TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMATİNİB TEDAVİSİ ALAN KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA T315I , E255K ve M351T MUTASYONLARININ SAPTANMASI

Bio. Dilara AKÇORA

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Yrd.Doç.Dr. O.Sena AYDOS

2007, ANKARA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi hazırlamam esnasında bana verdikleri sonsuz destek ve gösterdikleri fedakarlık ve anlayıştan dolayı canım anneme, babama ve kardeşime, yardımlarını esirgemeyen ve desteğini her zaman hissettiğim danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. O. Sena AYDOS'a, başından beri deneyimi ve iyi niyetiyle bana yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, öğrettiklerinden ve desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Ahmet KADIKIRAN'a, sonuçların istatiksel değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Yasemin GENÇ'e, laboratuar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen, her konuda deneyimleri ile yol gösteren Sayın. Dr. Bio. Aydın RÜSTEMOV ve Sayın Arş. Gör. Dr. Bio. Güvem Gümüş AKAY'a, Sayın Sibel ARAT'a, her konuda bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Sayın Bio. Nuray VAROL'a, tezimin son aşamasında yardımlarından dolayı Sayın Uzm.Bio. Selcen ÇELİK, Uzm. Bio.Tülin ÖZKAN'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dilara AKÇORA

İÇİNDEKİLER

KABULve ONAY i
ÖNSÖZ ii
İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR iv
ŞEKİLLER v
ÇİZELGELER vi

1.GİRİŞ

1.1. Lösemi 1
1.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML) 2
1.3. ABL Geninin Yapısı ve Proteininin Fonksiyonu 4
1.4. BCR Geninin Yapısı ve Proteini 6
1.5. BCR-ABL Translokasyonunun Moleküler Anatomisi 7
1.6. BCR-ABL Proteini 9
1.6.1. BCR-ABL'ın Adezyon Özelliklerini Değiştirmesi 10
1.6.2. Mitojenik Sinyalizasyonun Aktivasyonu 10
1.6.3. Apoptozis İnhibisyonu 13
1.7. KML'de Tedavi Yöntemleri 13
1.7.1. Konvansiyonel Tedavi 13
1.7.2. Allogenik Kök Hücre Transplantasyonu 14
1.7.3. İnterferon α 14
1.7.4. KML Tedavisinde Imatinib mesylate 15
1.8. Imatinib'e Karşı Direnç Gelişmesi 17
1.9. Amaç. 21

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu 22
2.1.1. Kullanılan Hücre Serileri 22
2.2. DNA İzolasyonu 23
2.3. DNA'nın Kantitasyonu. 25
2.4. ASO-PCR (Allel Spesifik Olügonükleotid- Polimeraz Zincir Reaksiyonu). 25
2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi 29

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Grubu 30
3.2. Sonuçların Değerlendirilmesi 30

4. TARTIŞMA 37

5. SONUÇLAR 42

ÖZET 43

SUMMARY 44

KAYNAKLAR 45

EK 49

ÖZGEÇMİŞ 50

KISALTMALAR

ABL	**Ab**e**l**son
AGP	α1 **a**sid **g**liko**p**rotein
ALL	**A**kut **L**enfoid **L**ösemi
ASO-PCR	**A**llel **S**pesifik **O**ligonükleotid PCR
Atm	**A**taxia **t**eleangiectasia **m**uted
ATP	**A**denozin **T**rifosfat
BCR	**B**reakpoint **C**luster **R**egion
Ca^{+2}	Kalsiyum
CaLB	**Ca**lcium-dependent **l**ipid **b**inding
CBL	**C**asitas-**B**-lineage **l**ymphoma protein
dNTP	**D**eoksi Ribo**n**ükleotit **T**rifosfat
EDTA	**E**tilen **D**iamin **T**etraasetik **A**sit
EtBr	**Et**idyum **Br**omür
EtOH	Etil Alkol
GDP	**G**uanidin **d**ifosfat
Grb- 2	**G**rowth factor **r**eceptor-**b**ound protein 2
GTP	**G**uanidin **t**rifosfat
IFN-γ	**İ**nter**f**ero**n** Gama
Ile	**I**so**le**ucine
kD	**K**ilo**d**alton
KML	**K**ronik **M**yeloid **L**ösemi
M	**M**olarite
M-BCR	**M**ajör **b**reakpoint **c**luster **r**egion
mL	**M**ili**l**itre
mM	**M**ili**m**olar
Myc	**My**elositomatozis Onkogeni
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NES	**N**uclear **E**xport **S**ignals
NF-κB	**N**uclear **F**actor-κB

NLS	**N**uclear **L**ocalization **S**ignals
Ph	**Ph**iladelphia
PI3K	**F**osfatidil**i**nositol 3-**K**inase
PKC	**P**rotein **k**inaz **C**
pmol	**P**iko**m**ol
Rb	**R**etino**b**lastoma
SDS	**S**odyum **D**odesil **S**ülfat
STAT	**S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription
STE	**S**odyum **T**ris **E**DTA
TE	**T**ris **E**DTA
Thr	**Thr**eonin
µL	**M**ikro**l**itre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.1. Löseminin oluşum mekanizması.....2
Şekil 1.2.1. Philadelphia kromozomu; t (9;22) (q34;q11).....4
Şekil 1.3.1. ABL proteininin yapısı.....5
Şekil 1.4.1. BCR proteininin yapısı.....7
Şekil 1.5.1. ABL ve BCR genleri içindeki kırık noktalarının lokalizasyonu ve çeşitli kırıklardan türeyen kimerik mRNA'ların yapısı.....8
Şekil 1.6.1. BCR-ABL'ın tetiklediği KML oluşumuna karışan mekanizmalar.....9
Şekil 1.6.2. BCR-ABL'ın etkilediği sinyal iletim yolakları..... 11
Şekil 1.7.4.1. Imatinib'in kimyasal şekli.....15
Şekil 1.7.4.2. Imatinib'in etki mekanizması.....16
Şekil 1.8.1. İmatinib'e karşı klinik direnç ile ilişkili BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarının haritalanması 20
Şekil 1.8.2. İmatinib ile kompleks halde bulunan ABL kinaz domaininin yapısı ve BCR-ABL'a imatinib direncini kazandıran mutasyonel sıcak noktalar.....21
Şekil 2.4.1. Allel Spesik Oligonükleotid PCR'ın İşleyiş Mekanizması 25
Şekil 3.2.1. T315I mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü.....33
Şekil 3.2.2. E255K mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü.....34
Şekil 3.2.3. M351T mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü.....34

ÇİZELGELER

Çizelge 2.4.1. T315I Mutasyonu için PCR 27

Çizelge 2.4.2. E255K Mutasyonu için PCR Şartları 27

Çizelge 2.4.3. M351T Mutasyonu için PCR Şartları 28

Çizelge 2.4.4. ASO-PCR'da Kullanılan Primerlerin Sekansı 28

Çizelge 2.4.5. ASO- PCR Sonucunda Elde Edilen Ürünlerin Büyüklüğü 29

Çizelge 3.2.1. Saptanan Mutasyonların Sıklığı ve Mutasyon Analizi Sırasında Hastalık Evresi ile Olan İlişkisi 30

Çizelge 3.2.2. T315I ve E255K Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu 31

Çizelge 3.2.3. T315I ve M351T Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu 31

Çizelge 3.2.4. M351T ve E255K Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu 32

Çizelge 3.2.5. Dirençle İlişkili Mutasyon Saptanan Tüm Hastaların Klinik Bilgilerinin Özeti 35

Çizelge 3.2.6.. Dirençle İlişkili Mutasyon Saptanmayan Hastaların Klinik Bilgilerinin Özeti 36

1.GİRİŞ

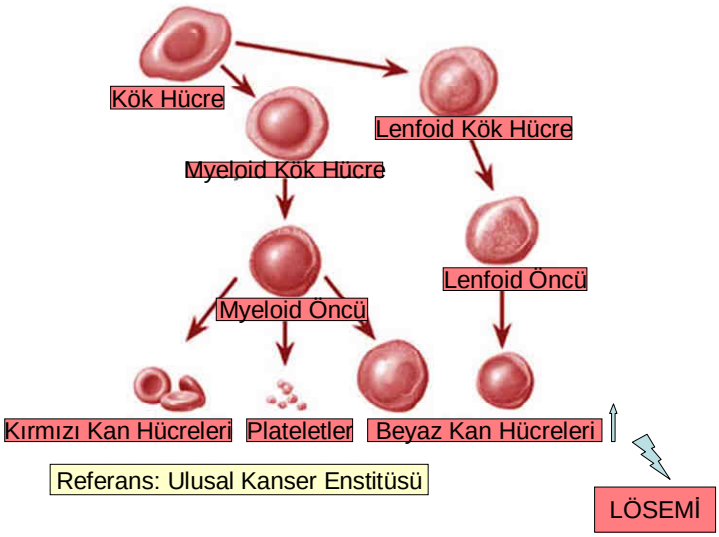
1.1. LÖSEMİ

19.yy'da Avrupalı hekimler, beyaz hücre miktarında belirgin artışa sahip hastaların en erken gözlemcileridir. 'Beyaz Kan' terimi hastalık için bir isim olarak ortaya çıkmıştır. Sonradan Yunanca'da, beyaz anlamına gelen 'leukas' ve kan anlamına gelen 'haima'dan türeyen 'leukemia' terimi bu hastalığı belirtmek için kullanılmıştır (The Leukemia & Lymphoma Society, 2003).

Lösemi, beyaz kan hücrelerinin (öncü hücrelerin ya da daha olgun hücrelerin) mutasyona uğrayarak habisleşmesi ve kontrol dışı çoğalmaları sonucu meydana gelir. Lösemik hücreler tek kök hücre (kanser kök hücre) kaynaklıdırlar, mutasyon veya kromozomal anomaliye sahiptirler, genetik kararsızlık gösterirler, önemli hücresel fonksiyonlarda (çoğalma, farklılaşma ve apoptozis) bozulmadan ve özellikle farklılaşmadan kaçış gösterirler. Lösemik hücreler büyüme avantajı kazanmışlardır ve klonal baskınlık ve yayılım gösterirler (Franks ve Teich, 2001).

Löseminin akut, kronik myeloid lösemi ve akut, kronik lenfoid lösemi olmak üzere dört major formu vardır.

Akut lösemi hızlı ilerleyen bir hastalıktır. Hücrelerin tamamen gelişimlerini ya da farklılaşmalarını etkiler. Olgunlaşmamış hücreler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Kronik lösemi ise daha yavaş ilerler. Çok sayıdaki gelişen hücrelere büyüme izni verir. Genel olarak, bu olgun hücreler normal fonksiyonlarının bazılarını yerine getirebilir. Bu sınıflama hekimlere hücre tipine özgü hangi tedavinin uygun olduğunu ve hastalığın ne şekilde ilerleyebildiğini düşünmeye olanak verir (The Leukemia & Lymphoma Society, 2003).



