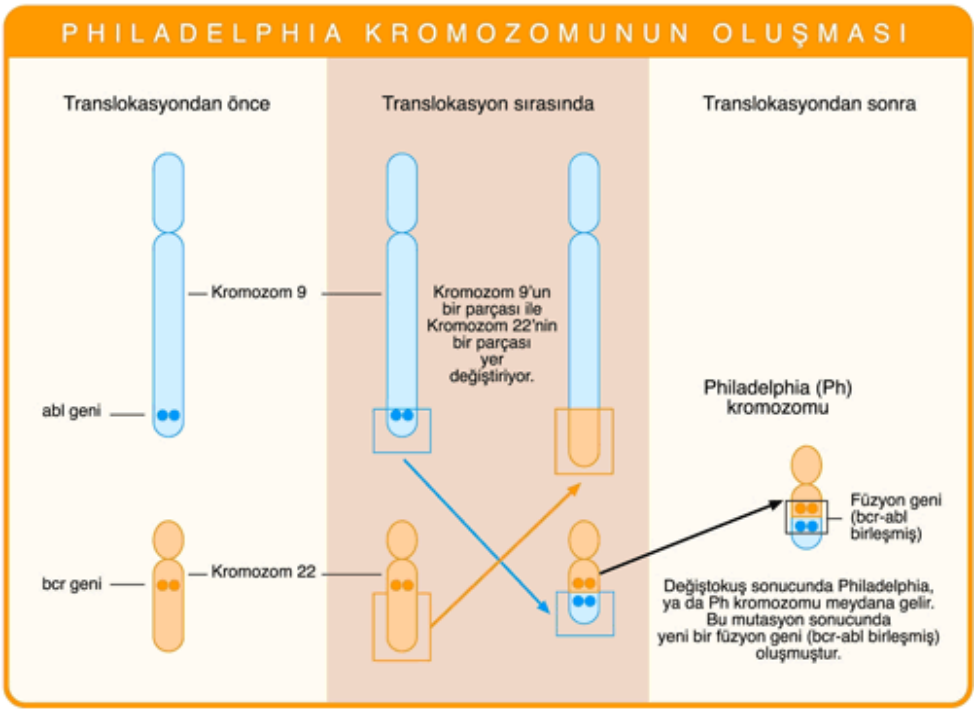
Olgunlaşmış ve olgunlaşmakta olan lökositlerin (miyelosit ve nötrofiller) anormal derecede yüksek sayılarda gözlemlenmesi KML tanısında ilk adımı oluşturur. Beyaz küre sayısı artmış olup 100000'in üstünde olması olağandır. Tanının doğrulanması hastaların %95' inde Ph kromozomunun olması ile sağlanır. KML hastalarının fizik muayenesinde %50-90'ında splenomegali (dalak büyümesi), %10-20'unda hepatomegali (karaciğer büyümesi) gözlenir.

KML tedavisinde öncelikle lökosit sayısı azaltılmalı ve daha sonra da küratif tedaviye geçilmelidir. Hücre azaltılmasına yönelik yaklaşım lökosit sayısının kontrolünün yanı sıra, splenomegalinin neden olduğu semptom ve bulguların giderilmesi ve metabolik komplikasyonların düzeltilmesini içerir.

KML'de tedaviye yanıt kriterleri klinik, hematolojik ve sitogenetik düzeyde değerlendirilir. Klinik tam yanıt KML'nin neden olduğu semptom ve bulguların kaybolması, hematolojik tam yanıt (HTY) dolaşımda lökosit sayısı $<10x10^3/mm^3$, trombosit sayısı $<450x10^3/mm^3$, miyeloid öncü hücre olmaması ve dalağın palpe edilmemesidir. Sitogenetik yanıt ise geleneksel sitogenetik yöntem ile Ph kromozomunun görünmemesi (% 0) tam (TSY), % 1-34 kısmi (KSY) ve % 35-65 ise minor sitogenetik yanıt (mSY) olarak değerlendirilir. Tam ve kısmi yanıt birlikte major sitogenetik yanıt (MSY) olarak adlandırılır. Moleküler sitogenetik (FISH) ve moleküler yanıt ise sitogenetiğe nazaran daha hasas yanıtlar olarak kabul edilmektedir. Moleküler yanıt ise major moleküler ve tam moleküler yanıt olarak isimlendiriliyor. Tam moleküler yanıt (TMY), RT- PCR veya "nested" PCR yöntemi kullanıldığında ardışık iki ölçüm ile BCR-ABL kimerik mRNA'sının (10^3 duyarlılığında) saptanmamasıdır. Majör moleküler yanıt (MMY) ise BCR-ABL/ABL oranının uluslararası ölçeğe göre ≤ % 0,1 olmasıdır.

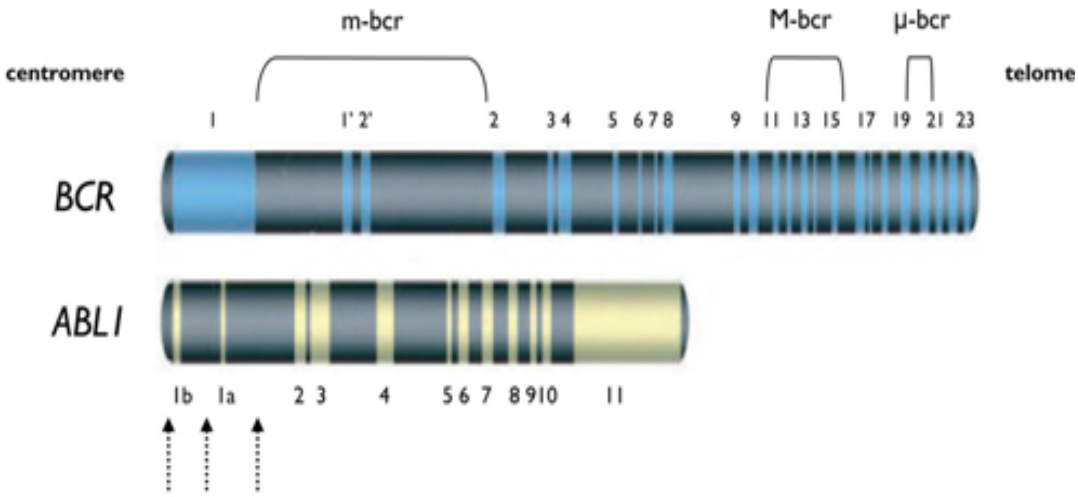
1.2.5. KML ve ALL'nin Genetik Temeli

Sitogenetikte KML, t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluşan Ph kromozomu ile karakterizedir. Adını, farelerde lösemiye neden olan ve viral onkogen v-*ABL* içeren abelson virüsünden alan kromozom 9'daki *ABL* geni ile kromozom 22 deki kırık nokta toplama bölgesinin *(BCR*) resiprokal translokasyonu sonucu hematopoietik hücre survisini ve gelişimini etkileyen, nükleer sinyal transdüksiyon yolaklarını ve sitoplazmanın sayısını anormal bir şekilde artıran tirozin kinaz aktivitesine sahip kimerik *BCR/ABL* füzyon proteini üretilir (Heisterkamp ve ark 1983, Lugo ve ark 1990) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Philadelphia Kromozomunun Oluşumu (turkkanser.org.tr 2010).

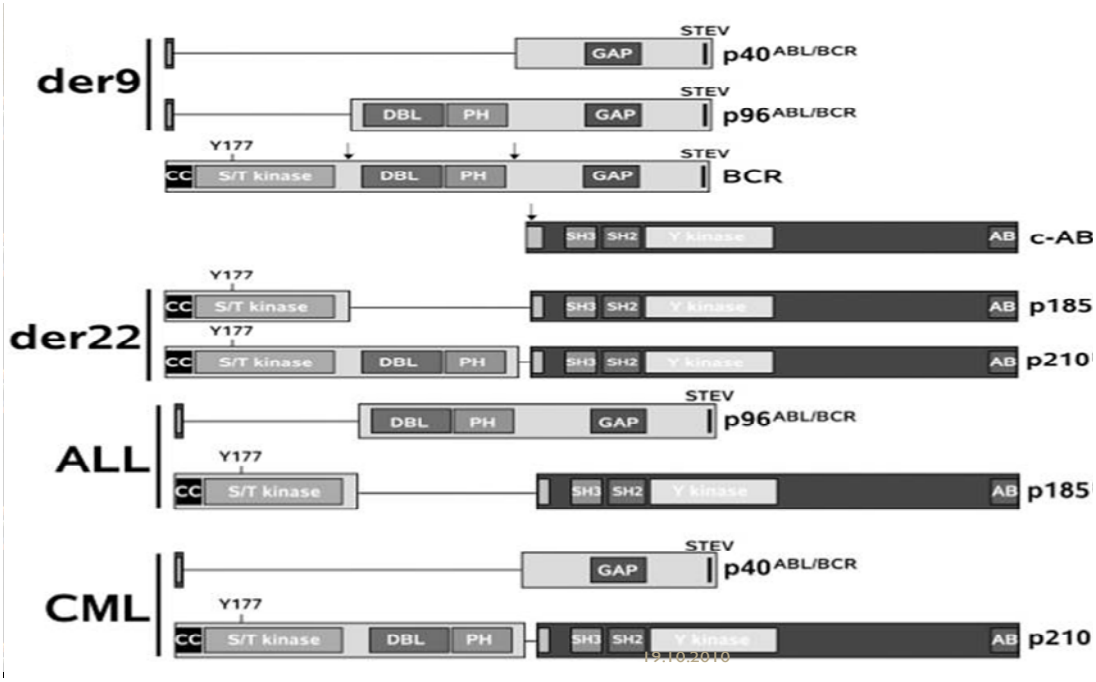
BCR geni 23 ekzondan meydana gelir ve üç ana kırık nokta toplama bölgesine sahiptir (M-bcr, m-bcr, µ-bcr). *BCR* geninin kırılma noktasına bağlı olarak oluşan füzyon genin büyüklüğü de 190 kDa (bazı kaynaklarda 185 kDa da deniliyor) ile 210 kDa arasında değişebilir (Sawyers ve ark 1999, Quintas-Cardama ve ark 2009)(Şekil1.5).



Şekil 1.5. *BCR* ve *ABL* genlerinin kırılma noktaları (Quintas-Cardama ve ark 2009).

KML hastalarında ve Ph+ B hücreli ALL hastalarının üçte birinde M-*BCR* (major breakpoint cluster region) olarak bilinen 5.8 kb' lık bir bölge kodlanır. Alternatif splicing ile ya b3a2 ya da b2a2 mRNA'nın (mesajcı Ribonükleik Asit) transkribe olduğu 210 kDa'luk bir füzyon protein meydana gelir (Fainstein ve ark 1987, Sattler ve ark 2003).

Ph+ B hücreli ALL hastalarının üçte ikisinde ve nadiren KML'li bazı vakalarda ise 190 kDa'luk kimerik füzyon proteini oluşur. Bu bölge m-*BCR* (minor breakpoint cluster region) olarak da bilinir. Üçüncü kırık nokta toplama bölgesi ise 230 kDa füzyon proteinine neden olan ve kronik nötrofilik lösemide (KNL) görülen µ-*BCR*'dır (Faderl ve ark 1999, Quintas-Cardama ve ark 2009) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. *BCR/ABL* füzyonu sonucu oluşan füzyon proteinleri (Zheng ve ark 2009).

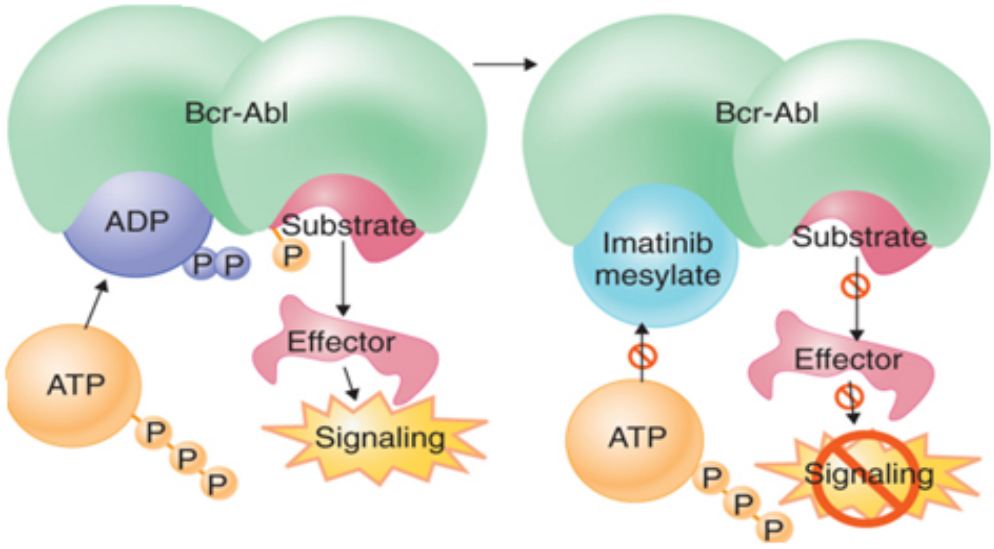
Ph kromozomu yetişkin KML hastalarının %90'ında, çocukların %5 'inde, yetişkin Akut Lenfoblastik Lösemili (ALL) hastaların %15-30'unda ve Akut Miyeloid Lösemili (AML) hastaların %2 'sinde bulunur. Nadiren klasik sitogenetik inceleme ile Ph kromozomu ortaya konulamaz (<%5). Bu olgularda moleküler incelemeler ile translokasyonun ürünü olan *BCR/ABL* kimerik proteini ortaya konulabilir. Hastaların % 1'inden azında ise Ph kromozomu yoktur, ancak moleküler olarak BCR/ABL füzyonu görülür. Bu Ph(-) KML veya atipik KML olarak adlandırılır, hastalık daha agresif seyreder.