Şekil 1.1.1. *Löseminin oluşum mekanizması.*

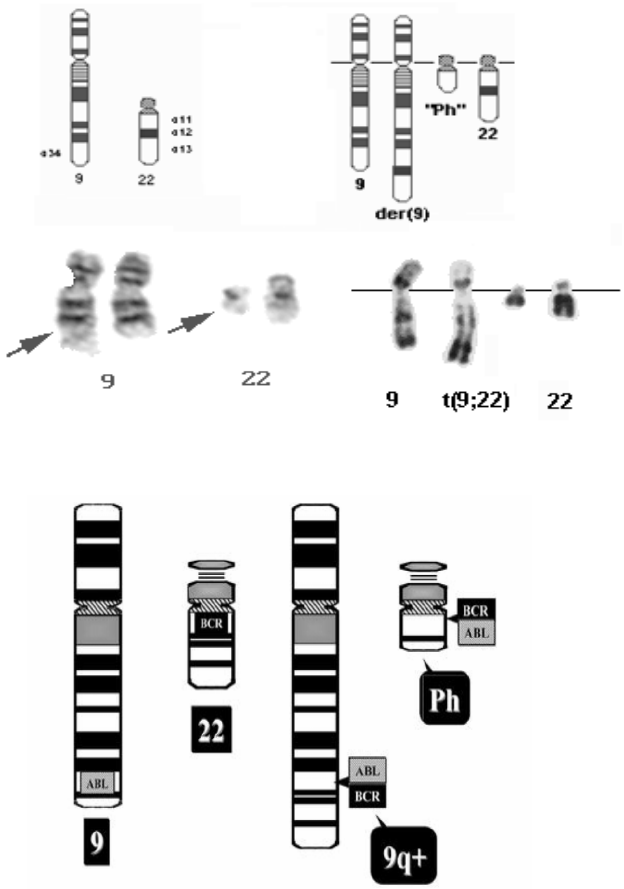
1.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

Kemik iliği, öncül hücrelerden normal beyaz kan hücrelerini, pıhtılaşmayı sağlayan hücreleri ve alyuvarları yapar. **K**ronik **M**yeloid **L**ösemi (KML)'de öncül hücrelerin yapımı fazladır, ancak bunlar olgunlaşmış işlevsel hücrelere yeterince dönüşemezler. Olgunlaşmamış bu hücreler kemik iliği ve kanda sayıca artarlar. Normalde beyaz kan hücrelerinin sayısı 50- 10.000 arası iken bu hastalıkta 50– 200.000'e ulaşan lökosit artışı görülür.

Klinik olarak KML, 2-6 yıllık bir kronik dönemi takiben akselere ve ardından blastik krize geçiş gösteren bir hastalıktır (Beksaç, 1997; Corbin ve ark., 2003). Kronik faz, kanda olgun lökosit ya da trombositler ile farklılaşmamış myeloid elementlerin varlığı ile karakterizedir. Periferik kan bulguları Lökositoz, $20x10^3$ /mm^3 ile $500x10^3$/mm^3 arasında değişmektedir. Nötrofil seri elemanları ağırlıkta olup, özelikle parçalı, band, metamyelosit ve miyelosit egemenliği vardır. Kemik iliği

bulgularında ise nötrofil seri myelositer elemanlarının egemenliği vardır. Akselere faz ise uygulanan terapiye karşı cevabın kaybedildiği ve kemik iliğinde ek kromozomal anomalilerin görüldüğü fazdır. Bu fazda periferik kanda blast oranı %5-30, kemik iliğinde ise %10-30'dur. %20 üzerinde bazofili vardır. Belirgin miyelofibrozis vardır. Blastik krizde periferik kan veya kemik iliğinde miyeloblast oranı %30'u geçer. Yine bu fazda hastaların %70-80'inde ikinci Ph kromozomu, trizomi 8, iso(17q), +19 ve Y kaybı gibi gibi ek kromozomal anomaliler ortaya çıkar. KML tüm lösemilerin %15'ini oluşturur (İlhan, 2003). Hastaların ortalama yaşı 45 ile 55 olup (Faderl ve ark., 1999) bayanlara nazaran erkeklerde hastalık daha sık görülmektedir (Beksaç, 1997).

KML , t (9;22) (q34;q11) sonucunda oluşan **Ph**iladelphia (Ph) kromozomunun varlığı ile karakterize BCR ve ABL genlerinin füzyonu ile sonuçlanan malign hematopoietik kök hücre hastalığıdır (Deininger ve ark., 2005; Melo ve ark., 2006; Sawyers ,1999). 1960 yılında Nowell ve Hungerford yedi KML'li hastanın hücrelerinde nokta akrosentrik kromozom tanımlamışlardır ve Philadelphia ismini vermişlerdir (Litzow, 2006). 1973 yılında Rowley, 9 ve 22 nolu kromozomların uzun kollarının karıştığı karşılıklı translokasyonu t (9 ; 22) rapor etmiştir (Litzow, 2006; Walz ve ark., 2005). 1980 ortalarında bu karşılıklı translokasyonun, 9. kromozom üzerinde bulunan, tirozin kinaz aktivitesine sahip olan **Ab**e**l**son (ABL) onkogeni ile 22. kromozom üzerinde bulunan bilinmeyen fonksiyona sahip, kırılma noktalarının yoğunlaştığı bölge (BCR, **b**reakpoint **c**luster **r**egion) geninin yan yana bulunması ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Şekil 1.2.1.) (Litzow, 2006). Ph kromozomu KML'li hastaların % 95'inde bulunur ve bu hastalık için ayırıcı bir belirteç olarak kabul edilir (Agirre ve ark., 2005; Bubnoff ve ark., 2003; Daub ve ark., 2004; Faderl ve ark., 1999; Litzow, 2006; Sawyers ,1999).

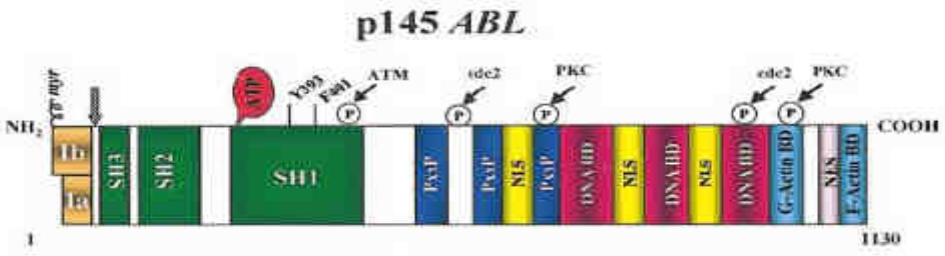


Şekil 1.2.1. *Philadelphia kromozomu; t (9;22) (q34;q11).*

1.3. ABL Geninin Yapısı ve Proteininin Fonksiyonu

9q34'de lokalize olan ABL geninin ekspresyonu sonucunda moleküler kütlesi 145-kd olan, 11 ekzona sahip ve 230 kilobaz genişliğinde ABL proteini oluşur. ABL proteinleri nonreseptör tirozin kinazlar olup sinyal iletimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. ABL'ın N-terminal segmenti üç **S**RC **H**omoloji bölgelerini (SH1,SH2 ve SH3) içerir ki, bu bölgeler ABL'ın tirozin kinaz fonksiyonunu düzenler. SH1 bölgesi oldukça önemli olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. SH2 fonksiyonunun tamamının eksikliğinde fosfotirozin bağlanmasında azalma ve ABL'ın transforme kapasitesinde düşüş görülür. SH3, tirozin kinaz fonksiyonu üzerinde negatif düzenleyici etkiye sahiptir (Deininger ve ark., 2000; Faderl ve ark., 1999). İlk ekzonun alternatif ayıklanmaya uğraması nedeniyle ABL

proteininin iki formu bulunur. Tip 1a izoformu tip 1b'den biraz daha kısa olup, tip 1b izoformu plazma zarı ile bağlantı kurmak için miristolasyon bölgesi içerir. Miristolasyon işlemi ondört karbonluk doymuş yağ asidi myristate'in, proteinlerin glisin amino asitlerinin amino terminal bölgelerine eklenmesidir. Katalitik domain ve myristolasyon sekansı ABL ile plazma zarı proteinleri arasında bağlantı kurar. ABL uzun C-terminali sayesinde diğer membran olmayan tirozin kinazlardan ayırt edilir. (Deininger ve ark., 2000; Litzow, 2006; Ren, 2005). ABL molekülünün merkezinde prolinden zengin dizi (PxxP); Crk gibi diğer proteinlerin SH3 bölgelerine, DNA-bağlanma bölgelerine (DNA-BD), nükleer lokalizasyon sinyallerine (NLS), nükleer export sinyallerine (NES) ve G- (monomerik) ve F- (filamentous) aktin- bağlanma bölgelerine bağlanır ve bu bölge ABL'ın C-terminal kısmı içinde de bahsedilebilir. C-terminal kısımda üç adet NLS, yine üç adet DNA-BD, 1 adet NES, 1 adet G-Aktin BD ve 1 adet F-Aktin BD bölgeleri yer alır. Fosforilasyon bölgeleri; **A**taxia **t**eleangiectasia **m**uated (Atm), cdc2, **p**rotein **k**inaz **C** (PKC) ve tirozin 393 (Y393)' dür. Tirozin 393 kinazın aktivasyon lopu içindeki majör düzenleyici tirozindir (Deininger ve ark., 2000; Litzow, 2006).



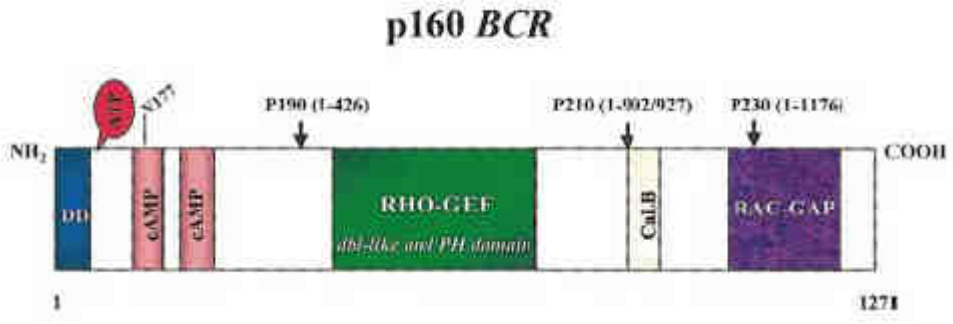
Şekil 1.3.1. *ABL proteininin yapısı.*

Normal ABL proteini hücre siklusunun düzenlenmesine, genotoksik strese karşı hücresel cevaba ve integrin sinyalizasyonu aracılığıyla hücresel çevre hakkında bilgi iletilmesine karışır. ABL proteini hücresel ölçü birimi gibi kompleks rol sağlayarak çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan sinyalleri bir bütün olarak toplar ve hücre siklusu ve apoptozise gelince kararları etkiler (Deininger ve ark., 2000). Hücre siklusunun G1 fazında yer alan hücrelerdeki c-ABL (**c**ellular-hücresel ABL)'ın nükleer havuzunun bir kısmı **R**etino**b**lastoma (Rb) proteini ile kompleks haldedir.

Bu komplekste Rb'nın C-terminal paketi ABL kinaz bölgesinin ATP-bağlanma lobuna bağlanır ve ABL kinaz aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanır. G1-S sınırında Rb'nın siklin-D-cdk4/6 kinazlarca fosforilasyonu, S fazı süresince c-ABL'ın ve ABL kinaz aktivitesinin serbest kalması ile sonuçlanır. S fazında c-ABL, RNA polimeraz II'nin C-terminal bölgesinin (CTD) fosforilasyonuna yardım edebilir böylece S fazındaki genlerin transkripsiyonunu uyarabilir. Bu gözlemler göstermiştir ki; c-ABL S fazı süresince büyümeyi uyarıcı etkiye sahiptir.

1.4. BCR Geninin Yapısı ve Proteini

BCR geninin ürünü olan ve her yerde ekspresyonu yapılan 160-kd ağırlığındaki proteinde birkaç yapısal motif betimlenmiştir. (Şekil 1. 4**.)** İlk N-terminal ekzon serin-treonin kinazı kodlar. Sadece bu kinazın substratları proteinlerin 14-3-3 ailesinin üyesi olan Bap-1 ve belki BCR'ın kendisidir. BCR'ın N-terminal bölgesinde 'coiled-coil' bölgesi in vivo ortamda dimerizasyona (Dimerizasyon Bölgesi) olanak sağlar. Molekülün merkezi dbl benzeri ve pleckstrin-homoloji (PH) bölgelerini içerir. PH bölgesi, Rho guanidin exchange faktörleri üzerindeki guanidin trifosfat (GTP)'ın guanidin difosfat (GDP)' e dönüşümünü uyarır. Rho guanidin exchange faktörleri NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayabilir. PH bölgesinden sonra **ka**lsiyum bağımlı **l**ipid **b**ağlanma bölgesi (CaLB) yer alır. C-terminal bölgesi Rac için GTPase aktivitesine sahiptir ve Rac guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak geçer. Ras süper ailesinin küçük GTPase'ı aktin polimerizasyonunu ve fagositik hücrelerde NADPH oxidase aktivitesinin düzenleyicisidir. BCR birkaç tirozin rezidüsü üzerinden özellikle tirozin 177 (Y177) üzerinden fosforlanabilir. Y177, Ras yolağının aktivasyonuna karışan önemli adaptör molekül olan **g**rowth factor **r**eceptor-**b**ound protein 2 (Grb- 2)'e bağlanır. İlginç olarak ABL'ın COS1 hücrelerinde BCR'ı fosforile ettiği bunun sonucunda BCR kinaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. Buna rağmen BCR'ın sinyal iletimindeki rolü tartışmalıdır. BCR-/- farelerin yaşayabildiği ve normal kan üretimine sahip oldukları ancak nötrofil süperoksit üretiminde artış olduğu gözlemlenmiştir (Deininger ve ark., 2000).



Şekil 1.4.1. *BCR proteininin yapısı.*

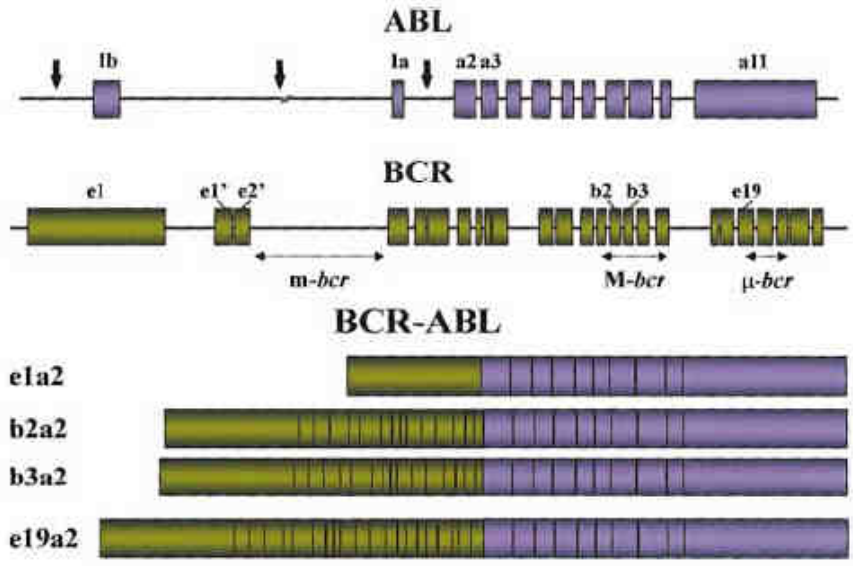
1.5. BCR-ABL Translokasyonunun Moleküler Anatomisi

Ph kromozomunun moleküler genetik incelenmesi sonucunda 9q34'de lokalize olan ABL geninin 22. kromozoma transloke olduğu gösterilmiştir (Walz ve ark., 2005). 22. kromozomdaki kırık noktalarının DNA'nın oldukça kısa bölümünde (5-6kb) meydana geldiği bulunmuştur ve buraya **b**reakpoint **c**luster **r**egion (BCR; kırık noktalarının kümelendiği bölge) denilmiştir (Walz ve ark., 2005). Doğal c-ABL tirozin kinaz kısmen nukleus içinde bulunur ve kinaz aktivitesi oldukça sıkı düzenlenir. BCR-ABL füzyonu aktif sitoplazmik tirozin kinazı teşkil eden üretimle sonuçlanır ve bu tirozin kinaz farklılaşmayı bloke edemez ancak myeloid seri hücrelerinin yaşam kabiliyetini ve proliferasyonunu arttırır (Walz ve ark., 2005). Ph translokasyonunun [t (9 ; 22) (q34 ; q11)] oluşumu sırasında ABL geni içindeki kırık noktası her zaman ABL ekzon 2'nin 5' tarafında (sentromere doğru) 300kb'lık bir alanda gerçekleşirken (a2'den a11'e kadar), BCR geni üzerindeki kırık noktası çeşitli bölgelerde gerçekleşebilir ve farklı büyüklükte hibrid anormal tirozin kinaz genleri ile sonuçlanabilir (Faderl ve ark., 1999; Litzow, 2006).

BCR geninin 12 ve 16 ekzonları (b1-b5 ekzonları olarak bahsedilir) arasında oldukça yaygın kırılma noktası, **m**ajör **b**reakpoint **c**luster **r**egion (M-BCR; majör kırık noktasının kümelendiği bölge) olup ABL'ın ekzon 2'den 11'e kadar olan kısmı bu bölgeye aktarılır ve p210 BCR-ABL olarak bilinen 210-kd geni ile sonuçlanır. KML'de klasik füzyon alternatif splicing nedeni ile BCR'ın ekzon 13 (b2) veya ekzon 14 (b3) 'ü ABL'ın ekzon 2 (a2) 'si arasında gerçekleşir ve b2a2 veya b3a2

birleşmeleri ile füzyon transkriptleri oluşur ve bu 8.5-kb'lık mRNA'dan 210kd büyüklüğündeki onkoprotein meydana gelir (Deininger ve ark., 2000; Faderl ve ark., 1999; Litzow, 2006; Walz ve ark., 2005). Bu kimerik protein, KML' nin tipik vakalarında oldukça sıklıkla görülür. BCR içindeki kırık noktaları **mi**nör BCR (m-BCR) bölgesinde oluşurken (5' tarafında) , e1 ve e2 ekzonlarının ayıklanmasıyla daha küçük olan p190 BCR-ABL olarak bilinen 190-kd BCR-ABL geni oluşur. e1a2 mRNA'sının 190-kd ağırlığındaki kimerik proteine translasyonu ise Ph kromozomu pozitif akut lenfoblastik lösemide (ALL) görülür (Faderl ve ark., 1999; Deininger ve ark., 2000; Litzow, 2006). Üçüncü kırık noktası e19 ve e20 içinde oluşur ve µ-BCR olarak bilinen bölgede gerçekleşir ve p230-BCR-ABL olarak bilinen 230-kd protein oluşur.

e19a2 füzyon geni Ph (+) kronik nötrofilik lösemi ile ilişkilidir (Faderl ve ark., 1999; Deininger ve ark., 2000; Litzow, 2006; Walz ve ark., 2005). Bu onkoproteinlerin her biri onkogen içindeki ABL'ın aynı segmentini, BCR'ın ise farklı miktarlarını içerir (Sawyers, 1999; Walz ve ark., 2005).



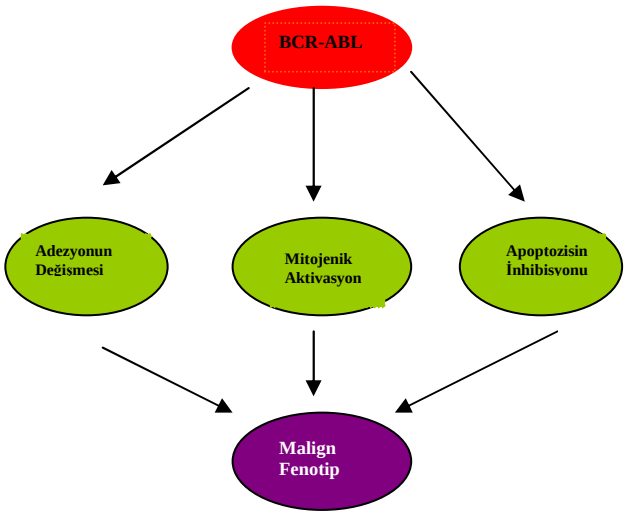
Şekil 1.5.1. *BL ve BCR genleri içindeki kırık noktalarının lokalizasyonu ve çeşitli kırıklardan türeyen kimerik mRNA'ların yapısı.*

KML hastalarında $p190^{BCR-ABL}$ ekspresyonu monositozis ile ilişkilendirilirken $p230^{BCR-ABL}$ ekspresyonu trombozis ve kronik nötrofili varyantı olarak ilişkilendirilebilir (Faderl ve ark., 1999).

Halen sinyal süresince BCR-ABL'ın bu üç formunun nasıl birbirinden farklı olduğu bilinmemektedir ancak ek genetik değişikliklerin tüm hastalık aktivitesini zenginleştirdiği önemli gözükmektedir (Walz ve ark., 2005). Ek olarak, füzyon protein içindeki BCR kısmının uzunluğunun artmasının in vitro ortamda ABL kinaz aktivitesinin azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

1.6. BCR-ABL Proteini

BCR -ABL füzyon geni sitoplazmik protein olan ve sürekli olarak aktif kinaz üreterek etkilenen hücre klonunun proliferasyonunu sağlayan 210 kdalton ağırlığında BCR-ABL onkoproteinini kodlar (Litzow, 2006; Sawyers, 1999; Weisberg ve ark., 2001). BCR-ABL, gen transkripsiyonun aktivasyonu ya da represyonu için önemli olan onkogenik sinyallerin iletiminde görevli çeşitli proteinlerle etkileşmesinde, apoptotik yanıtın mitokondrial işlenmesinde, hücre iskeleti organizasyonunda, inhibitör proteinlerin degredasyonunda etkilidir (Litzow, 2006).