1.2.6. KML ve ALL' de *BCR/ABL* Gen Füzyonu, Mutasyonlar ve Sonuçları

Kromozomal translokasyonlar, çoğu zaman, bir transkripsiyon faktörü ya da tirozin kinaz yapısındaki reseptörü kodlayan bir genin başka bir genomik dizi ile füzyona uğramasına yol açmaktadırlar. Bunun sonucu olarak oluşan yeni genin ürünü onkojenik özellikler gösteren bir kimerik protein olarak işlev görmektedir. Ayrıca translokasyonlar, transkripsiyon kontrolünde rol oynayan genlerin, hızlı promotor ya da enhancer bölgelerinin (immünoglobülin ya da T-hücre reseptörünü kodlayan genlerin kontrol bölgeleri gibi) yanına taşınmasına da yol açmaktadırlar. Her iki durum da malign transformasyon için tetikleyici olmaktadır (Tükün 2008).

Normal *ABL* geninin protein ürünü, hücre içinde membrana bağımlı tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. Fizyolojik koşullarda *ABL* proteininin tirozin kinaz aktivitesi N terminalinden sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Ancak *BCR/ABL* füzyonunun oluşumu sırasında *BCR* geninin N terminalinin kaybı, füzyon proteinde artmış/sürekli tirozin kinaz aktivitesine yol açar. Bu down-stream sinyal ileti yolaklarının (Ras, Jak/Stat, PI/3 kinaz gibi) aktivasyonuna neden olur. Bu kadar çok protein-protein etkileşiminin olması hücresel sinyal iletim yolları ile temas olasılığını yükseltir. Bunların çoğu doğrudan diğer sistemlerde tanımlanmış iletim yollarının sinyalleriyle bağlantılı olabilir, ama bazılarının hala işlevleri bilinmemektedir. Bu tür proteinlerin listesi büyüdükçe, *BCR/ABL'* in lökomojenik aktivitedeki rolünü tanımlamak zorlaşmaktadır. *BCR/ABL* füzyon gen ürünü bu sinyal ileti yolaklarıyla mitoz aktivasyonu, apoptoz inhibisyonu, hücrenin adezyon özelliklerinin değişimi ve kendi aktivitesini düzenleyici proteinlerin inhibisyonu ile kanser oluşumunu tetiklediği bildirilmektedir (Zheng ve ark 2006, Zheng ve ark 2009, Jabbour ve ark 2010).

BCR/ABL füzyon geni tespit edilen hastaların tedavisinde çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri ilaç olarak kullanılmakta ve bu ilaçların bir kısmı ATP (Adenozin Trifosfat) bağlanma bölgesine bağlanarak aktifleşme bloklanmaktadır (Kim ve ark 2003)(Şekil 1.7). Bu blokaj, *ABL*' in ATP ve substrat proteini üzerindeki fosforilat tirozin rezidülerinden aldığı fosfat gruplarını transfer etme yeteneğini inhibe eder ve bu şekilde *ABL* ile indüklenen apoptozisin artırılması ve hücresel çoğalma için gerekli olan enerji sinyallerinin iletimini engeller. Bu nedenle, lösemik dönüşüm sürecinde anormal şekilde aktive olan özgül sinyal iletim yolu, imatinib tarafından inaktive edilirken, normal yollar etkilenmemektedir.



Şekil 1.7. İmatinib Mesilat'ın etki mekanizması (Sawyers ve ark 2002, Druker ve ark 2006).

Bu bileşik in vivo, *BCR/ABL* pozitif tümör hücrelerinin kullanıldığı hayvan modellerinde monoterapi olarak anti-tümör aktivite gösterir. Ayrıca imatinib, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve kök hücre faktörü (SCF), c-Kit reseptör tirozin kinazlarının güçlü bir inhibitörüdür; PDGF- ve SCF aracılığıyla gerçekleşen hücresel olayları engeller (Druker ve ark 1996). Ancak ilacın bağlandığı noktada meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon ilacın bağlanmasını engellemektedir. Bu durum bazı ilaçlara dirençliliğe neden olmaktadır. Bu ilaçlar; imatinib (STI571 veya Gleevec), dasatinib, nilotinib gibi ilaçlar olup bu ilaçlar ile tedavi sonrasında hematolojik ve sitogenetik cevap alınmasına rağmen bazı hastalarda ilaç dirençliliği devam etmektedir.

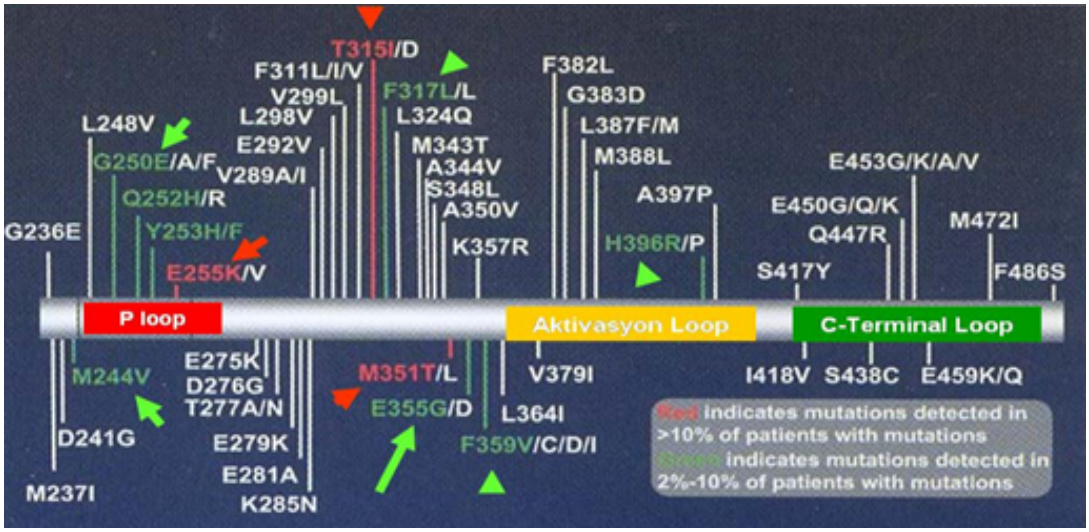
KML'nin ilk adım tedavisi için 2001'de kullanıma girmiş olan tirozin kinaz inhibitörü imatinib KML' nin bütün fazlarında etkili bir tedavidir. Bir 2-fenilaminoprimidin derivesi olan imatinib, protein tirozin kinazlara karşı aktivite gösteren küçük moleküllü bir antagonisttir; güçlü ve belirli Bcr-Abl inhibisyonu sağlamaktadır. Ancak imatinib tedavisi alan bazı hastalarda primer ve ikincil direnç oluşmaktadır (Jabbour ve ark 2009). Primer direnç, tedaviye başladıktan sonra yanıt alınamaması olarak tanımlandırılmaktadır. Ulusal Geniş Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN)'na göre primer direnç tedaviye başladıktan sonra 3-6 ay içinde hematolojik remisyon veya 18 ayda tam sitogenetik yanıt başarılamamışsa belirlenebilir (NCCN guideline 2010).

Avrupa Lösemi Ağı (ELN)'na göre ise benzer şekilde 6 ayda hiçbir sitogenetik yanıt alınamamış, 3 ayda hematolojik remisyon olmamışsa, 12 ayda kısmi sitogenetik yanıtta azalma yoksa tedavinin başarısız olduğu söylenebilir (Baccarani ve ark 2009). IRIS (International Randomized Study of Interferon Versus STI571) deneylerinde, 18 ayda tam sitogenetik yanıt alınamamışsa hastanın primer dirençli olduğu kanıtlanıyor.

İkincil direnç ise imatinib'e devam ederken törapatik etkinin kaybolması ve hastalığın ilerlemesi ile belirleniyor. IRIS çalışmalarında 5 yıl takip edilen hastaların %24'ünde sekonder direnç meydana geldiği belirtiliyor (%17 tekrarlama oranı, %7 ilerleme oranı)(Druker ve ark 2006). İlaç direncine bakıldığında temel mekanizmalar şunlardır:

1) BCR/*ABL* ' in aşırı ekspresyonu
2) BCR/*ABL* ' in amplifikasyonu
3) P-glikoproteinin dahil olması (P-gp)
4) Lyn tirozin kinaz aktivasyonu
5) Serumdaki α-asit glikoprotein (orosomukoid) artışı
6) hOCT1'in (insan organik geçiş transport sistemi 1) düşük ekspresyonu
7) ASS (9q34) gen bölgesindeki büyük submikroskopik delesyonlar
8) Nokta mutasyonlarıdır (Maekawa ve ark 2007).

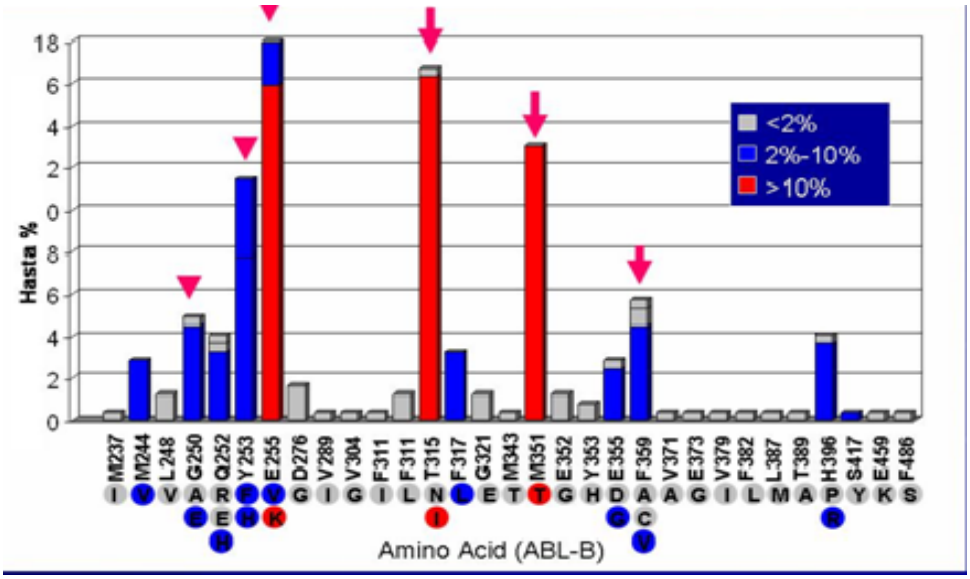
Bunlar arasındaki en önemli mekanizmalardan biri olan *BCR/ABL* füzyon genindeki nokta mutasyonlardır. Tek bir nükleotid değişimi şeklinde oluşan nokta mutasyonları sonucunda genin polipeptid ürününde herhangi bir değişiklik oluşturmayan sessiz mutasyonlar olabileceği gibi farklı aminoasitlerin kodlanmasına yol açan mutasyonlar da oluşabilir. Nokta mutasyonlar ilaç tedavisi almış ama yanıt alınamamış hastaların %90'nda rapor edilmiş ancak son çalışmalarla bu oran %40 lara inmiştir (Maekawa ve ark 2007, Wolf ve ark 2002). İlaca dirençli hastaların özellikle de ikincil dirençli hastaların %35-70'inde nokta mutasyonlar gözlenmektedir (Şekil 1.8). Kimerik *BCR/ABL* geninde polipeptid zincirindeki en sık mutasyonlar Şekil 1.8' de verilmiştir.



Şekil 1.8. *ABL* kinaz bölgesindeki mutasyonların yerleşimi (Jabbour ve ark 2010).

BCR/ABL füzyon genindeki mutasyonlardan klinik açıdan dirençliliği ilk rapor edilen mutasyon T315I (Trionin 315 İzolösin) mutasyonudur. T315I, mutant olan izolösinin hidrokarbon ucu ile ilk geliştirilen tirozin kinaz inhibitörü imatinib arasında çatışma oluşturarak ilaç kinaz hidrojen bağını baskılayarak imatinib'in bağlanmasını bloke eder (Shah ve ark 2002, Maekawa ve ark 2007). Bunun sonucu olarak *BCR/ABL* pozitif hücreler apoptoza indüklenir (Smith ve ark 2003).

Tedavinin başlangıcında ilaca direçli olan hastalarla relaps olan hastalar kıyaslandığında relaps olan hastalarda mutasyonlar daha yaygındır (Şekil 1.9). Bu nedenle IM tedavisine başladıktan sonra 1 yıl içinde *BCR/ABL* transkriptlerinde 3 log (10^3) azalma olmadı ise veya tedaviye başladıktan sonra klinik seyirde *BCR/ABL* transkript seviyesi iki katına çıktı ise mutasyonların taramasının yapılmış olması gerekmektedir (Baccarani ve ark 2006).



Şekil 1.9. İmatinib Direnci olan hastalarda *ABL* kinaz bölgesinde mutasyonların görülme sıklığı (Baccarani ve ark 2006).

1.2.7. KML ve ALL' deki Genetik Anomalileri Tespit Etme Yöntemleri

KML'nin erken döneminde mutasyonlar çok nadir görülür. Ancak geç kronik faz, akselere faz veya blast fazda mutasyonu olan hastaların oranı %22-53 arasında değişmektedir (Soverini ve ark 2005). Günümüzde oldukça hassas mutasyon belirleme metotları ile nokta mutasyonlar belirlenebilmektedir. Nokta mutasyonları belirlemede kullanılan moleküler teknikler; Allel Spesifik Oligonükleotid PCR (ASO-PCR), PCR restriksiyon fragment analizi, DNA dizi analizi, real time PCR gibi teknikler kullanılmaktadır.

Restriksiyon endonükleazlarla DNA'nın farklı büyüklüklerdeki fragmanlara ayrılarak incelenmesine dayanan Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yönteminde ise restriksiyon enzimleri çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden tanıyarak keser ve genellikle 1000-20000 baz çiftlik parçalara ayırır.

Ancak hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın örneklerden elde edilen sonuçların farklı bir teknikle konfirme edilmesi gerekmektedir (Doss ve ark 2008, Doi ve ark 2009).

1.2.8. KML ve ALL' nin Tedavisi ve Genetik Anomaliler ile İlişkisi

1960'dan 1970'e kadar KML de antikanser olarak hidroksiürea ve busülfan kullanıldı (Bolin ve ark 1982). Ancak bunlar lösemik hücre sayısını azaltmasına rağmen surviyi uzatmadı (Goldman 2003). 1980'lerde interferon-α (IFN-α) sitogenetik ve hematolojik remisyonu indüklediği için ve hidroksiürea ile kıyaslandığında hayatta kalmayı uzattığı için yeni ajan olarak kullanıldı. Ancak tüm hastalarda IFN-α'ya yanıt alınamadı.

Diğer bir tedavi yöntemi ise 1970'lerde KML de uygulanan allojenik kök hücre naklidir (AKİT). AKİT potansiyel olarak iyileştirici olmasına rağmen hastaların çoğunda HLA uyumlu donör bulmak konusunda zorluklarla karşılaşıldı. Çeşitli deneysel çalışmalarda Ph (+) lösemilerin patogenezinde *BCR/ABL '* in önemli bir rolü olduğu desteklendi. Bu nedenle *BCR/ABL* tabanlı tirozin kinaz inhibisyonu dikkat çekti. Ancak genelde protein tirozin kinazlar ilaç geliştirilmesinde ihmal edildi.

İlk kez 2001'de kullanıma girmiş olan tirozin kinaz inhibitörü imatinib KML' nin bütün fazlarında etkili bir tedavidir. 1998 de faz 1 deneylerinde imatinib'in IFN-α tedavisinde başarısız olan KML hastalarında antilösemik aktivitesi gösterildi. Sonra faz 2 çalışmalarına geçildi. IFN-α tedavisinden yanıt alınamayan kronik faz KML hastasının çoğunda tam sitogenetik yanıt %41 idi (Jabbour ve ark 2010).

İmatinib şu an için ilk tedavi adımı olarak tanımlanıyor ve 5 yıl izlenenlerde en iyi ulaşılan sonuç tam hematolojik yanıtta %97. Ancak geç kronik fazda (Kronik faz KML tanısı> 12 ay) veya akselere/blast (AF/BF) fazında imatinib'ten alınan yanıt erken tanı konulan kronik faz hastalarından daha azdır (Sawyers ve ark 2002).

İmatinib'in klinikteki başarısı ise tedaviye direnç yüzünden engellendi. İmatinib tedavisine başlandıktan sonra tedaviye yanıt alınamama oranları yıllık şu şekilde: İlk yıl %3.3, ikinci yıl %7.5, üçüncü yıl %4.8, dördüncü yıl %1.5, beşinci yıl %0.9 olarak tahmin ediliyor. Bu sonuçlar imatinib tedavisi alan kronik faz KML hastaları için umut verici olabilir ama AF/BF' daki hastaların çoğunluğunda imatinib' e direnç gelişiyor. Tahmini olarak 4 yıldaki direnç oranı geç kronik fazda %20 iken AF/BF da %70-90 dır (Druker ve ark 2006).

İmatinib'in kullanımına diğer önemli klinik bariyer de intolerans da denilen tedaviye ara verdikten sonra ilaç toksisitesinin oluşmasıdır. IRIS çalışmalarında hastaların %5'i 7 yıl tedaviye devam ettikten sonra ilaca ara verdi (O'Brien ve ark 2008). İmatinib tedavisine ara veren hastaların %29'u ilaç toksisitesinden dolayı, %11'i anemiden dolayı, % 11'i torombositopeniden dolayı ara verdi. İmatinib'e intolerans daha çok KML'nin ilerlemiş fazında ve genellikle BF da gözlendi (Sawyers ve ark 2002).

İmatinib'e bazı hastalarda direnç oluşması ve intoleransdan dolayı daha etkili ve özgül ayrıca *BCR/ABL* kinaz aktivitesini engellemede imatinib'ten daha güçlü yeni tirozin kinaz inhibitörleri geliştirildi. Dasatinib, nilotinib, AP23464, Bosutinib, ON012380, MK-0457 bunlardan bazılarıdır. Hepsinin farklı özellikleri bulunmaktadır. Dasatinib'in in vitro çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda başarılı bir şekilde 15 farklı klinik açıdan ilişkili kinazın 14'ünü ve Src kinazları da inhibe ettiği kanıtlandı (Tablo 1.3). Dasatinib aslında imatinib'e benzer şekilde ATP bağlanma bölgesine bağlanır. Dasatinib'in nilotinib ve imatinib'den farkı *ABL* kinazın hem aktif hem de inaktif konformasyonuna bağlanmasıdır(Nicolini ve ark 2007, Soverini ve ark 2007). Hücre hattı çalışmalarında dasatinib'in nilotinib ve imatinib'den daha güçlü bir şekilde ATP bağlanma bölgesine bağlandığı ancak T315I mutasyonunun bulunduğu hücrelere imatinib ve nilotinib gibi onunda aktif olmadığı gösterildi. İmatinib'e dirençli olan hastalarda T315I ve F317L sabtitüsyonu daha sık iken dasatinib'e dirençli hastalarda T315A ve F317I varyantlarının daha sık olduğu bildirilmiştir (Soverini ve ark 2007). Ancak T315A ve F317I varyantları imatinib'e direnç göstermedi.

Tablo 1.3.KML tedavisinde kullanılan ilaçlar ve hedefleri (Ramirez ve ark 2008).

Agent	Targets	Status
FDA approved		
Imatinib	Bcr-Abl, Kit, PDGFR-A, PDGFR-B	
Dasatinib	Bcr-Abl, Src family kinases, Kit, PDGFR-A, PDGFR-B	
Nilotinib	Bcr-Abl, PDGFR, c-Kit, EPHB4	
Investigational		
SKI-606 [100]	Bcr-Abl, Src	Phase I, II
INNO-406 [100]	Bcr-Abl, PDGFR, c-Kit, Lyn kinases	Phase I
MK-0457 [100]	Aurora kinase, Jak-2, Bcr-Abl	Phase I, II
LBH589 [100]	Histone deacetylase	Phase I, II, II
XL-228 [100]	Aurora kinase	Phase I
PHA-739358 [100]	Aurora kinase	Phase II
Preclinical		
SGX70393 [96]	Bcr-Abl	In vivo (mice
WP1130 [98]	Jak kinases	In vivo (mice

Bununla birlikte alternatif olarak geliştirilen nilotinib ise imatinib'ten 20-50 kat daha güçlüdür ve imatinib'e dirençli 33 hücre hattından 32'sini (T315I mutasyonu hariç) inhibe ettiği gösterildi. İmatinib ile karşılaştırıldığında nilotinib'in *ABL* kinaz bölgesine daha yüksek afinitesi vardır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda nilotinib *BCR/ABL* mutasyonlarının çoğunda etkili olmasına rağmen T315I ve G250E mutasyonları üzerine önemli bir etkisi olmadığı gösterildi (Golemevic ve ark 2005).

Gumireddy ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında ON012380 adlı enzimin ATP bağlama bölgeleri haricinde hedef bölgeleri seçtiler çünkü imatinib'e direnç neden olan KML hücrelerindeki mutasyonlara ATP ile rekabet etmeyen inhibitörlerin daha etkili olabileceğini belirttiler. Böyle bir inhibitör olan ON012380 substrat bağlanma bölgesini bloke etmek üzere dizayn ettiler ve imatinib ile kıyaslandığında 10 kat daha güçlü olduğu gösterildi. Ayrıca in vitro çalışmalarda 10nM'dan daha az konsantrasyonda T315I mutasyonu dahil tüm imatinib'e dirençli mutasyonların eksprese olduğu hücrelerin büyümesini inhibe etti.

KML üzerinde çalışan çoğu araştırmacı imatinib ve direnç mekanizmaları üzerinde olduğu kadar yeni tirozin kinaz inhibitörleri geliştirmeye de odaklanmıştır. Ancak kronik fazdan blast faza geçişten sorumlu mekanizmalar, hatalı DNA tamiri ve genomik instabilitenin nedenleri, kök hücrenin sukuneti, KML'nin ilerlemesinde ve tirozin kinaz inhibitörlerine dirençte tümör baskılayıcıların rolü veya *BCR/ABL* ile diğer onkojenik sinyal yolakları arasındaki karşılıklı konuşma hala tam olarak anlaşılamamıştır (Quintas-Cardama ve ark 2009).

Mevcut çalışmada da KML ve ALL olgularında *BCR/ABL* genlerindeki mutasyonların araştırılması amaçlanmaktadır. Elde edilen verilere göre bu hasta gruplarında tedavide ve tedavinin yönlendirilmesinde kullanılacak bilgilere ulaşılması hedeflenmektedir.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay (24.12.2009 tarihli, 2009/093 nolu etik kurul kararı) alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak kan örneklerinin alındığı gönüllülerin de bilgilendirilmiş onamları alınmıştır.

2.1. Hasta Seçimi

Olgu grubu için Meram Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji ve Yetişkin Hematolojide tanısı konmuş t(9;22) dengeli translokasyonu mevcut bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir hastanın sitogenetik ve/veya *BCR/ABL* füzyon analizi için Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH) sonuçları olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastanın klinik bulguları ayrıca kaydedildi. Olgu grubunun yaş aralığı 2-86, yaş ortalaması ise 43.7'dir. Olgu grubu toplamda 67 hastadan oluşmaktadır ve hastaların periferik venöz kanı ve/veya kemik iliği kullanılmıştır.

Çalışmada pozitif kontrol için Ph (+) hücre olarak K562 hücre hattı kullanılmıştır. Negatif kontrol için ise Ph (-) hücre olarak Raji (Burkitt Lenfoma) hücre hattı kullanılmıştır.

2.2. K562 ve Raji Hücre Hatları ve Kültürleri

Çalışmanın *BCR/ABL* pozitif hücre hattı olarak K562 hücre hattı (ATCC No: CCL-243™) ve *BCR/ABL* negatif olan Raji(Burkitt Lenfoma) hücre hattı (ATCC no: CCL-86™) kullanıldı. Raji hücreleri 2 mM L-glutamin, %1 PSA (Penisilin-Streptomisin-Anfoterisin), %10 fetal bovin serum içeren RPMI-1640 (Life Technologies, USA) medyumunda kültür edildi. K562 hücreleri ise 2 mM L-glutamin, %1 PSA (Penisilin-Streptomisin-Anfoterisin), %10 fetal bovin serum içeren DMEM (Life Technologies, USA) medyumunda kültür edildi. Hücreler %5 CO2'li nemli ortamda 37°C de kültüre edildi.

2.3.Lökosit İzolasyonu

Olgu grubundan steril bir şekilde EDTA'lı tüpe 1-2 ml periferik kan veya kemik iliği alındı ve -20ºC veya -80ºC de arşivlendi. Arşivlenmiş örneklerden mutasyonların taranması için -80 dereceden alınan kan ve kemik iliği örnekleri önce -20 dereceye ardından da buz içerisine alındı ve çözündükten sonra lökosit izolasyonu yapıldı.