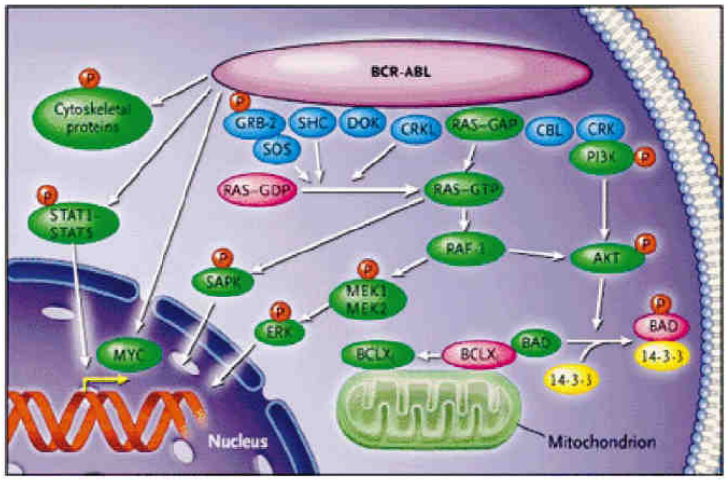
Şekil 1.6.1. *BCR-ABL'ın tetiklediği KML oluşumuna karışan mekanizmalar.*

1.6.1. BCR-ABL'ın Adezyon Özelliklerini Değiştirmesi

KML öncül hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonu azalır. Stromaya adezyon hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenler ve KML hücreleri değişen adezyon özellikleri ile bu düzenden kaçış gösterirler. Son çalışmalar stroma ile öncül hücreler arasında ki etkileşimde β- integrinlerin önemli rolü olduğunu göstermiştir. KML hücreleri normal öncül hücrelerde bulunmayan β 1-integrinin adezyon inhibitör varyantını ekprese ederler. İntegrinler dış ortamdan iç ortama normal sinyal iletimini başlatma yeteneğine sahiptirler. BCR-ABL transforme hücreler içinde tirozin fosforlanmış proteinlerin en önemlilerinden biri olan Crkl, hücresel motifin düzenlenmesine ve paxillin, fokal adezyon kinaz (Fak), p130Cas ve Hef1 gibi diğer fokal adezyon proteinleri ile ilişkiye girerek integrin aracılı hücre adezyonuna karışır. Diğer bir görüş ise BCR-ABL tirozin kinazın α6 integrin mRNA'sının ekspresyonunu arttıracak şekilde düzenlediği ve α6 integrinin transkripsiyonel aktivasyonu sonucunda integrin fonksiyonunun bozulabileceği şeklindedir (Deininger ve ark., 2000).

1.6.2. Mitojenik Sinyalizasyonun Aktivasyonu

BCR-ABL karıştığı anahtar yolaklar Ras, mitojen-activatör protein (MAP) kinazlar, ''signal transducers and activators of transcription'' (STAT), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), ve Myc'dir. Etkileşimlerin birçoğu tirozin fosforilasyonu aracılığıyla ve GRB- 2, DOK, CRK, CRK benzeri protein (CRK like protein; CRKL), SRC homoloji içeren protein (SHC) ve casitas-B-lineage lymphoma protein (CBL) gibi adaptör proteinlerin BCR-ABL'a bağlanması ile sağlanır (Deininger ve ark., 2000).



Şekil 1.6.2. *BCR-ABL'ın etkilediği sinyal iletim yolakları.*

Ras ve MAP Kinaz Yolağı: Tirozin 177'nin otofosforilasyonu adaptör molekül Grb-2 için bağlanma bölgesi oluşturur. Grb-2'nin SOS proteinine bağlanmasından sonra Ras, inaktif GDP bağlı durumdan aktif GTP bağlı duruma geçer. BCR-ABL'ın substratları olan diğer iki adaptör molekül Shc ve Crkl de Ras'ı aktive edebilir. Bu substratlar SH2 (Shc) ve SH3 (Crkl) bölgeleri ile BCR-ABL'a bağlanırlar. Ras'ın aktivasyonu Ph kromozomu pozitif lösemilerin patogenezinde önemlidir. IL-3 gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması Ras'ın aktivasyonuna neden olur ve aktif Ras proteini serin-threonin kinaz Raf'a bağlanır ve Raf proteini hücre membranında toplanır. Burada serin-threonin aminoasitlerinden fosforillenen Raf proteini aktif hale geçer. Raf, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden sinyal yolağını başlatır. Bundan başka Jnk/Sapk yolağının BCR-ABL tarafından aktivasyonu üzerinde çalışılmış ve malign transformasyon için gerekli olduğu görülmüştür. Böylece Ras üzerinden gelen sinyal GTP-GDP değişim faktörü Rac tarafından Gckr (germinal center kinase related)' e iletilir ve buradan da Jnk/Sapk yolağı aktive edilir. MAP kinaz yolağının üçüncü kolu p38'in BCR-ABL transforme hücreler ve diğer mitojenik potansiyeli olan yolaklarda aktif olduğuna dair kanıtlar vardır (Deininger ve ark., 2000).

Jak-Stat Yolağı: Normal hücre sinyalizasyonunda sitokinlerin non reseptör tirozin kinaza bağlanması ile reseptör aktive olur ve hücre içi bölgesi ile ilişki kuran Janus ailesi kinazları (JAKs) tirozin fosforilasyonu ile aktifleşir. Jak'ın fosforile olmuş bölgelerine Stat (Signal transducer and activator of transcription) proteini bağlanır ve fosforillenir. Fosforillenmiş Stat proteinleri birbirine bağlanarak dimer oluşturur, nukleusa geçer ve DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatır. Stat transkripsiyon faktörlerinin (Stat1 ve Stat5) sürekli fosforilasyonu birkaç BCR-ABL pozitif hücre serisinde ve primer KML hücrelerinde rapor edilmiştir ve Stat5 aktivasyonunun malign transformasyon ile ilişkili olduğu görünmüştür. BCR-ABL transforme hücrelerde Stat5'in etkisinin anti-apoptotik olduğu ve Bcl-xL'in transkripsiyonel aktivasyonuna karıştığı görülmüştür. Fizyolojik uyarı tarafından Jak/Stat yolağının aktivasyonunun aksine BCR-ABL, Jak proteinlerinin fosforilasyonu olmadan direkt olarak Stat1 ve Stat5'i aktive edebilir. $P210^{BCR-ABL}$'ın aksine $P190^{BCR-ABL}$'da özellikle Stat6 aktivasyonu söz konusudur (Deininger ve ark., 2000).

PI3 Kinaz Yolağı: BCR-ABL pozitif hücrelerin proliferasayonu için PI3 kinaz aktivitesi gereklidir. PI3 kinaz yolağının aktivasyonu bir serin-threonin kinaz olan Akt kaskadını aktifleştirir. Akt anti-apoptotik sinyalizasyona karışır ve aktive Akt, Bad, MDM2, IκB-kinaz α ve birtakım transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve hücre içi lokalizasyonu düzenler. IL-3 reseptörü ve pro-apoptotik protein olan Bad Akt'nin önemli substratlarıdır. Fosforile Bad, BclxL gibi anti-apoptotik proteinlere ve sitoplazmik 14-3-3 proteinlerine bağlanamadığından inaktif durumdadır (Deininger ve ark., 2000).

Myc Yolağı: Birçok insan malignitesinde myc onkoproteininin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Myc'in transkripsiyon faktörü gibi etki yaptığı düşünülmekte ancak hedef genleri geniş çapta tam olarak bilinmemektedir. Myc'in aktivasyonu BCR-ABL'ın SH2 bölgesine bağlanmasıyla sağlanır. V-abl-transforme hücrelerde elde edilen sonuçlar göstermiştir ki sinyal Ras/Raf, siklin bağımlı kinazlar (cdck) ve E2F transkripsiyon faktörü üzerinden Myc promotorunu aktive etmektedir (Deininger ve ark., 2000).

1.6.3. Apoptozis İnhibisyonu

BCR-ABL pozitif hücre serileriyle yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin DNA hasarı tarafından indüklenen apoptozise karşı dirençli oldukları gözlemlenmiş, ancak altında yatan mekanizmalar tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Önemli görüşlerden biri BCR-ABL'ın kaspazları aktive ederek mitokondriden sitokrom c salınımını engellemesidir. Kaskad şeklinde gerçekleşen kaspaz aktivasyonuna Bcl-2 ailesi üyelerinin aracılık ettikleri düşünülmektedir. Baf3 hücre serisinde BCR-ABL'ın Ras yolağı üzerinden Bcl-2 proteinini arttırdığı yine 32D hücrelerinde de BCR-ABL'ın PI3 kinaz yolağı üzerinden Bcl-2 proteinini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca BCR-ABL pozitif hücrelerde Stat5'in aktivasyonu ile antiapoptotik bir protein olan BclxL'in transkripsiyonel olarak aktif hale geçtiği belirlenmiştir. Diğer bir görüş ise, proapoptotik bir protein olan Bad'ın fosforilasyonudur. Bad'ın iki serin aminoasidinden Akt, Raf ve Ras proteinleri tarafından fosforile edildiği, ayrıca "Interferon consensus sequence binding protein" (ICSBP)'in regülasyonunu değiştirerek apoptozisi inhibe ettiği düşünülmektedir (Deininger ve ark., 2000).

1.7. KML'de Tedavi Yöntemleri

1.7.1. Konvansiyonel Tedavi

KML tedavisinde ilk olan busulfan 1950'lerde kullanılmaya başlanmıştır. Hastaların %10'unda myelo-süpresyonu sağlamaktadır. Busulfan alan hastalarda hastalık güvenilir şekilde kontrol edilememektedir. Hydroxyurea DNA sentezinin hücre siklusu-spesifik inhibitörü olup ilk 1972'lerde kullanılmaya başlanmıştır, busulfan'a göre daha etkilidir. Hydroxyurea ve busulfan hastaların %50-80'inde tam hematolojik remisyon sağlarken sitogenetik remisyon nadirdir ve hastalığın doğal seyrini değiştirmemektedirler (Faderl ve ark., 1999).

1.7.2. Allogenik Kök Hücre Transplantasyonu

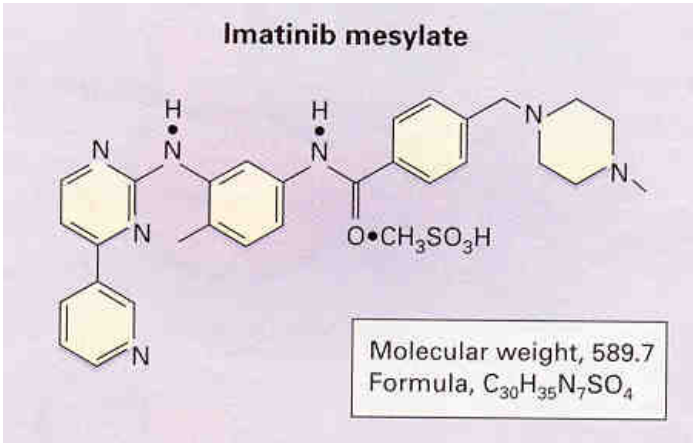
Allogenik Kök Hücre Transplantasyonu özellikle genç hastalar için uygundur ki bu hastalarda hastalıktan bağımsız yaşam süresi %60-70, transplantasyonla ilgili ölüm %10 ve relaps oluşma ihtimali %20'dir. Yaşlı hastalarda ise tedaviyle ilişkili ölümün artmasından dolayı durum daha kötü olup tedaviden 5 yıl sonra hastalıktan bağımsız yaşam süresi %30'dur. Hastaların çoğunda hematolojik remisyon ve tam sitogenetik cevap sağlanır. Ayrıca hastalığın fazı tedavinin başarısında önemlidir. Kronik faz hastalarında uygulanan allogenik kök hücre transplantasyonundan sonra hastalıktan bağımsız yaşam süresi, blastik kriz fazında bulunan hastalarda uygulanan allogenik kök hücre transplantasyonundan sonra hastalıktan bağımsız yaşam süresine göre daha fazladır. Transplantasyondan önce alınan kemoterapi hastalıktan bağımsız yaşam süresini etkilemektedir. Graft-versus host hastalığı transplantasyon sonucunu etkilemektedir (Faderl ve ark., 1999).