Hastaların BKH (Beyaz Kan Hücresi) sayıları dikkate alınarak her hastanın BKH sayısı 3.000.000'a bölünerek ne kadar kandan lökosit izolasyonu yapılacağı hesaplandı. Bunu yapmamızın amacı mikrolitresinde her hastadan aynı oranda lökosit elde etmekti. Kullanacağımızdan daha fazla kan örneği olan olgulardan iki adet lökosit izolasyonu yapıldı ve lökosit aşamasının ardından bir tanesi -80 dereceye kaldırıldı. Lökosit izolasyonunda kullanılan eritrosit liziz solüsyonu (bkz. Protokol 1) ve liziz bağlama solüsyonu (bkz. Protokol 2) optimize edildi. Lökosit izolasyonunun (bkz. Protokol 3) hemen ardından RNA izolasyonuna geçilmeyecek ise örnekler -20 dereceye kaldırıldı.

Protokol 1. Eritrosit liziz solüsyonu

- 8,3 gr Amonyum klorür

  1 gr potasyum bikarbonat

  %5' lik pH'ı 8 olan EDTA' dan (Etilen diamin tetra asetik asit) 1,8 ml alınarak 800 ml distile suda çözüldü. Steril olması için 0,2 µM lik filtreden geçirildi. Ardından solüsyon distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

Protokol 2. Liziz bağlama solüsyonu

- 4,5 M Guanidine-HCl (AppliChem kat no:A1106,1000)

  50 mM Tris-HCl (Vivantis)

  %30 Triton-X-100 (Amresco kat no:0694-1L) karıştırılarak 25 ml' ye distile su ile tamamlandı ve pH' ı 6.6' ya ayarlandı. Guanidine-HCl, konsantrasyon ve serbest enerji arasındaki doğrusal ilişki ile proteinleri denatüre etmesi için, Triton-X-100 ise ökaryotik hücre zarının parçalanması için kullanıldı.

Protokol 3. Lökosit İzolasyonu

- Öncelikle materyalin BKH sayısına bakılarak ne kadar kan alınacağı hesaplanır. Örneğin BKH sayısı 5000 olan bir kişiden

  3 000 000 / 5 000 =600 µl kan alınır.
- Alınan kanın üzerine kan miktarının iki katı kadar eritrosit liziz solüsyonu ilave edilip +4 derecede 10 dk alt-üst edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- İkinci defa aldığımız kan miktarı kadar daha eritrosit liziz solüsyonu ilave edilir ve +4 derecede 5 dk daha alt-üst edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- Pellet üzerine 250 µl serum fizyolojik ilave edilir.
- Süre sonunda 12 000 rpm' de 15 sn santrifüj edilir ve üst faz atılır.
- 400 µl liziz bağlama solüsyonu ilave edildikten sonra RNA izolasyonu aşamasına geçilir.

2.4. Kandan ve Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu

Kan örneklerinden, pozitif kontrol ve negatif kontrol olarak kullandığımız hücre hattından ticari RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı (Roche High Pure RNA İsolation Kit). Lökosit aşamasında 400 µl liziz bağlama solüsyonu ilave edilen örnekler 15 sn kısa santrifüj yapıldıktan sonra RNA izolasyon aşamalarına devam edildi (bkz. Protokol 4).

Hücre kültüründen RNA izolasyonunda ise devam eden kültürün flaskından hücreler alınarak kültür tüpüne aktarıldı. 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve pelletin üzerine 400 µl liziz bağlama solüsyonu ilave edilerek kandan RNA izolasyonu prosedürü uygulandı.

Protokol 4. Kandan ve hücre hatlarından RNA izolasyonu

- 400 µl liziz bağlama solüsyonu ilave edilen örnekler 15 sn kısa santrifüj edilir.
- Örnek sayısı kadar filtreli toplama tüpü hazırlanır ve numaralandırılır.
- Kısa santrifüj edilen karışım filtreli tüplere aktarılır ve tüplerin kapakları kapatılır.
- 15 sn 8 000 g' de santrifüj edilir.
- Toplama tüpleri atılır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılır.
- Her bir örneğe 90 µl DNAaz bekleme solüsyonu ve 10 µl DNAaz eklenir.
- 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- Süre dolduktan sonra filtreli tüplerin içerisine 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklenir.
- 15 sn 8 000 g' de santrifüj edilir.
- Toplama tüpleri atılır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılır.
- Filtreli tüplerin içerisine 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenir.
- 15 sn 8 000 g' de santrifüj edilir.
- Toplama tüpleri atılır. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılır.
- Filtreli tüplerin içerisine 200 µl yıkama solüsyonu 2 eklenir.
- 2 dk 13 000 g' de santrifüj edilir.
- Toplama tüpleri atılır. Filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml' lik ependorf tüplere aktarılır.
- Her tüpe 60 µl elüsyon solüsyonu ilave edilir.
- 15 sn 8 000 g' de santrifüj edilir.

- ❖ Filtreler atılır ve süzülen kısımda RNA elde edilmiş olur.

RNA içeren tüplerden hem RNA konsantrasyonunu ölçmek için hem de cDNA sentezi için gerekli olan miktar ayrılarak hiç bekletilmeden -80 ºC derin dondurucuya alındı. RNA izolasyonunun ardından örneklerin U.V. Spektrofotometre (Boeco S-22 UV/Vis Spectrophotometer) ile RNA miktarı ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA' lar TBE solüsyonu kullanılarak agaroz jelde yürütüldü (bkz.Protokol 5).

Protokol 5. TBE tamponu ile agaroz jel hazırlanması

- ❖ %1' lik agaroz jel için 100 ml 1X TBE (Tris/ Borik Asit / EDTA) tamponunun içine 1 gr agaroz (Vivantis kat no: PC0701-100g) konuldu.
- ❖ Agaroz tamamen çözülünceye kadar mikrodalgada kaynatıldı.
- ❖ Kaynayan karışım içerisine 5 Etidyum bromid (sigma kat no: E1510) ilave edildi.
- ❖ Karışım jel tablasına döküldükten sonra uygun taraklar takılarak soğumaya bırakıldı.
- ❖ Jel polimerizasyonu gerçekleştikten sonra 1X TBE tampon solüsyonu ile dolu jel tankına konuldu.
- ❖ Jelin her bir kuyucuğuna 300-500 ng RNA yüklenerek 40 dk 75 voltluk elektrik akımı altında yürütüldü.
- ❖ Yürütmeden sonra jel U.V. transliminatörde görüntülendi.

2.5. cDNA Elde Edilmesi

Kan örnekleri ile pozitif ve negatif kontrol olarak kullandığımız hücre hattından cDNA elde edilmesinde ticari kit kullanıldı (Roche t(9;22) Quantification Kit) (bkz.Protokol 6).

Protokol 6. cDNA Sentezi

Solüsyon	Miktar (µl)
Distile Su	4.4
5x RT-Buffer	4.0
Random Hekzamer Primer	0.2
Deoksinükleotid Miks	0.4
AMV Revers Transkriptaz	0.4
RNase İnhibitörü	0.6
RNA	10
TOPLAM	20

Kullanılan PZR cihazı: Applied Biosystems GeneAmp 2700 model

Tablodaki (Protokol 6) gibi bu 20 µl karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) cihazında 60 dk 37ºC de bekletildi. Ardından 65ºC de 10 dk reverse transkriptazın denatürasyonu için bekletildi ve 4ºC ye soğutuldu.

Elde edilen cDNA örnekleri dondurma çözme işleminin bozucu etkisinin önüne geçilmesi amacı ile ependorf tüplere 2 µl' lik hacimlerde dağıtıldı ve bu şekilde -80ºC de muhafaza edildi.

2.6. PZR ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm ile Mutasyonların Tespiti

BCR/ABL' in kinaz bölgesi yaklaşık 1000 bç' lik bir bölgeyi kapsamaktadır ve *BCR/ABL'* in kinaz bölgesinde şimdiye kadar 63 farklı mutasyon tespit edilmiştir. Bu çalışmada en sık rastlanan mutasyonlardan 5 tanesi ele alındı. *BCR/ABL'* in kinaz bölgesi PZR ile çoğaltılarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) metodu ile hastalar 5 mutasyon yönünden incelendi. Forward 1 ve reverse 1 (F1 ve R1) ile Forward 2 ve Reverse 2 (F2 ve R2) primerleri dizayn edildi.

Klasik PZR karışımı hazırlanması:

Solüsyon	Miktar (µl)
10X PZR Tamponu (Vivantis buffer A)	4.5
25 mM MgCl (Vivantis)	4.5
dNTP (10 nM) (A,T,G,C her birinden)	0.1
Primer F/R (10 pmol)	0.4
Taq Polimeraz Enzimi (Vivantis)	0.6
Distile su	29.5
cDNA	2
TOPLAM	45

Her bir örnek için hazırlanan PZR karışımının son hacmi 45 µl' dir. Bu hacim 3 tane restriksiyon enzim kesimi için yeterliydi.

- PZR Tepkime Koşulları

94ºC	10 dk	1 döngü
94ºC	15 sn	35 döngü
60ºC	30 sn	
72ºC	2 dk	
72ºC	3 dk	1 döngü

Kullanılan PZR cihazı: Applied Biosystems GeneAmp 2700 model

Elde edilen PZR ürünlerini değerlendirmek için %1,5' luk agaroz jel için 100 ml 1X TBE (Tris/ Borik Asit / EDTA) tamponunun içine 1,5 gr agaroz (Vivantis kat no: PC0701-100g) konuldu. Agaroz TBE solüsyonu ile mikrodalgada eritildi ve 50-60ºC' ye kadar soğutulduktan sonra etidyum bromid ilave edildi. Jel tankına uygun taraklar yerleştirildikten sonra jel tablasına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elde edilen PZR ürünlerinden 5 µl alınarak yükleme boyası (6x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve 45 dk 100 voltluk elektrik akımında yürütüldü. Bant uzunluklarını belirlemek amacıyla 100 bç' lik DNA markırı kullanıldı. Yürütmeden sonra jel U.V. transliminatörde görüntülendi. Forward 1 ve Revers 1 (F1 ve R1) primerlerinin kullanıldığı PZR sonucunda 166 bç büyüklüğünde bantlar varken Forward 2 ve Revers 2 (F2 ve R2) primerlerinin kullanıldığı PZR sonucunda 246 bç büyüklüğünde bant elde edildi. Bundan sonraki aşama ise restriksiyon enzimleri kullanılarak PZR ürünlerinin kesilmesiydi.

2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Kesimi

Primer çiftlerinin (F1 ve R1) kullanıldığı PZR sonucunda 166 bç büyüklüğünde bantlar gözlendi. Bu primerler F311I, T315I ve F317L mutasyonlarını tespit etmek için kullanıldı. Primer çiftleri (F2 ve R2) kullanılarak yapılan PZR sonucunda ise 246 bç büyüklüğünde bantlar gözlendi. Bu PZR ürünü M315T ve F359V mutasyonlarını tespit etmede kullanıldı. PZR ürünleri Tablo 2.1 de verilen restriksiyon enzimleri (RE) ile kesildi.

PZR Karışımı hazırlanışı:

Solüsyon	Miktar (µl)
10X Buffer (Fermentas Green Buffer)	2.0
Restriksiyon Enzimi	1.0
Distile Su	7.0
PZR ürünü	10.0
TOPLAM	20.0

Tablo 2.1. Kullanılan Kesim Enzimleri

Restriksiyon Enzimi	Kestiği noktadaki mutasyon	Nükleotid Değişimi
Aci1 (Fermentas)	F311I	T > C
Dde1 (Fermentas)	T315I	C > T
Pag1 (Fermentas)	F317L	C > G
Nco1 (Fermentas)	M351T	T > C
HpyCH4IV (NEB)	F359V	T > G

2.8. İstatistiksel Analizler

Olgu grubundan elde edilen veriler ile pozitif ve negatif kontrollerden elde edilen verilerin sıklığı yüzde olarak hesaplandı. Güven aralığı olarak 0,05 değeri kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Hasta Bulguları

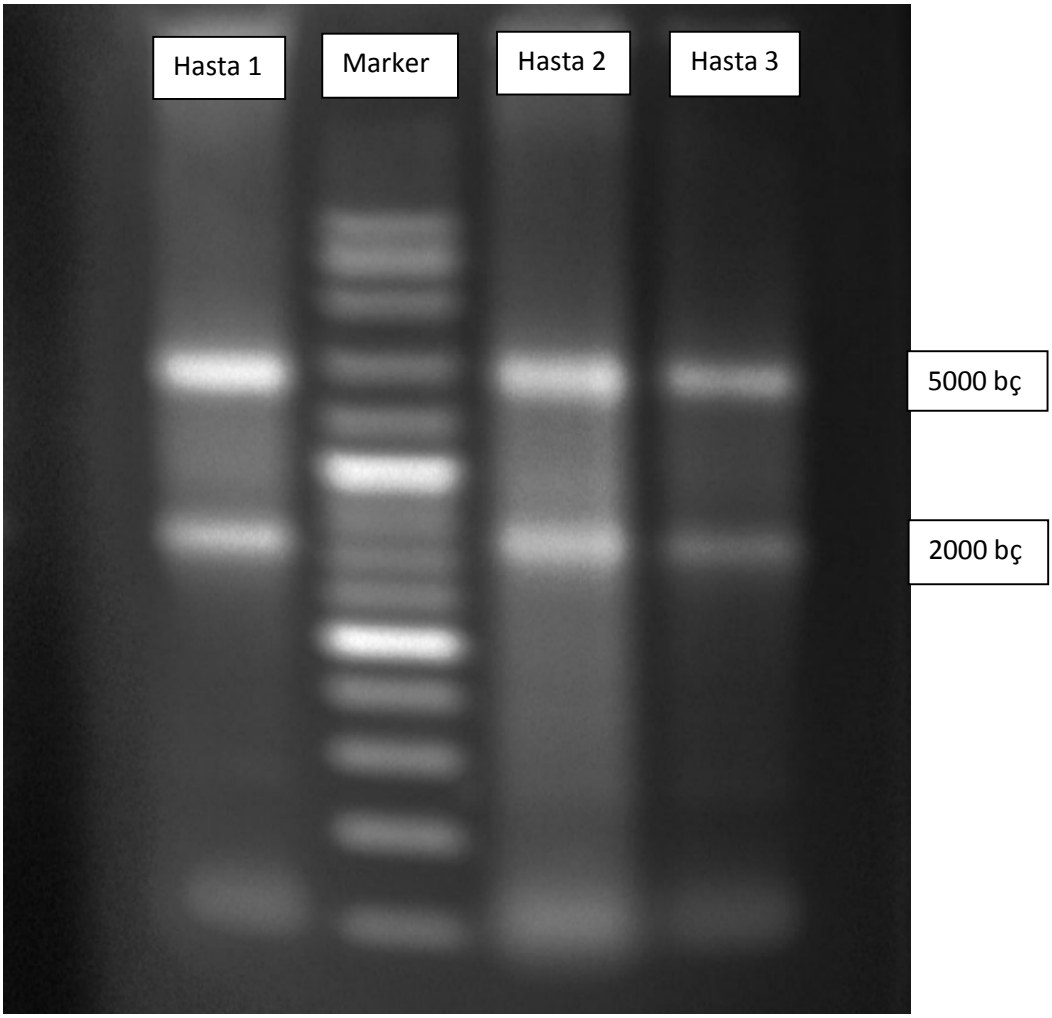
Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş aralığı 2-86 yaş ortalaması ise 43,7'dir. Toplamda olgu grubu 67 hastadan oluşmaktadır ve hastaların periferik venöz kanı veya kemik iliği kullanılmıştır. Hastalara ait veriler Tablo 3.1 de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Olgu grubundaki hastalara ait veriler.

	KML ve ALL Hastaları
Olgu Sayısı (Pediatri/Yetişkin)	16 / 51
Yaş ort (Pediatri/Yetişkin)	10.68 / 52.4
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	32 / 35
BKH Ort (Pediatri/Yetişkin)	11.4 / 44.1

3.2. RNA İzolasyon Bulguları

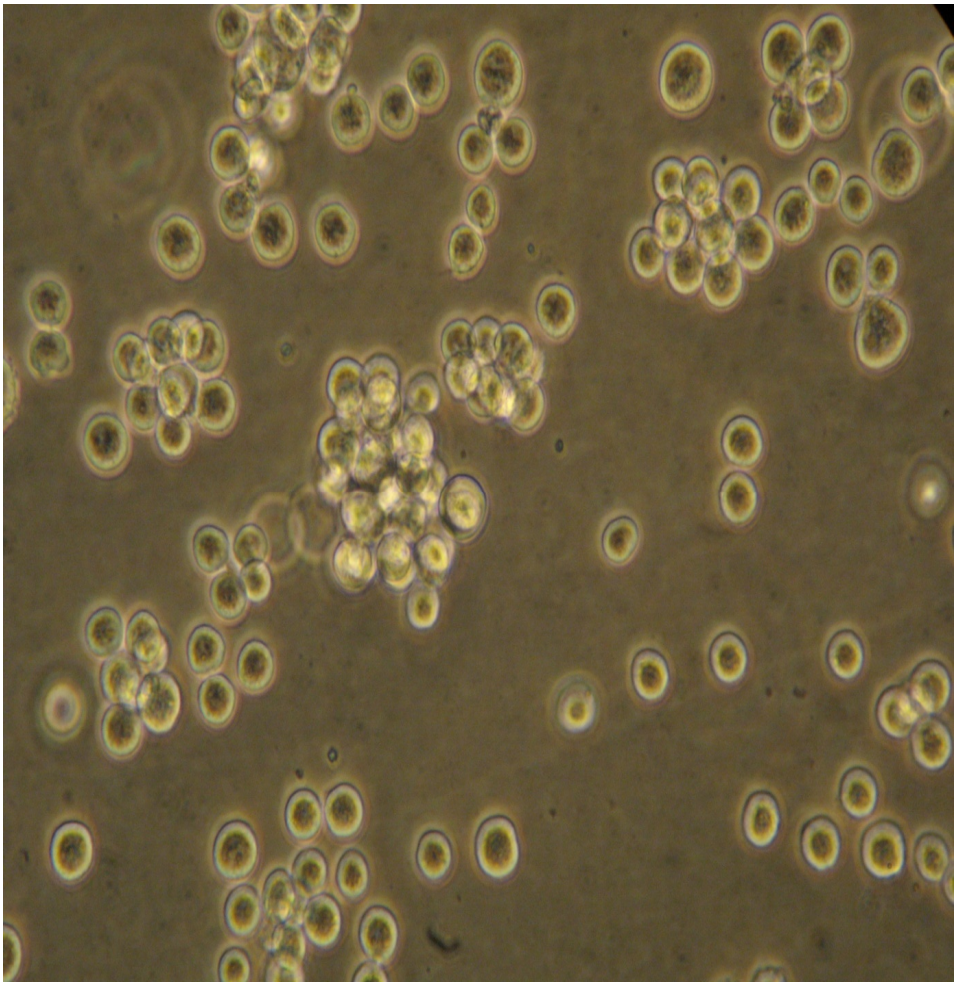
Kan ve hücre hatlarından RNA izolasyonu, ticari kit kullanılarak izole edildi. RNA'ların U.V. Spektrofotometre (Boeco S-22 UV/Vis Spectrophotometer) ile miktarı ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA' lar TBE solüsyonu kullanılarak agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel görüntüsü Resim 3.1' de sunulmuştur.



Resim 3.1.TBE tamponu ile agaroz jelde yürütülmüş KML ve ALL hastalarının RNA örnekleri gösterilmektedir. 2000 bp 18S RNA, 5000 bp 28S RNA yı göstermektedir.

3.3. Hücre Hattı Bulguları

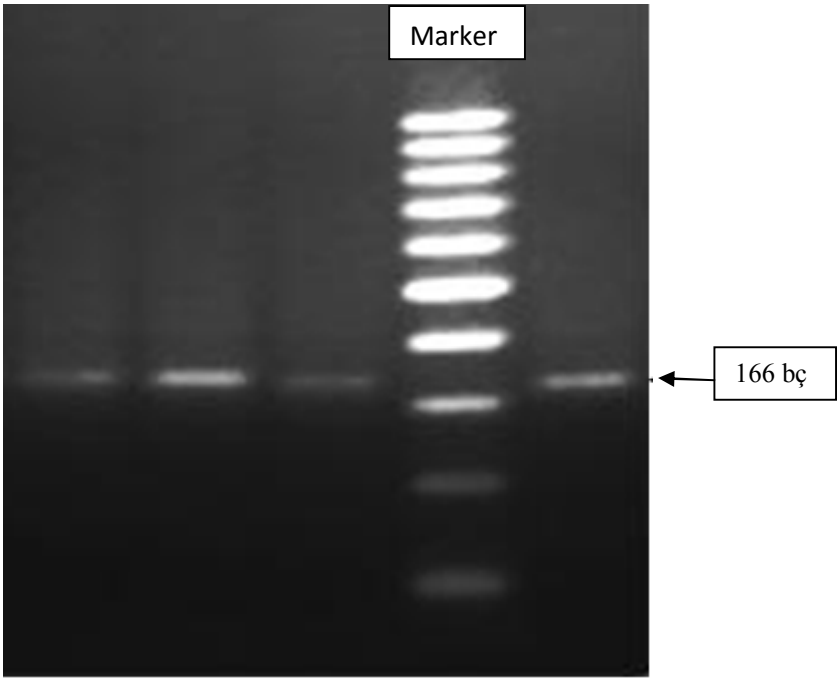
Ticari olarak temin edilen negatif kontrol olarak kullanılan Raji hücre hattı ve yine ticari olarak elde edilen K562 hücre hattı, yapılan hücre kültürü çalışmaları sonucu başarılı bir şekilde çoğaltıldı. Kültüre edilen hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve başarılı bir şekilde RNA'lar izole edildi (Resim 3.2).



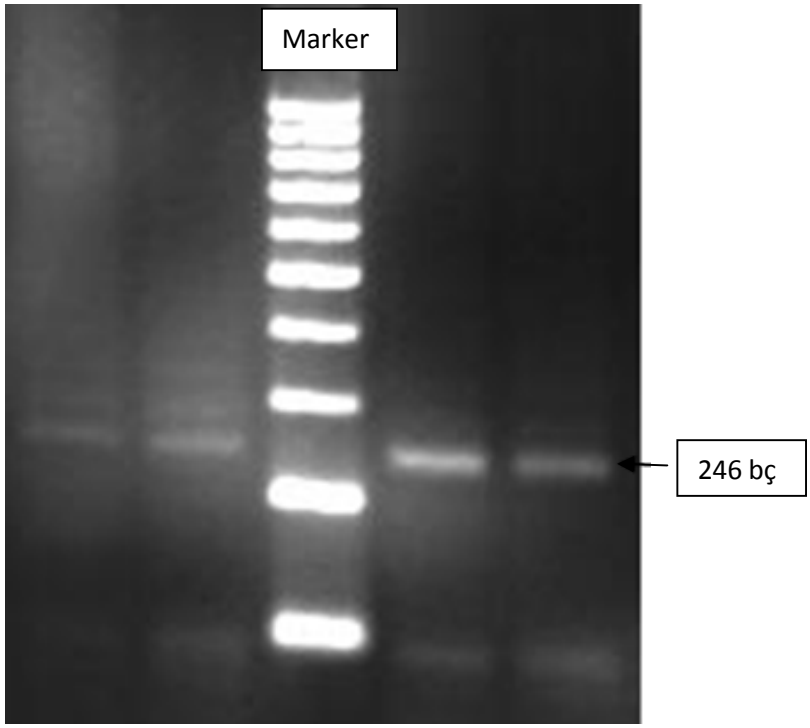
Resim 3.2.Ph(+) hücrelere ait K562 hücre kültürünün 20X objektif kullanılarak çekilmiş fotoğrafı gösterilmektedir.

3.4.Klasik PZR Bulguları

Bu çalışmada en sık rastlanan mutasyonlardan 5 tanesi ele alındı ve donmuş kandan izole edilen cDNA kullanıldı. *BCR/ABL'* in kinaz bölgesi PZR ile çoğaltılarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) metodu ile hastalar 5 mutasyonu incelendi. Klasik PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde yürütüldü ve jel U.V. transliminatörde görüntülendi. Primer çiftleri (F1 ve R1) kullanılarak oluşturulan PZR sonucunda 166 bç büyüklüğünde bantlar velde edilirken (Resim 3.4) primer çiftleri (F2 ve R2) kullanılarak oluşturulan PZR sonucunda 246 bç büyüklüğünde bant (Resim 3.5) gözlendi.



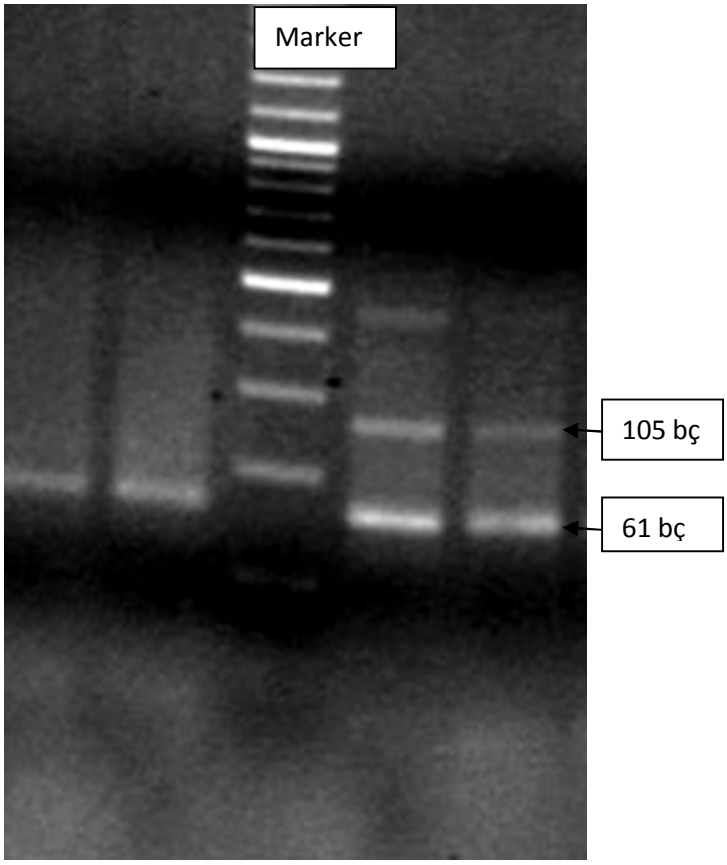
Resim 3.4. Primer çifti (F1 ve R1) kullanılarak elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklendikten sonra 45 dk 100 voltluk elektrik akımında yürütülmüş ve UV transiliminatördeki görüntüsü fotoğraflandı. Bant uzunluklarını belirlemek amacıyla 50 bç' lik DNA markerı kullanıldı.