1.7.3. İnterferon α

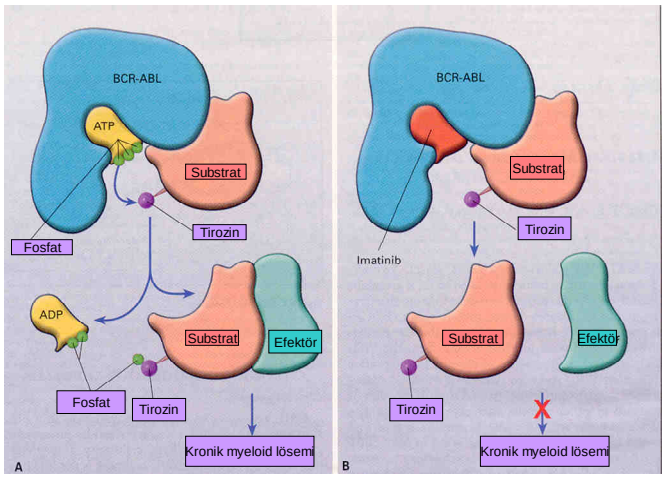
İnterferonlar, malign hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi antijenik uyarılara cevap olarak ökaryotik hücreler tarafından üretilen glikoproteinlerdir. Antiviral, immünomodülatör, antiproliferatif ve antianjiyogenik aktiviteye sahiptirler. Hem solid hem de hematolojik malign tümörlerde diğer interferonlara göre en yaygın interferon α kullanılmaktadır. İnterferon α ile tedavide hastaların %46-80'inde tam hematolojik yanıt, hastaların %13-32'inde tam sitogenetik cevap ve %11-16'ında kısmi sitogenetik cevap sağlar (Faderl ve ark., 1999).

1.7.4. KML Tedavisinde Imatinib mesylate

Imatinib mesylate (Gleevec , STI571 , CGP57148B) 2-fenilaminopirimidin sınıfında yer alıp; BCR-ABL tirozin kinazın seçici inhibitörü olarak tasarlanan etkili terapötik ajandır (Corbin ve ark., 2003). Imatinib, BCR-ABL otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirerek, etkilenen hücrelerin proliferasyonunu bloke ederek ve apoptozisin indüklenmesi aracılığıyla BCR-ABL onkoproteininin etkilerini bloke ederek etki yapar (Walz ve ark., 2005; Gambacorti-Passerini ve ark.). Imatinib, ABL kinaz domainindeki amino asitlere bağlanır ve adenozin trifosfat (ATP) 'ın bağlanmasını bloke ederek BCR-ABL proteininin inaktif konformasyonda kalmasını indükler. Bu durumda ATP'den fosfat transferini engeller ve aşağı yönde sinyal iletim yolaklarını bloke ederek büyüme duraklamasına ya da apoptozise neden olur (Branford ve ark., 2003).



Şekil 1.7.4.1. *Imatinib'in kimyasal şekli.*



Şekil 1.7.4.2. *Imatinib'in etki mekanizması.*

Imatinib'e karşı cevap hematolojik ve sitogenetik seviyede incelenir. Ph kromozomu pozitif hücre yokluğu tam sitogenetik cevap, Ph (+) hücre miktarının % 1- 34 olması kısmi sitogenetik cevap, Ph (+) hücrelerinin % 35- 65 olması ise minör sitogenetik cevap olarak değerlendirilir (Litzow, 2006). Hematolojik tam yanıt ise dolaşımdaki lökosit sayısının < 10 x 10^{3} / mm^{3}, trombosit sayısının < 450 x 10^{3} / mm^{3} olması, miyeloid öncü hücre bulunmaması ve dalağın palpe edilmemesidir (İlhan, 2004).

Imatinib erken kronik faz hastalarında yaklaşık %100 hematolojik remisyon ve %87 sitogenetik remisyonu; blastik kriz safhasındaki hastalarda ise %8 hematolojik remisyon ve %16 sitogenetik remisyonu indükler (Barnes ve ark., 2005).

1.8. Imatinib'e Karşı Direnç Gelişmesi

Antibiyotiklere, antiviral ajanlara ve diğer antilösemik ilaçlara karşı gelişen direnç hakkındaki klinik raporlardan dolayı İmatinib' e karşı gelişen direnç bizi şaşırtmamaktadır (Nardi ve ark., 2003). Bazı hastalarda ilk imatinib tedavisine karşı hiç yanıt görülmediğinde primer dirençten bahsedilir. Primer direnç, tam hematolojik yanıtın üç ay içinde sağlanamaması, altı ay içinde sitogenetik yanıtın gözlemlenmemesi ve oniki ay içinde majör sitogenetik yanıtın olmaması şeklinde ifade edilmektedir (Wei ve ark., 2006). Uygulanan tedaviye ilk cevaptan sonra yanıt alınamadığı, hematolojik yanıtın ve majör sitogenetik yanıtın kaybedilmesi ya da tam sitogenetik yanıtın kaybedilmesi ile BCR-ABL'ın on kat artması; akselere ve blastik faza geçiş durumunda ise sekonder ya da kazanılmış dirençden bahsedilir (Litzow, 2006, Wei ve ark., 2006). Direnç özellikle akselere ya da blastik kriz safhasında görülmektedir (Nardi ve ark., 2003). Gleevec direncinin oluşumu hakkında farklı mekanizmalar öne sürülmektedir. ABL geninin tirozin kinaz domainindeki nokta mutasyonlarının majör olarak dirence neden olduğu belirtilmektedir (Melo ve ark., 2006; Litzow, 2006; Corbin ve ark., 2003; Nardi ve ark., 2004; Gambacorti-Passerini ve ark., 2003; Barnes ve ark., 2005; Kang ve ark., 2006; Willis ve ark., 2005; Gore ve ark., 2001). BCR-ABL geninin amplifikasyonuna bağlı BCR-ABL proteininin artmış ekspresyonu, (Melo ve ark., 2006; Nardi ve ark., 2004; Gambacorti-Passerini ve ark., 2003; Hochhaus ve ark., 2002), MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucunda yüksek P-glikoprotein seviyesi ve yine serum proteini olan α1 asid glikoprotein (AGP) 'inin artmış ekspresyonu diğer direnç mekanizmalarını oluşturmaktadır (Melo ve ark., 2006; Gambacorti-Passerini ve ark., 2000).

ABL kinaz domaindeki nokta mutasyonları özellikle primer dirençten ziyade kazanılmış dirençte görülmekte ve KML'nin tüm fazlarında bulunmasına rağmen daha sıklıkla hastalığın geç kronik veya akselere fazında gözlenmektedir (Deininger ve ark., 2005; Melo ve ark., 2006; Nardi ve ark., 2003; Roche-Lestienne ve ark., 2003). Mutasyonlar 4 grup şeklinde kategorize edilir (Deininger ve ark., 2005; Melo ve ark., 2006; Gambacorti-Passerini ve ark., 2003). İlk grup İmatinib bağlanma bölgesidir. ABL 1a proteinin 315. pozisyonunda, 1b proteinininde 334 pozisyondaki

treonin (Thr,T) amino asidinin izolösine (Ile,I) dönüşümü dirençli hastalarda saptanan ilk mutasyondur (Gorre ve ark., 2001; Litzow, 2006; Nardi ve ark., 2004; Walz ve ark., 2005) ve bu mutasyonun varlığı tedaviye direnç gelişmesine neden olmaktadır (Litzow, 2006; Melo ve ark., 2006; O'Hare ve ark., 2006; Walz ve ark., 2005).

İlacın bağlanma affinitesini azaltan bu dönüşümün iki şekilde etki yapabileceği düşünülmektedir. İlkinde, Thr 315'in yan zinciri tarafından sağlanan oksijen atomunun bulunmaması ve bu durumun da imatinibin ikinci amino grubu ile ABL arasındaki hidrojen bağının oluşmasını engellemesi; ikinci olarak da, Ile yan zincirinde ekstra hidrokarbon grubu içermesi nedeniyle imatinibe bağlanmayı engellemesi şeklindedir (Melo ve ark., 2006). Sonuçta T315I mutasyonu Gleevec'in bağlanabilme yeteneğine zarar vermekte ancak ATP'nin bağlanmasını etkilememektedir (Deininger ve ark., 2005; Nardi ve ark., 2003).

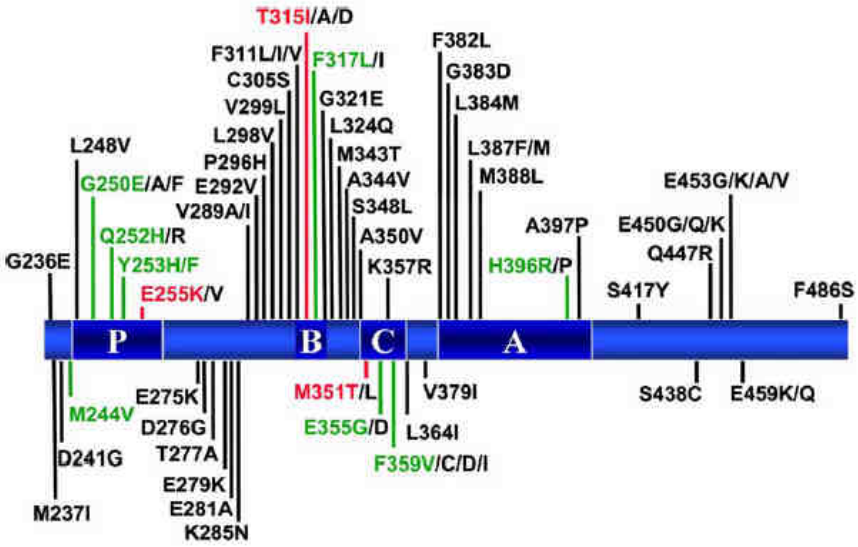
İmatinib bağlanma bölgesindeki diğer mutasyon ise ABL proteininin 317. pozisyonundaki fenilalaninin (Phe,F) lösine (Leu,L) dönüşmesine neden F317L mutasyonudur (Melo ve ark., 2006). F317L orta derecede imatinib direncine neden olup daha az sıklıkla görülürken T315I daha geniş ilac duyarsızlığına neden olur (Deininger ve ark., 2005).