Resim 3.5. Primer çifti (F2 ve R2) kullanılarak elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklendikten sonra 45 dk 100 voltluk elektrik akımında yürütülmüş ve 246 bç uzunluğundaki bantlar görüntülenmiştir. Bant uzunluklarını belirlemek amacıyla 100 bç' lik DNA markerı kullanıldı.

3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Bulguları

Primer çifti (F1 ve R1) kullanıldığında PZR sonucunda 166 bç büyüklüğünde bant gözlendi. Bu primer çiftleri F311I, T315I ve F317L mutasyonlarını tespit etmek için kullanıldı. Primer çifti (F2 ve R2) kullanılarak yapılan PZR sonucunda ise 246 bç büyüklüğünde bant gözlendi. Bu PZR ürünü de M315T ve F359V mutasyonlarını tespit etmek amacıyla kullanıldı. PZR ürünleri restriksiyon enzimleri (RE) ile kesildi (Resim 3.6).



Resim 3.6. PZR ürünleri F317L mutasyonunu belirlemek için Pag1 restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. 6 ile 7'nci örnekler mutant olarak fotoğraflanmıştır.

Toplam 67 hastanın PZR ürünlerinin enzim kesimi sonucu elde edilen veriler ve yüzdeleri Tablo 3.2 de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Restriksiyon enzim kesimi, varyasyonlar ve nükleotid değişimi

Restriksiyon Enzimi	Mutasyon	Nükleotid Değişimi
Aci1	F311I	T > C
Dde1	T315I	C > T
Pag1	F317L	C > G
Nco1	M351T	T > C
HpyCH4IV	F359V	T>G

.

4. TARTIŞMA

Kronik miyeloid lösemi (KML) miyeloid öncül hücrelerin anormal klonal çoğalması ile kendini gösteren bir kök hücre hastalığı olup, erişkin lösemilerinin

% 15'ini oluşturmaktadır. Bu hastalığın insidansı 1-2/100.000'dir. Erkeklerde daha sık (E/K:1.3/1) görülmekte ve 40-60 yaş arasında görülme sıklığı artmaktadır (Bubnoff ve ark 2010). KML'li vakaların %95'inde ve ALL'li hastaların%15-30'unda t(9;22) sonucu 22. kromozomun q11 bandındaki *BCR* geni ile 9.kromozomun q34 bandına yerleşik *ABL* geninin 22. kromozom (Ph kromozomu) üzerinde birleşmesi ile *BCR/ABL* füzyon geni oluşur. Bu gen 8,5 kb büyüklüğünde füzyon-mRNA ve sonucunda artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip füzyon proteinin üretilmesine neden olur. *BCR/ABL* füzyonunun oluşumu sırasında *BCR* geninin N terminalinin kaybı, füzyon proteinde artmış/sürekli tirozin kinaz aktivitesine yol açar. Bu down-stream sinyal ileti yolaklarının (Ras, Jak/Stat, PI/3 kinaz gibi) aktivasyonuna neden olur. Son zamanlarda Ras onkogeninin de anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir. Mutant Ras içeren tümör hücrelerinin çevrelerinde bulunan kapillerin endotel hücrelerin çoğalmasını ve yeni damar oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Ras'ın anjiyogenezi hangi mekanizmalarla uyardığını araştıran çalışmalar Ras onkogeninin VEGF ekspresyonunu artırdığını ve böylece tümörün damarlanmasını sağladığını göstermiştir.

BCR/ABL füzyon geninin büyüklüğü, *BCR* geninin kırılma noktasına bağlı olarak 190 kDa ile 210 kDa arasında değişmektedir (Sawyers ve ark 1999, Kantarjian ve ark 2007, Cortes ve ark 2009). İmatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri BCR/ABL aktivitesini bloke eder (Druker BJ ve ark 1996). Artan tirozin kinaz aktivitesini engellemek için farklı tedavi yöntemleri ortaya konmuştur. Tirozin kinaz ailesini inhibe eden sentetik ilaçların geliştirilmesi ile hastalık tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Geliştirilen imatinib (STI571 veya Gleevec), dasatinib, nilotinib gibi ilaçlarla tedavi sonrasında hematolojik ve sitogenetik cevap alınmasına rağmen bazı hastalarda ilaçlara karşı direnç gözlenmektedir.

Direnç, ya primer tümörde bulunan ya da tedaviye sekonder gelişen, duyarlılığı az olan kök hücre seleksiyonu ile oluşur. Tüm klasik antineoplastik ajanlara karşı direnç gelişimi uzun zamandan beri bilinmekle birlikte son zamanlarda tirozin kinaz inhibitörlerine karşı primer direnç verileri bildirilmektedir.

İlk kez 2000 yılında bildirilen imatinib'e direnç gelişimi için *BCR/ABL* gen mutasyonları, *BCR/ABL* gen amplifikasyonları, *BCR/ABL* bağımsız kinaz yollarının aktivasyonu, imatinibin asit α-1 glikoproteine bağlanması, ASS gen delesyonu, klonal değişim gibi farklı mekanizmalar bildirilmektedir (Maekawa ve ark 2007, Jabbour ve ark 2010).

Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençliliği sağlayan mekanizmalardan biri BCR/ABL nokta mutasyonları olup KML ve ALL olgularında en fazla imatinib direncine neden olan mekanizmadır. Gorre ve ark (2001)'nın yaptıkları çalışmada hastaların %50-90'ında *BCR/ABL* kinaz bölgesinde mutasyonlar tespit etmişlerdir. İmatinib'in mutajenik etkisi henüz kanıtlanmamasına rağmen hastalara verildiğinde mutasyonları indüklediği yönünde literatür verileri mevcuttur (Deininger ve ark 2005, Lange ve ark 2005). Fakat daha 2001 yılında kullanıma girdiği için uzun süreli etkileri henüz bilinmemektedir. Lange ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada ise AF ve BF'daki hastaların 1/3'ünde kinaz bölgesinde mutasyonlar bulunmuştur. Mutasyonlar, imatinib bağlanmasını etkileyen mutasyonlar (P-loop), ATP bağlanma bölgesi mutasyonları, aktivasyon bölgesi mutasyonları, katalitik cep bölgesi mutasyonları olmak üzere 4 grupta incelenmektedir (Türk Hematoloji Derneği (www.thd.org.tr) 2010). Genelde *BCR/ABL* ile ilişkili mutasyonlar daha sıklıkla (%30-40) P-loop'ta meydana gelmektedir (Maekawa ve ark 2007, Quintas-Cardama ve Cortes 2009).

Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli KML hastalarında şimdiye kadar 63 farklı nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Olguların büyük kısmında başlangıçta sadece bir mutasyon bulunurken takipte pek çok olguda kinaz mutasyonlarının sayısı artmaktadır. Soverini ve ark (2005)'nın çalışmasında da erken kronik fazda mutasyonlar nadir olmasına rağmen geç kronik faz, AF ve BF da mutasyonlu hastaların oranının %22-53 oranında olduğu bildirilmiştir. Ortaya çıkan bu mutasyonların alternatif tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilmesi sonrası olguların tekrar imatinibe duyarlı hale gelebildiği belirtilmiştir (thd.org.tr 2010). Ayrıca imatinib ve nilotinib ile yanıt alınamayan hastalarda dasatinib ile iyi yanıt alınabileceği de rapor edilmiştir (Talpaz ve ark 2006). İmatinib, nilotinib ve dasatinib arasında farklı *BCR/ABL* mutasyon profilleri olduğu için imatinib'in ya nilotinib ile

ya da dasatinib ile kombine tedavisi pek çok çalışmada tavsiye edilmektedir (Bradeen ve ark 2006, Maekawa ve ark 2007).

İkincil tirozin kinaz inhibitörleriyle (dasatinib, nilotinib gibi) tedavi başarısızlığının ardından ilave tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi tavsiye edilmemektedir. Ancak imatinib ve nilotinib'in başarısız olduğu 23 hastalık bir çalışma grubunda dasatinib'e geçildikten sonra THY'ın %43'e, sitogenetik yanıtın ise %30'a indüklendiği gösterildi (Quintas-Cardama ve ark 2007). Diğer bir vaka çalışmasında da hem imatinib hem de nilotinib'e dirençli hastalarda dasatinib'in *BCR/ABL* mutasyonundan bağımsız bir direnç oluşturabileceğinden bahsedilmektedir (Cannella ve ark 2009). Yayınların çoğunda kombine tedaviden önce, ilaca yanıt alınamadığında önce doz artışı ardından farklı tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi önerilmektedir (Jabbour ve ark 2010). Çünkü bazı nokta mutasyonları için (T315A, F317L, V299L gibi) dasatinib tedavisine sürekli yanıt alınamazken F359V mutasyonu için dasatinib daha etkilidir (Jabbour ve ark 2010). Dasatinib in daha etkili olduğu mutasyonlar: M315T, M244V, E355G, F359C, H396R mutasyonlarıdır (Bradeen ve ark 2006, Nicolini ve ark 2007).

Nilotinib direnci ise T315, Y253 ve E255deki mutasyonlarıyla ilişkilidir (Jabbour ve ark 2009). Zaten şimdiye kadar T315I mutasyonuna ne nilotinib ne dasatinib ne de kombine tedavilerle yanıt alınamamıştır. Henüz araştırma aşamasında olan ON012380 enziminin T315I mutasyonu için 10nM'dan daha az konsantrasyonlarda etkili olduğu bildirilmektedir (Gumireddy ve ark 2005).

Nokta mutasyonların orijini henüz netleşmemiştir. Literatürde *BCR/ABL* gen amplifikasyonlarından ziyade nokta mutasyonlar daha yaygındır (Lestienne ve ark 2002, Jabbour ve ark 2009). Lestienne CR ve çalışma arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada 24 hastadan 3 ünde (%12.5) T315I mutasyonunu rapor etmişlerdir. Gorre ve ark ise 25 hastadan 6'sında T351I mutasyonu tespit etmişlerdir. Avrupalıların çalışmasında ise 44 hastada %0 mutasyon tespit etmişlerdir (Hochhaus ve ark 2001). Mevcut çalışmamızda ise 67 hastadan 1 'inde (%1.50) T315I mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyonun sıklığının populasyondan populasyona değiştiği görülmektedir. Bu nedenle daha geniş hasta gruplarında T315I mutasyon sıklığı ortaya konularak klinik önemi belirlenmelidir.

Yapılan invitro çalışmalarında yükseltilen imatinib dozlarına karşı KML hücrelerinde belirgin BCR/ABL protein seviyesi artışı (aşırı ekspresyonu) gözlenmiştir. Buna karşın dirençli olguların çok az kısmında (%18) gen amplifikasyonu bildirilmiştir (thd.org.tr 2010).

BCR/ABL den bağımsız bir başka olgu ise klonal sitogenetik değişimdir. Kronik fazdaki olguların %5 inde ilave kromozom anomalileri gözlenirken akselere fazda ve blast krizindeki olguların %75-85 inde ilave kromozom bozuklukları gözlenir. En çok gözlenen sekonder anomaliler trizomi 8, trizomi 19, ilave Ph kromozomu, izokromozom 17 ve delesyon 7q'dur (Jabbour ve ark 2010, Serpa ve ark 2010). Bu anomalilerden en az bir tanesi transforme olguların %70-75'inde gözlenir. Daha az sıklıkta (olguların %15 inde) ise; monozomi 7, 17 ve Y kaybı bulunmaktadır. Philadelphia negatif hematopoezde de klonal değişim olabilir. Bu fenomen daha önce interferon tedavisi gören olgularda da bildirilmiştir (Serpa ve ark 2010). İmatinib tedavisi gören olgularında %2-17 sinde bildirilmektedir. Sıklıkla trizomi 8 ve trizomi 7, Ph kromozomu görülmeyen metafazlarda gözlenir. Bu Ph negatif klonal değişim özellikle kromozom 7'nin yeniden düzenlenmeleri, tedaviye sekonder AML gelişim riskini artırmaktadır (thd.org.tr 2010).

Doss ve arkadaşları 2008 yılında *ABL* genindeki nsSNP'lerin (sinonim olmayan SNP) rolünü incelemişler, toplam *ABL* geninde 827 SNolduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan 3 tanesi 5'UTR da, 27 tanesi de 3'UTR da olmak üzere 30 tanesi de kodlanmayan bölgelerdedir. Diğerleri ise intronik bölgelere lokalizedir. *ABL* genindeki nokta mutasyonları belirlemek ve non sinonim SNP leri analiz eden bu çalışmada 18 nsSNP den 8 i zararlı 3 ü ise delete bulunmuştur. 3'UTR daki 6 SNP'nin ise fonksiyonel önemi olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle *ABL* genindeki 159 ve 178 nci pozisyonlardaki mutasyonların KML de önemli olabileceği de düşünülmektedir.

Gaillard ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada 63 hastada exon 7 delesyonuna bakılmış ve 34 hastada *BCR/ABL* füzyon geninde exon 7 delesyonun mevcut olduğu belirtilmiştir. Ancak bunun alternatif splicing mekanizmalarından kaynaklandığını ve ilaca dirençten bağımsız olduğunu rapor etmişlerdir.

Zheng X ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada Ph(+) ALL hastalarının hepsinde p96 (96 kDa) füzyon proteininin eksprese olduğunu ve bunun ALL'nin başlangıcında ve gelişiminde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada t(9;22)'nin sonucu sadece *BCR/ABL* füzyon geninin oluşmadığı aynı zamanda iki lökomojenik füzyon proteininin de (*BCR/ABL* ve *ABL/BCR*) meydana geldiğini deneylerle göstermişlerdir. Hem ABL hem de *BCR* füzyon proteinleri farklılaşmanın bloklanmasıyla karakterize olduğu için invitro lösemik fenotipi indükleyebileceği bildirilmiştir.

Literatür ile karşılaştırıldığında mevcut çalışmada da parelel sonuçlar elde edilmiştir. Toplamda 67 vakadan 14'ünde incelediğimiz 5 mutasyondan biri bulunmuştur. Hastalarımızın 3'ünde F311I mutasyonu, 7'sinde F317L mutasyonu, 2'sinde M351T mutasyonu, 3'ünde F359V mutasyonu ve 1'inde de T315I mutasyonu tespit edilmiştir. İki hastada ise iki mutasyon birlikte bulunmuştur. Her iki hasta da pediatri kliniğinde tedavi görmektedir. Hastalardan birinde M351T ve F317L mutasyonu bulunurken diğerinde T315I ve F317L mutasyonu tespit edilmiştir. M351T ve F317L mutasyonu olan hasta 18 ay imatinib tedavisi aldıktan sonra relaps olmuştur. PZR ürünlerinin enzim kesimi sonucunda en fazla tespit ettiğimiz mutasyon F317L mutasyonudur. Çalışmamızda 16 pediatri hastasından 5'inde F317L mutasyonu tespit edilmiştir. Yetişkin vakalardan ise ikisinde F359V mutasyonu bulunmuştur.

Lange T ve ark'nın 2005 yılındaki çalışmasında 177 hastadan % 20.9'unda T315I mutasyonu bulunmuştur. Bu oranı %19.2 ile E255K ve %15.3 ile de M351T izlemektedir. Ancak mutasyonların sıklığının populasyandan populasyona değiştiğini göz önüne aldığımızda mevcut çalışmamızda 67 hastadan sadece 1'inde T315I mutasyonu ve 3 hastada da M351T mutasyonu belirlenmiştir. BCR/ABL kinaz mutasyonlarının başında fosfat bağlamadan sorumlu bölge olan P-loop gelir. P-loop mutasyonları imatinib bağlanma bölgesi üzerinde bulunur, P-loop'unun esnekliğini değiştirir. İmatinibin bağlanması için gereken konformasyonun stabilitesini bozar. P-loop mutasyonlarında klinik seyir daha kötü, sağkalım daha kısadır (Branford ve ark 2003).

Mutasyonlar klinik ile birlikte değerlendirilmelidir. Tüm mutasyonlar aynı klinik ve biyokimyasal özellik göstermez. Bazı mutasyonlar fonksiyonel olmayabilir.

T315I ve P-loop mutasyonu büyük oranda dirence neden olur. T315I mutasyonu yüksek affinitede imatinib bağlanması için gerekli H bağını ortadan kaldırır ve ATP bağlanma bölgesinde değişikliğe neden olur. Klinik gözlenen mutasyonların %15-20'sini oluşturur. İmatinib dozunun artırılması etkili değildir. Dasatinib, nilotinib, bosutunib gibi yeni nesil tirozin kinaz inhibitörleri de T315I mutasyonuna sahip hastalarda *BCR/ABL* seviyesini düşürmede etkili değildir (Kim ve ark 2009). *BCR/ABL* seviyesiyle ilişkili bir dizi çalışmada toplam lösemi hücre kütlesinin iyi bir indikatör olduğu hastalarda *BCR/ABL* seviyesi izlenmiştir. *BCR/ABL* kinaz alanlarında mutasyon olan hastalarda B*CR/ABL* seviyesinde önemli derecede artış gözlenmiştir (Hughes ve ark 2009).

Elde edilen verilere göre KML ve ALL'li hastalarda imatinib'e direnç oluşturan mutasyonların ve klinik yönünün belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

KML (Kronik Myeloid Lösemi), *BCR/ABL* füzyon geninin bulunmasıyla karakterize bir lösemi tipidir. ABL geninin proteini, hücre içinde tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. *BCR/ABL* gen füzyonu, tirozin kinaz aktivitesinin artmasına

neden olur. Artan tirozin kinaz aktivitesini engellemek için farklı tedavi yöntemleri ortaya konulmuştur. Tirozin kinaz ailesini inhibe eden, sentetik ürünlerin geliştirilmesi ile hastalık tedavi edilmektedir. Ancak ilaçlarla tedavi sonrasında hematolojik ve sitogenetik cevap alınmasına rağmen bazı hastalarda ilaçlara karşı direnç gözlenmektedir. Bu bağlamda *BCR/ABL* gen füzyonunun yanı sıra bu genlerdeki nokta mutasyonların belirlenmesi önem arz etmektedir.

BCR/ABL füzyon genindeki nokta mutasyonlarının sıklığı, çeşiti ve buna bağlı olarak hastalığın etiyolojisi ve tedaviye cevapta etki mekanizmaları halen tam olarak bilinmemekte ve vakalar ile yayınlanan çalışmalar arasında çok farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu nedenle ilaçlara direncin moleküler temelinin anlaşılabilmesi için özellikle *BCR* ve *ABL* genlerindeki mutasyonların daha detaylı ve geniş populasyonlarda araştırılması gerekmektedir.

Mevcut çalışmamızda da kan ve kemik iliği örneklerinden başarılı bir şekilde önce lökosit ardından RNA ve en son cDNA izolasyonu yapılmıştır. Hücre hattı olarak kullanılan K562 ve Raji hücre kültürlerinden de RNA ve cDNA izolasyonu tamamlanmıştır. KML ve ALL' li hastalarda *BCR ve ABL* gen füzyonundaki değişiklikler (örn. mutasyonların) araştırılmıştır. Sonuçlarımız, en uygun tedavi şeklinin belirlenmesi açısından, *KML* hastalarında direncin erken dönemde tanımlanmasının önemi düşünüldüğünde, mutasyon tipinin belirlenmesiyle, mutasyona uygun tedavi şeklinin planlanmasına katkı sağlanabileceğini göstermektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALL ve KML' li Hastalarda *BCR* ve *ABL* Genlerindeki Mutasyonların İncelenmesi

Vasfiye Betül KOCABIYIK

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA- 2011

KML (Kronik Miyeloid Lösemi), Ph kromozomu ve *BCR/ABL* füzyon geninin bulunmasıyla karakterize bir lösemi tipidir. Bu anomali ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi)'li çocuklarda da gözlenmektedir. *BCR/ABL* füzyon geni, kromozom 9 ile 22 arasında karşılıklı translokasyon sonucu oluşmaktadır. *ABL* ve *BCR* genleri üzerindeki kırılma noktası değişebilmektedir. Bu nedenle değişik moleküler kütlelere sahip füzyon protein kinaz ürünleri meydana gelmektedir.

Hastalarda *BCR/ABL* gen füzyonunun yanı sıra *ABL* ve *BCR* genlerinde farklı yapıda büyük delesyonlar ve mutasyonlar rapor edilmiştir. Bu delesyonların, hastanın prognozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu genler üzerindeki mutasyon tiplerinin de belirlenmesi, tanı sonrası tedavi ve tedavi takibinde, tedaviye yanıt için önemlidir. KML ve ALL'li hastalarda direncin erken dönemde tanımlanması ve optimal tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önemi bilinmektedir.

Bu çalışmada, t(9;22) translokasyonu mevcut, sitogenetik ve/veya *BCR/ABL* füzyon analizi için fluoresan ın situ hibridizasyon (FISH) sonuçları olan 67 hastanın PZR-RFLP metoduyla *BCR/ABL* füzyon genindeki mutasyonlar analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Philadephia (+) hücre hattı K562, negatif kontrol olarak da Burkitt Lenfoma hastalarından elde edilen Philadephia (-) hücre hattı olan Raji kullanılmıştır. Nokta mutasyon analizi için vakaların kan ve/veya kemik iliği örneklerinden izole edilen *BCR/ABL* füzyon RNA'sı üzerinde toplam 5 mutasyon incelenmiştir. 67 hastadan 14'ünde mutasyon tespit edilmiştir. Bunlar; 7 hastada F317L, 3 hastada F311I, 2 hastada M351T, 1 hastada T315I ve 3 hastada da F359V mutasyonlarıdır. Bununla birlikte iki hastanın birinde M351T ve F317L mutasyonu, diğerinde ise T315I ve F317L mutasyonları tespit edilmiştir. İlaçlara direncin moleküler temelinin anlaşılabilmesi için özellikle *BCR* ve *ABL* genlerindeki mutasyonların daha ayrıntılı ve geniş populasyonlarda araştırılması gerekmektedir. Sonuç olarak, en uygun tedavi şeklinin belirlenmesi açısından, *KML* ve ALL'li hastalarda mutasyon tipinin belirlenmesiyle, mutasyona uygun tedavi şeklinin planlanmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Lösemi; KML ve ALL; *BCR/ABL*; Philadephia kromozomu; PZR-RFLP.

7. SUMMARY

Investigation of Mutations in ABL and BCR Gene in *BCR/ABL* Transcript of Patients with ALL and CML

Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is characterized as a presence of the *BCR/ABL* gene fusion or Ph chromosome. This abnormality also can be seen in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The *BCR/ABL* fusion gene is a result of reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. The break points can be changed on *BCR* and *ABL* genes. Therefore, the products of fusion gene are different molecular weights.

Different size deletions, mutations are seen in *ABL* and *BCR* genes along with the presence of the *BCR/ABL* fusion gene. These deletions are associated with patient's prognosis. Determination of certain mutations in these genes is considered as a indicator for diagnosis, treatment and follow up treatment response. To acquisition optimum treatment manners, considering to porminence of early identification of resistance in CML patients, accurate determining of the mutation types is useful for apply a reasonable treatment.

In this study, 67 patients with t(9; 22) translocation and *BCR/ABL* fusion gene mutations was analized by using PCR-RFLP technique. Cell line K562 and cell line Raji (Burkitt Lymphoma) were used for Philadelphia positive and negative controls, respectively. RNA was isolated from peripheral blood or bone marrow samples of patients with either CML or ALL. A total five mutations were examined on *BCR/ABL* transcript by using PCR-RFLP technique. These mutations are F317L, F311I, M351T, T315I and F359V. Fourteen of 67 patients showed these mutations either alone or along with other mutations. This mutations include F317L in 7 patients, F311I in 3 patients, M351T in 2 patients, T315I in one patient and F359V mutations in 3 patients and also M351T and F317L in one patient, T315I and F317L in the other patient.

As a conclusion, in order to determine the best treatment protocol, the mutation types on *BCR/ABL* transcript is very important. This may help suitable treatment protocol for both classic and new generation tyrosine kinase inhibitors, treatment, follow up the patients with *BCR/ABL* positive patients during the therapy.