İkinci grup mutasyonlar ATP bağlanma bölgesinde (fosfat ya da P-loop) bulunur. Bu bölge aşırı derecede esnek, oldukça korunmuş glisince zengin, 248-256 amino asidleri genişliğinde olup, İmatinib ile hidrojen ya da van der Waals bağları ile etkileşime girer (Melo ve ark., 2006; Litzow, 2006). Burada meydana gelen mutasyonlar P-loop'un esnekliğini modifiye ve imatinibin bağlanması için gerekli konformasyonun kararlılığını bozar (Melo ve ark., 2006).
Burada görülen mutasyonlar tirozin253fenilalanin/ histidin (Y253F/H), glutamikasit255lizin/ valin (E255K/V), glisin250glutamik asit / alanin/ fenilalanin (G250E/A/F) ve glutamin252histidin/ arjinin (Q252H/R) 'dir (Gambacorti-

Passerini; ark., 2003; Litzow, 2006; Melo ve ark., 2006; Nardi ve ark., 2003; Soverini ve ark., 2004; Walz ve ark., 2005).

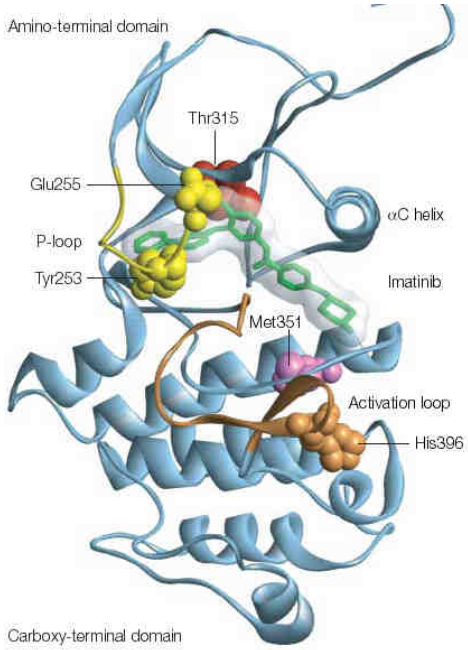
İmatinib tedavisi alan P-loop mutasyonlarına sahip olan hastaların P-loop mutasyonlarına sahip olmayan hastalara göre daha kötü prognoza sahip olduğu düsünülmekte ve bunun ispatı için daha geniş serilerle çalışma yapılması önerilmektedir (Melo ve ark., 2006; Litzow, 2006).

Üçüncü grup mutasyonlar aktivasyon bölgesinde yer alırlar. ABL kinazın aktivasyon loop'u oldukça korunmuş 3 amino asit rezidüsü ile 381. amino asitten başlar. (aspartat-fenilalanin-glisin) Kinazın bu bölgesi kapalı (inaktif) ya da açık (aktif) konformasyonu adapte eder ve flexible aktivasyon-loop'u katalitik aktiviteyi kontrol eder. Molekülün aktif veya inaktif durumuna bağlı olarak konformasyonu değişir (Melo ve ark., 2006; Litzow, 2006). İmatinib ABL'ı inaktif konformasyonda stabil kılar ve ABL aktif durumdayken bağlanamaz. Aktivasyon loop'daki mutasyonlar; fenilalanin382lösin (F382L), glisin383aspartik asit (G383D), lösin384metiyonin (L384M), lösin387fenilalanin / metiyonin (L387F/M), metiyonin388lösin (M388L), histidin396arjinin / prolin (H396R/P), alanin397prolin (A397P) loop'un kapalı konformasyonunun stabilizasyonu için gerekli enerji dengesini bozar ve böylece aktif konformasyon meydana gelir (Melo ve ark., 2006).



Şekil 1.8.1. *matinib'e karşı klinik direnç ile ilişkili BCR-ABL kinaz bölge mutasyonlarının haritalanması. Yeşil ile gösterilmiş amino asit yer değişimleri mutasyon görülen hastaların 2-10% taranmış; kırmızı ile gösterilmiş amino asit yer değişimleri ise mutasyon görülen hastaların >10% 'unda saptanmıştır.*

Dördüncü grup mutasyonlar ise katalitik bölgede yer alır. Katalitik bölge, molekülün P-loop ile aktivasyon bölgesi arasında yer alıp, aktivasyon loop ile kapalı topolojik ilişki içindedir ve 351-359 rezidülerini kapsar (Melo ve ark., 2006; Walz ve ark., 2005). Katalitik bölge molekülün imatinib ve diğer küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörlerinin bağlandığı aralıkta yer alır. Hem ABL hem de SRC; inaktif veya kapalı konformasyon ve katalitik olarak aktif veya açık konformasyon arasında yer değiştirir. Bu inaktiften aktif duruma yer değiştirme, otoinhibisyon işlemi olarak bilinen kinazın kendini regüle etmesi ile gerçekleşir. İnaktif durumda, aktivasyon loop katalitik bölgeye doğru içe katlanır; aktif durumda ise bu aktivasyon loop katalitik bölgeden uzaklaşır (Litzow, 2006). Buradaki mutasyonlar Metiyonin351treonin/lösin (M351T/L), glutamikasit355glisin / aspartik asit (E355G/D), lizin357arjinin (K357R), fenilalanin359valin / sistein / aspartik asit / izolösin (F359V/C/D/I) 'dir (Melo ve ark., 2006; Walz ve ark., 2005). M351T, ABL SH2 bölgesi ile ilişki halindedir (Litzow, 2006). Katalitik bölgede meydana gelen mutasyonlar imatinibin bağlanmasını etkiler (Melo ve ark., 2006). İlginç olarak M351T mutasyonu kinaz aktivitesinde önemli düşüşle sonuçlanır (Walz ve ark., 2005).



Şekil 1.8.2. *matinib (yeşil renk) ile kompleks halde bulunan ABL kinaz böldesinin yapısı ve BCR-ABL'a imatinib direncini kazandıran mutasyonel sıcak noktalar. T315 (kırmızı renk), P-loop ve bu bölgede yer alan E255, Y253 amino asitleri (sarı renk), Aktivasyon Bölgesinde yer alan H396 (turuncu renk), Katalitik bölgede bulunan M351(pembe renk) gösterilmiştir.*

1.9. Amaç

İmatinib ile hedefe yönelik terapi KML tedavisinde devrim yaratmıştır (Walz ve ark., 2005). İmatinib yüksek etki ve düşük toksisitesi sayesinde allogenik kök hücre transplantasyonuna uygun olmayan KML hastalarının tedavisinde interferon-α'nın yerini almıştır (Melo ve ark., 2006). Ancak bu etkin tedaviye hastalar zamanla direnç geliştirebilmektedir. ABL geninin tirozin kinaz bölgesindeki nokta mutasyonlarının majör olarak dirence neden olduğu belirtilmekte ve bu yanlış anlamlı mutasyonların farklı derecede imatinib direncine yol açtığı düşünülmektedir. Türkiye'de ilk defa yapılacak olan bu çalışmada imatinib tedavisi gören KML hastalarında literatürde en sık gözlenen, imatinib bağlanma bölgesinde bulunan T315I, "P-loop" bölgesinde bulunan E255K ve katalitik bölgede bulunan M351T mutasyonlarının Allel Spesifik Olügonükleotid- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ASO-PCR) ile taranması amaçlanmaktadır. Her hastadan elde edilen sonuç klinik tedaviyi yönlendirici katkıda bulunacaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü'nde tanısı konmuş imatinib tedavisi uygulanan 30 Ph kromozomu pozitif KML hastasından oluşmaktadır. Hastaların 17'si (%57) erkek, 13'ü (%43) kadındır. Hastaların ortalama yaşı 46 olup, alt yaş sınırı 18 iken üst yaş sınırı 72'dir. Her örnek, aydınlatılmış onam formları alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Negatif kontrol olarak sağlıklı bir bireyden elde edilen DNA örneği kullanılmıştır. T315I; E255K ve M351T eksprese eden Baf3 $p210^{BCR\text{-}ABL}$ mutant hücre serilerinden elde edilen DNA örnekleri sırasıyla T315I; E255K ve M351T mutasyonları için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.1.1. Kullanılan Hücre Serileri

Bu çalışmada T315I; E255K ve M351T eksprese eden Baf3 $p210^{BCR\text{-}ABL}$ mutant hücre serileri kullanılmıştır. (Hücre serileri Oregon Health and Science University Cancer Institute, Portland, Deininger, M. Tarafından sağlanmıştır.) Baf3p210, BCR-ABL füzyon geni aşıyan lenfoid kökenli hücre serisidir.

Mutant Baf3p210 hücre serileri %90 RPMI 1640 [Biochrom AG, F1213], %1 Penicillin/ Streptomisin [Biochrom AG, A2213], %1 L-Glutamin [Biochrom AG, K0283] ve %10'luk Fetal Bovine Serum (FBS) [Biochrom AG, S91139] içeren hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. Hücre kültürleri, 37^oC, %5'lik CO_2 ortamda [Heto CELL HOUSE A70H1 inkübatör] bekletilmiştir. Her iki-üç günde 900 rpm'de 10

dakika santrifüje edilen hücreler [Sigma Laboratory Centrifuges 6K15], steril kabin içerisinde [Holten Laminair Model 1,8] 1:10 oranında seyreltilerek pasajları yapılmıştır.

2.2. DNA İzolasyonu

Periferik kan örneklerinden ve hücre serilerinden DNA'lar tuz yöntemi ile izole edilmiştir. Kann, EDTA' lı tüplerde toplanmış ve en fazla 2 ay bekletilmiştir. Tuzla DNA izolasyonu iki gün süren bir aşamadır;

DNA İzolasyonu 1. gün

- Hücreler flasklardan 15 ml'lik steril falkon tüplerine alınır ve 10 dakika 1200 rpm.de (+) 10^0C'de santrifüj edilir ve bir kez **P**hosphate **B**uffered **S**aline (PBS) ile yıkanır.
- 5ml kan ve hücreler 15 ml'lik steril falkon tüplerine konulur 3600 rpm.de 10 dakika santrifüj edilir.
-

Hücrelerin Parçalanması:

- 15 ml'lik falkon tüpünden süpernatant atılarak pellet bırakılır.
- Pellet 14 ml'ye kadar 1.54M Lizis Buffer ile tamamlanır.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapılır.
- Vorteks cihazı (Labnet VX100) kullanılarak iyice karıştırılır.
- Oda ısısında buzun içinde 1 saat bekletilir.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapılır.
- Süpernatant atılır, pelletin üzerine tekrar 14ml'ye kadar 1.54M Lizis Buffer eklenir. Oda ısısında buzun içinde 20 dakika bekletilir.