Key Words: Leukemia; CML and ALL; *BCR/ABL*; Philadephia chromosome; PCR-RFLP

8. KAYNAKLAR

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi Kitabı. 4.Baskı. 2008 Tüba yayınevi

2. Arnold K. After 30 years of laboratory work, a quick approval for STI571. J Natl Cancer Inst 2001;93:972

3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A. Chronic Myeloid Leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. J Clin Oncol 2009;27:6041-6051

4. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Alpelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M. Evolving conceptsin the management og chronic myeloid leukemia. Blood 2006;108:1809-1820

5. Bolin RW, Robinson WA, Sutherland J, Hamman RF. Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia. Cancer 1982;50:1683-1686

6. Bradeen HA, Eide CA, O'hare T, Johnson KJ, Willis SG, Lee FY, Druker BJ, Deininger MW. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib in an N-ethyl-N-nitrosourea-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. Blood 2006;108:23332-2338

7. Branford S, Rudzki Z, Wals S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood 2003;102:276–83.

8. Branford S,Rudzki Z,Walsh S,Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, Hughes TP. High frequency of point mutatıons clustered within the ATP binding region of BCR-ABL in CML and Ph-positive ALL patients who develop imatinib(STI571) resistance. Blood 2002;99:3472-5

9. Bubnoff N, Duyster J. Chronic Myelogenous Leukemia:Treatment and monitoring. Medicine 2010;107: 114–21

10. Cannella L, Breccia M, Stefanizzi C, Napoleone L, Santopietro M, Alimena G. Dasatinib overcomes imatinib and nilotinib failure in philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia with different mechanisms of resistance. Leuk Lymphoma 2009;50:848-850

11. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, Howe G, Kaldor J, Muirhead CR, Schubauer-Berigan M, Yoshimura T. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. BMJ 2005;331: 77.

12. Copland M. Chronic Myelogenous Leukemia stem cell: What is new? Hematologic malignancy reports 2009;4:66-73

13. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartman CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. Nature 1982; 300:765-7

14. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood 2005;105:2640-53

15. Doğan L,Güç D. Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser. Hacettepe Tıp Dergisi 2004;35:34-42

16. Doi Y, Sasaki D, Terada C, Mori S, Tsuruda K, Matsuo E, Miyazaki Y, Nagai K, Hasagawa H, Yanagihara K, Yamada Y, Kamihira S. High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene. Int J Hematol 2009;337:1007-1016

17. Doss C, Sudandiradoss C, Rajasekaran R, Purohit R, Ramanathan K, Sethumadhavan R. Identification and structural comparison of deleterious mutations in nsSNPs of ABL1 genein chronic myeloid leukemia: A bio-informatics study. Journal of Biomedical Informatics 2008;41:607-612

18. Druker B.Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML.Blood 2008;112:4808-4817

19. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F. Five year follow-up of patients 534 receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Eng J Med. 2006;355:2408-2417

20. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat. Med. 1996; 2: 561–66.

21. Duran B. Direnç Mekanizmalarının saptanması değerlendirilmesi.www.thd.org.tr. Erişim Tarihi: 24.12.2010

22. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. Ann Intern Med 1999;131:207-219

23. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. NEJM 1999;341:164-172

24. Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, Canaani E, Gale RP, Dreazen O, Smith SD, Croce CM. A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. Nature 1987; 330:386-388

25. Fröhling S, Döhner H. Chromosomal Abnormalities in Cancer. N Eng J Med 2008;359:722-34

26. Gaillard JB, Arnould C, Bravo S, Donadio D, Exbrayat C, Jourdan E, Reboul D, Chiesa J, Lavabre T. Exon 7 deletion in the bcr-abl gene is frequent in chronic myeloid leukemia patients and is not correlated with resistance against imatinib. Mol Cancer Ther 2010;9:3083-9

27. Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, Jackson AL, Carleton MO, Linsley PS, Cleary MA, Chau BN. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-ınducible microRNAs, miR-192 and miR-215.Cancer Res.2008;15:10105-12

28. Goldman JM, Marin D. Management of chronic myeloid leukemia. Semin Hematology 2003;40:1-103

29. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. NEJM 2003;349:1451-1464

30. Golemevic M, Verstovsek S, Giles F, Cortes J, Manshouri T, Manley PW, Mestan J, Dugan M, Allan D, Griffin JD, Arlinghaus RB, Sun T, Kantarjian H, Beran M. AMN107, a nowel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib resistance chronic myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2005;11:4941-7

31. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused byBCR/ABL gene mutation or amplification. Science 2001;293:876-80

32. Gralnick HR, Galton DAG, Catousky D, Sultan C, Bennett JM. Classification of acute leukemia. ANN İNTERN MED.1997; 87: 740-753

33. Gumireddy K, Sun F, Klein-Szanto AJ, Gibbins JM, Gimotty PA, Saunders AJ, SChultz PG. İn vivo selection for metastasis promoting genes in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 2007;17:6696-701

34. Haznedaroğlu İ. Kronik Myelofibrozis. www.thd.org.tr. Erişim Tarihi: 01.01.2011

35. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartmam CR, Grosveld G. Localization of the c-Abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. Nature 1983;306:239-242

36. Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R. Selective inhibition of tyrosine kinases-a new therapeutic principle in oncology. Oncologie 2001;5:65-71

37. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology kitabı. 6.Baskı.

38. Hofmann WK, Jones LC, Lemp NA, de Vos S, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann OG, Koeffler HP. Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation. Blood 2002;99:1860-1862

39. Houchaus A, Rosee PL, Müller MC, Ernst T, Cross NC. Impact of BCR-ABL mutations on patients with chronic myeloid leukemia. Cell cycle 2011;10:250-60

40. Hughes T, Branford S. Measuring minimal residual disease in CML:Flourescence In Sıtu Hybridization and Polymerase Chain Reaction. Clinical Lymphoma & Myeloma. 2009; 22:S266-S271

41. Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Long-Term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia. Cancer 2010;000: 1-9

42. Jabbour E. Imatinib: high dose versus standart dose. Clin Adv Hemetol Oncol. 2009;12:812-4

43. Joensuu H, Roberts PJ, Sarloma-Rıkala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R. Effect of the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 in a Patient with a Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. N Engl J Med 2001; 344:1052-1056

44. Kantarjian H, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, Ossenkoppele GJ, Nicolini FE. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor is effective in patients with Philadelphia chromosomepositive chronic

myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. Blood. 2007;110: 3540-3546.

45. Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Giles F, Rios MB, Shan J, Letvak L. High dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. Blood 2004;103:2873-2878

46. Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer. Am J Surg 2003;186:264-8

47. Kim JA.Targeted therapies for the treatment of cancer.Am J Surg 2003;186:264-8

48. Kim SH, Kim D, Kim DW, Goh HG, Jang SE, Lee J, Kim WS, Kweon IY, Park SH. Analysis of Bcr-Abl kinase domain mutations in Korean chronic myeloid leukaemia patients: poor clinical outcome of P-loop and T315I mutation is disease phase dependent. Hematological Oncology 2009;10:894-1002

49. Lange T, Park B, Willis S, Deininger MWN. BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. Cell Cycle 2005;4:1761-1766

50. Lechner M, Boshoff C, Beck S. Cancer Epigenome. Science 2010;70:247-276

51. Lestienne R, Quenet B, Bouret S, Parodi O. Functionality of divergence and convergence in a model of the insect olfactory system. Biol Cybern 2002;87-220-9

52. Lugo TG, Pendergas AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-Abl oncogene products. Science 1990;247:1079-1082

53. Maekawa T, Ashihara E, Kimura S. The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. Int J Clin Onco 2007;12:327-340

54. Mizuta S, Matsua K, Yagasaki F, Yujiri T, Hatta Y, Kimura Y, Ueda Y, Kanamori H, Usui N, Akiyama H. Pre-transplant imatinib-based therapy improves the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2010;228:1-7

55. Müftüoğlu E. Klinik Hematoloji kitabı.1986. Dicle Üniv.Tıp Fak.Yayınları No:12

56. National Cancer Institute.www.cancer.gov.tr. Erişim Tarihi: 22.12.2010

57. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Chronic Myelogenous Leukemia. Version 2.2010. Erişim Tarihi 23.12.2010

58. Nicolini FE, Chabane K, Tigaud I, Michallet M, Magaud JP, Hayette S. BCR-ABL mutant kinetics in CML patients treated with dasatinib. Leukemia Research 2007;31:865-868

59. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science 1960;132:1497.

60. O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM. International randomized study of interferon versus STI571(IRIS) 7 year follow-up: sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with imatinib(IM)(abstract).Blood 2008;112.Abstract 186

61. Pawson T,Raina M,Nash P.İnteraction domains:From simple binding events to complex cellular behavior.FEBS Letters 2002;513:2-10

62. Plakova KM, Lopotova T, Klamova H, Moravcova J. High-Resolutıon melt curve analysis: Initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain. Science 2008;8:1016-1022

63. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. Blood 2009;113:1619-1630

64. Quintas-Cardama A, Kantajian H, Jones D, Nicaise C, O'Brien S, Giles F, Talpaz M, Cortes J. Dasatinib is active in philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib therapy failure. Blood 2007;109:497-499

65. Radford I.R.Chromosomal Rearrangement as the basis for human tumourigenesis. Int.J.Radıat.Bıology 2004;8:543-557

66. Ramirez P, Dipersio J.F. Therapy options in imatinib failures. The Oncologist 2008;13:424-434

67. Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. Br J Cancer 2007;96: 1127-1134.

68. Robert L, Roderick R, Huntington F, Cornelius F. Thompson & Thompson. 6.Baskı. 2005;69-78

69. Robinson LL. Environmental eksposures as risk factor for chilhood ALL. Cancer Research. 1987; 28: 249-255

70. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243:290-3.

71. saglık.gov.tr. Kadın ve erkeklerde karşılaşılan kanser türleri. www.saglık.gov.tr. Erişim Tarihi: 23.11.2010

72. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the Bcr-Abl oncogene. Semin Hematol 2003;40: 4-10

73. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F. Imatinib induced hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood 2002;99:3530-3539

74. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. NEJM 1999; 340:1330-1340

75. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science 2000;289:1938-1942

76. SEER Cancer Statistics Review 2007. www.seer.cancer.gov.tr. Erişim Tarihi: 24.12.2010

77. Serpa M, Sanabani SS, Dorliac-Llacer PE,Conchon M, Pereira TD, Nardinelli L, Costa JL, Novaes MM. Molecular measurement of BCR/ABL transkript variations in chronic myeloid leukemia patients in cytogenetic remission. BMC 2010;10:2-8

78. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Pataquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple Bcr-Abl kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571)in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2002;1:117-125

79. Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. Mol Cell 2003;12:27-37

80. Soverini S, Martinelli G, Colarossi S, Gnani A, Castagnetti F, Rosti G, Bosi C, Paolini S, Rondoni M, Piccaluga PP, Palandri F, Giannoulia P, Marzocchi G, Luatti S, Testoni N, Lacobucci I, Cilloni D, Saglio G, Baccarani M. Presence or the emergence of a F317L BCR-ABL mutation may be associated with resistance to dasatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemia. J Clin Oncol 2006;20:24-33

81. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Bassi S, Amabile M, Poerio A, Giannini B, Trabacchi E, Castagnetti F. Abl mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival. J Clin Oncology 2005;23:4100-4109

82. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicol j, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, M. Blackwood-Chirchir A, Iyer V, Chen T, Huang F, Decillis A.P,Sawyers C.L. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. N Engl J Med 2006;354:2531-41.

83. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C. Dasatinib in İmatinib-resistant Philadelphia chromosome-Positive Leukemias. N Eng J Med 2006;354:2531-41

84. tuba.gov.tr. Hematopoietik kök hücre oluşumu. www.tuba.gov.tr. Erişim Tarihi: 23.12.2010

85. turkkanser.org.tr. Philadelphia kromozomunun oluşumu. www.turkkanser.org.tr. Erişim Tarihi: 21.12.2010

86. Tükün A. Hematolojik malignansilerde genetik uygulamaların yeri. THD Kursu

87. Türk Hematoloji Derneği 35.Ulusal Hematoloji Kongresi www.thd.org.tr. Erişim Tarihi 25.12.2010

88. Vrijheid M, Cardis E, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, Howe G, Kaldor J, Muirhead CR, Schubauer-Berigan M. The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: estimates of radiation-related cancer risks. Radiat Res 2007;167: 396-416.

89. Wetzler M, Talpaz Z,et al. CML: Mechanism of disease initiation and progressıon. Leukemia & Lymphoma,1993;11:47-50

90. Wolf K, Dornoyer M. Information-based methods in the development of antiparasitic drugs. Parasitol Res. 2002;2:91-6

91. Yasavul Ü, Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Kitabı.2003.Hacettepe basımevi.

92. Zheng X, Güller S, Beissert T, Puccetti E, Ruthardt M. BCR and its mutants, the reciprocal t(9;22)-associated ABL/BCR fusion proteins, differentially regulate the cytoskeleton and cell motility. BMC Cancer 2006;6:262

93. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore M, Ruthardt M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR fusıon proteins: Leukemogenic potential and effects on B cell commitment. Plos One 2009;4:1371

94. Zou X, Calame K. Signaling Pathways Activated by Oncogenic Forms of Abl Tyrosine Kinase. The Journal of Biological Chemistry 1999;274:18141-18144.

9. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Konya'da doğdu. İlkokulu Özel Envar İlköğretim Okulu'nda, Ortaokulu Karma İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise öğrenimini Cemil Keleşoğlu (Y.D.A.) Lisesinde okul birincisi olarak 2004 yılında tamamladı. Selçuk Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesini 2004 yılında kazandı. Aynı

fakülteden 2008 yılında bölüm derecesiyle mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.