Proteinlerin Uzaklaştırılması:

- Süpernatant atılır, pellet üzerine 1xSTE (Sodyum Tris EDTA Buffer) konularak 5ml'e tamamlanır.
- Pellet dağılana kadar vortex cihazı ile karıştırılır.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapılır.
- Falkon tüpünde süpernatant atılırarak pellet bırakılır.
- Pellete 4.5ml 1xSTE eklenir.
- Pellet dağılana kadar vortex yapılır.
- 500 µl %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve 5 µl Proteinaz K (PKA) konulur. (Proteinaz K; 20 µL. de 500 mg. olacak şekilde hazırlanır ve -20 ºC' de bekletilir.)
- El yordamı ile pellet kaldırılır.
- 37^0C'de 1 gece inkübe edilir.

DNA İzolasyonu 2. gün

DNA'nın Prespitasyonu:

- Tüplerin üzerine 1 ml. doymuş tuz (5.6M NaCl) konulur ve iyice çalkalanır.
- 2500 rpm.de 20 dakika santrüfüj edilir.
- Süpernatant yaklaşık 1ml'ye kadar çekilip, yeni falkon tüplerine aktarılır. Hacminin iki katı kadar %96'lık Et-OH (Etanol, -20^0C'de bekletilen) konulur.
- DNA'nın görünür (prespite) olması için hafif sallanır. Prespite olan DNA ependorf tüpüne aktarılır.
- Aktarmadan sonra, 13.000 xg. de 10 dakika mikrosantrifüj (Herolab MicroCen 13D) kullanılarak çöktürülür. (Çökelme olmayan tüpler varsa, -20ºC' de 30 dakika bekletilir ve sonra 3500 rpm. de 20 dakika santrifüj edilir.)

▪ Santrifüjden sonra, süpernatant atılır pellet üzerine 1ml %70'lik Et-OH (Etanol, -20^{0}C'de bekletilen) konulduktan sonra pipet kullanılarak pellet kaldırılır.
▪ 13.000 xg. de 10 dakika mikrosantrifüj edilir.
▪ Santrifüjden sonra, süpernatant atılır pellete tekrar 1ml %70'lik Et-OH konulduktan sonar pipetleyerek pellet kaldırılır.
▪ Süpernatant atıldıktan sonra pellet oda ısısında 1 saat kurumaya bırakılır.
▪ DNA'nın çözülmesi için 500 µl steril dH_2O eklenir.
▪ 37 ºC' de 1 gece inkübe edilir.
▪ Elde edilen DNA -20^{0}C'de muhafaza edilir.

2.3. DNA'nın Kantitasyonu

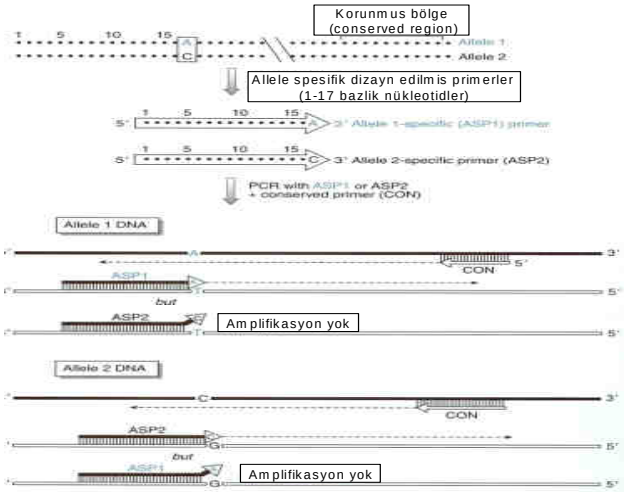
Elde edilen DNA'nın miktar ve saflığının saptanabilmesi için spektrofotometrik yöntem aşağıda belirtilen şekilde yapılacaktır.

- Çözülmüş DNA örneğinden 20 µl alınıp 1ml'lik steril eppendorf içinde son hacim 500 µl olacak şekilde dH_2O ile tamamlanır.
- Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçülür. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlenir.
- DNA'nın konsantrasyonu
  Konsantrasyon (µg/µl) = OD260 x 0.05 x 100 (sulandırma katsayısı) şeklinde belirlenir.

2.4. ASO-PCR (Allel Spesifik Olügonükleotid- Polimeraz Zincir Reaksiyonu):

ABL kinaz bölgesindeki mutasyonların aydınlatılmasında çeşitli metoedlar kullanılmaktadır. Özellikle bilinmeyen kinaz bölge mutasyonlarının saptanmasında sekans yöntemi tercih edilir, ancak sınırlı hassasiyete sahiptir. PCR-RFLP yöntemi

1000 yaban tip hücre arasından 1 mutant hücreyi saptamada oldukça iyidir. Allel Spesifik Oligonükleotid (ASO) PCR yöntemi 10.000 yaban tip sekans içerisinden tek 1 mutant allelin saptanmasında sekanslama yöntemine göre oldukça hassasiyet gösterir. Sekanslama yönteminde hasta örneklerindeki mutant hücre miktarı % 30'dan az olmamalıdır. Ayrıca bu yöntem hem pahalı hem de zaman alıcı bir yöntemdir. Buna karşın ASO-PCR bilinen mutasyonların saptanmasında oldukça hassas bir yöntem olup kullanılan primerlere bağımlı olarak hassasiyeti değişmektedir. ASO-PCR, T315I ve E255K mutasyonları için 1000 yaban tip hücre arasından 1 mutant hücreyi; M351T mutasyonu için 100 yaban tip hücre arasından 1 mutant hücreyi saptama hassasiyetine sahiptir. Ek olarak ASO-PCR hem ekonomik hem hızlı hem de birçok laboratuarda rahatça uygulanabilecek basit bir işleyişe sahiptir (Kang ve ark., 2006).



Şekil 2.4.1. *Allel Spesik Oligonükleotid PCR'ın İşleyiş Mekanizması.*

T315I, E255K ve M351T mutasyonlarının Allel Spesifik Olügonükleotid- Polimeraz zincir reaksiyonunda (ASO-PCR) thermo-cycle koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 2.4.1. *T315I Mutasyonu için PCR Şartları* (*Roche-Lestienne ve ark., 2002)*

PCR Reaksiyon Karışımı	Normal Allel İçin	Mutant Allel İçin	PCR Şartları: 1) 94^0C/ 12 dakika 2) 95^0C/ 1 dakika 3) 62.5^0C/ 1dakika 4) 72^0C/ 1dakika 5) 72^0C/ 5dakika şartlarında 35 döngü
Genomik DNA	100 ng	100 ng	
Forward Normal Primer (25pM)	1 µl	–	
Forward Mutant Primer (25pM)	–	1 µl	
Reverse Primer (25pM)	1 µl	1 µl	
10XPCR buffer (-$MgCl_2$)	5 µl	5 µl	
$MgCl_2$ (25mM)	4 µl	4 µl	
dNTP (100mM)	3 µl	3 µl	
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1 µl	1 µl	
Toplam Hacim	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	

Çizelge 2.4.2. *E255K Mutasyonu için PCR Şartları (Kang ve ark., 2006)*

PCR Reaksiyon Karışımı	Normal Allel İçin	Mutant Allel İçin	PCR Şartları: 1) 94^0C/ 5 dakika 2) 94^0C/ 30 saniye 3) 69^0C/ 30 saniye 4) 72^0C/ 30 saniye 5) 72^0C/ 5dakika şartlarında 30 döngü
Genomik DNA	100 ng	100 ng	
Forward Normal Primer (25pM)	1 µl	–	
Forward Mutant Primer (25pM)	–	1 µl	
Reverse Primer (25pM)	1 µl	1 µl	
10XPCR buffer (-$MgCl_2$)	5 µl	5 µl	
$MgCl_2$ (25mM)	4 µl	4 µl	
Dntp (100mM)	3 µl	3 µl	
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1.5 µl	1.5 µl	
Toplam Hacim	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	

Çizelge 2.4.3. *M351T Mutasyonu için PCR Şartları (Roche-Lestienne ve ark., 2002)*

PCR Reaksiyon Karışımı	Normal Allel İçin	Mutant Allel İçin	
Genomik DNA	100 ng	100 ng	PCR Şartları: 1) 94^0C/ 12 dakika 2) 95^0C/ 1 dakika 3) 69.5^0C/ 1dakika 4) 72^0C/ 1dakika 5) 72^0C/ 5dakika şartlarında 35 döngü
Forward Normal Primer (25pM)	1 µl	–	
Forward Mutant Primer (25pM)	–	1 µl	
Reverse Primer (25pM)	1 µl	1 µl	
10XPCR buffer (-$MgCl_2$)	5 µl	5 µl	
$MgCl_2$ (25mM)	3.5 µl	3.5 µl	
dNTP (100mM)	3 µl	3 µl	
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1 µl	1 µl	
Toplam Hacim	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	50 µl'e steril dH_2O ile tamamlanır	

ASO-PCR'da kullanılacak olan primerlerin dizisi ve ASO-PCR sonucunda elde edilecek ürünün büyüklüğü aşağıda belirtilmiştir (Kang ve ark., 2006).

Çizelge 2.4.4. *ASO-PCR'da Kullanılan Primerlerin Sekansı*

Mutasyon İsmi	**Primer Tipi**	**Primer Sekansı**
T315I	Forward Normal	GCC CCC CTT CTA TAT CAT CA**C**
	Forward ASO	GCC CCC CTT CTA TAT CAT CA**T**
	Reverse	GGA TGA AGT TTT TCT TCT CCA
E255K	Forward Normal	GCG GGG GCC AGT ACG GG**G**
	Forward ASO	GCG GGG GCC AGT ACG GG**A**
	Reverse	GCC AAT GAA GCC CTC GGA C
M351T	Forward Normal	CCA CTC AGA TCT CGT CAG CCA **T**
	Forward ASO	CCA CTC AGA TCT CGT CAG CCA **C**
	Reverse	GCC CTG AGA CCT CCT AGG CT

Çizelge 2.4.5. *ASO- PCR Sonucunda Elde Edilen Ürünlerin Büyüklüğü*

Mutasyon İsmi	**Ürün Büyüklüğü**
T315I	158bp
E255K	192bp
M351T	149bp

2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

İmatinib tedavisi alan, mutasyon saptanan ve saptanmayan KML hastalarının hastalık evreleri, yaş, cinsiyet, kullanılan ilacın dozajı, direnç gelişimi ile ilgili parametreler arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesinde ki-kare testinin alt formu olan Fisher exact testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Grubu

KML tanısı almış ve KML'nin çeşitli fazlarında bulunan 17 erkek ve 13 kadın bireyin aydınlatılmış onam formları alınarak periferik kandan elde edilen DNA'ları çalışılmıştır.

3.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamız sonucunda T315I mutasyonu 13 hastada, E255K mutasyonu 3 hastada, M351T mutasyonu ise 9 hastada saptanmıştır. Tek mutasyona sahip hastaların oranı %30, iki mutasyona sahip hastaların oranı %16.6 ve her üç mutasyona sahip hastaların oranı %6.6'dır. Bu üç mutasyonun görülmediği hasta oranı ise %43.3 olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.2.1. *Saptanan Mutasyonların Sıklığı ve Mutasyon Analizi Sırasında Hastalık Evresi ile Olan İlişkisi*

	Erken Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Akselere Faz	Blastik Faz
T315I	7	3	-	3
E255K	1	1	-	1
M351T	3	1	1	3
Toplam Hasta Sayısı*	13	7	2	3

5 Hastanın klinik evresi ile ilgili bilgilere ulaşılamadı.

7 hastada birden fazla mutasyon saptandı.

* Mutasyon saptanan ve saptanmayan hastaların toplamını göstermektedir.

		E255K +	E255K -	
T315I	+	**2**	**11**	13
	-	**1**	**16**	**17**

Çizelge 3.2.2. *T315I ve E255K Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu*

T315I mutasyonu ile E255K mutasyonu arasındaki ilişki anlamlı değildir. Bu iki mutasyondan birisi pozitifken diğerinin de pozitif ya da negatif olma olasılığı yüksek değildir. (Phi=0.157, p= 0.390, p>0.01)

		M351T +	M351T -	Toplam
T315I	+	**7**	**6**	13
	-	**2**	**15**	**17**

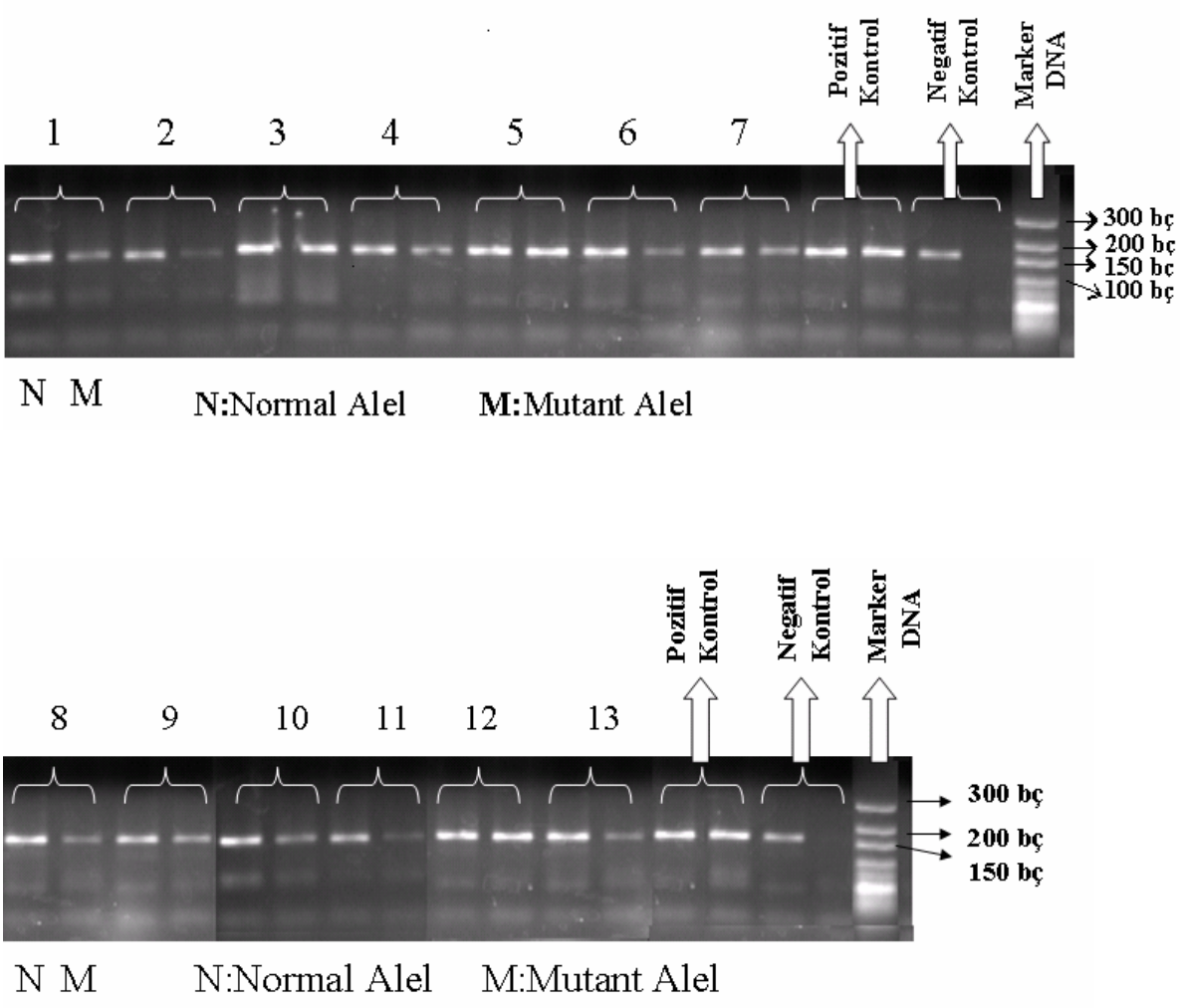
Çizelge 3.2.3. *T315I ve M351T Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu*

T315I mutasyonu ile M351T mutasyonu arasındaki ilişki anlamlıdır. T315I mutasyonu pozitif hastalarda M351T mutasyonunun bulunma olasılığı yüksektir. (Phi=0.496, p= 0.008, p<0.01)

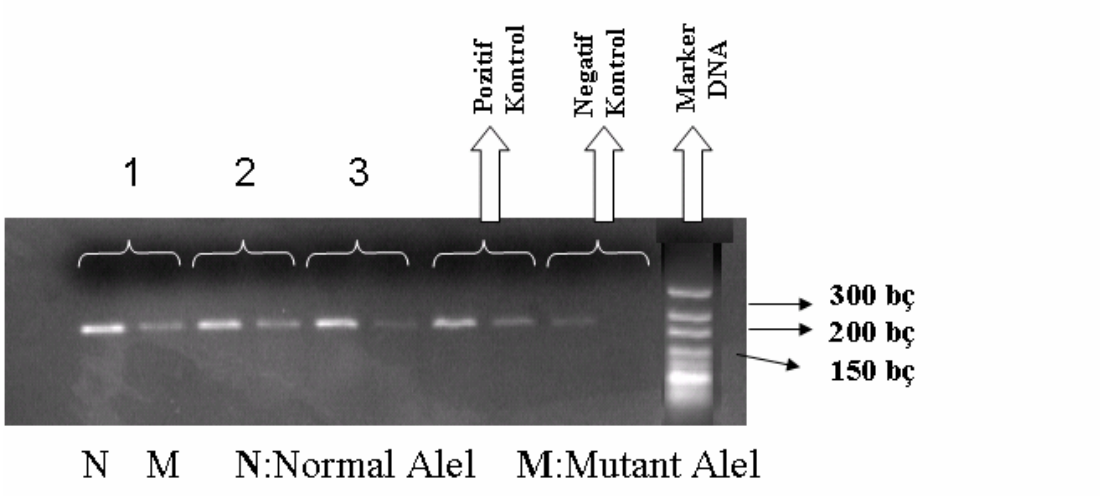
		E255K +	E255K -	
M351T	+	**2**	**7**	9
	-	**1**	**20**	**21**

Çizelge 3.2.4. *M351T ve E255K Mutasyonlarının Birbiri ile Korelasyonu*

M351T mutasyonu ile E255K mutasyonu arasındaki ilişki anlamlı değildir. Bu iki mutasyondan birisi pozitifken diğerinin de pozitif ya da negatif olma olasılığı yüksek değildir. (Phi=0.243, p= 0.215, p>0.01)

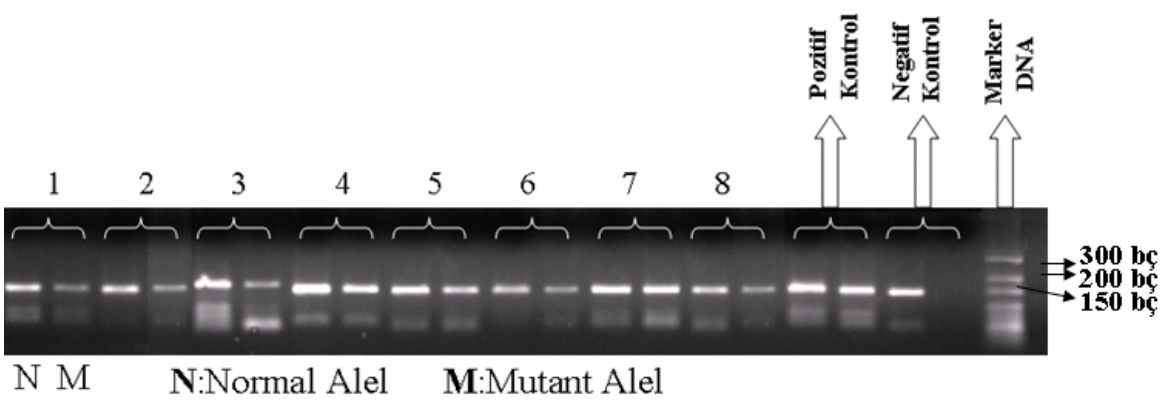


Şekil 3.2.1. *T315I mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü.*



Şekil 3.2.2. *E255K mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü.*

.



Şekil 3.2.3. *M351T mutasyonunun ASO-PCR ile saptanmasına ait jel görüntüsü*

Çizelge 3.2.5. *Dirençle İlişkili Mutasyon Saptanan Hastaların Klinik Bilgilerinin Özeti*

HN	TKAY/C	IKHY	IKSY	ITS	MTKE	SDKE	SDKD	ID	ND	AD
1	52(k)						Sağ		T1052C	M351T
2	57 (e)				Blastik Faz	Blastik Faz	ölmüş	600mg	C944T + T1052C	T315I + M351T
3					Blastik Faz	Blastik Faz	ölmüş		C944T + G763A + T1052C	T315I + E255K + M351T
4	33 (e)	Başlangıçta varken sonra kaybedilmiş	Yok	36 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg	C944T + T1052C	T315I + M351T
5	31 (e)	Var	Var	36 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	600mg	C944T	T315I
6	52 (e)	Var	Var	3 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg	C944T + G763A + T1052C	T315I + E255K + M351T
7	57 (e)	Var	Var	60 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg	C944T	T315I
8	55 (e)	Başlangıçta varken sonra kaybedilmiş	Başlangıçta varken sonra kaybedilmiş	36ay	Blastik Faz	Blastik Faz	ölmüş	600mg	C944T + T1052C	T315I + M351T
9	72(k)	Var	Var	48 ay	Akselere Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	500mg	T1052C	M351T
10	57(e)	Yok	Yok	48 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg	G763A	E255K
11	57 (e)	Yok	Yok	48 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg	C944T	T315I
12	65 (e)	Var	Var	60 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg	C944T	T315I
13	37 (k)	Var	Var	48 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg	C944T	T315I
14	20 (k)	Var	Var	60 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg	C944T + T1052C	T315I + M351T
15	43(k)	Var	Var	67 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg	C944T + T1052C	T315I + M351T
16	70	Var	Var ancak yanıt geç oluşmuş	60 ay	Erken Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg	C944T	T315I

TKAY/C **:** Tanı Konulduğu Andaki Yaş (Yıl) / Cinsiyet
IKHY **:** İmatinibe Karşı Hematolojik Yanıt
IKSY : İmatinibe Karşı Sitogenetik Yanıt
ITS **:** İmatinib Tedavi Süresi (Ay)
MTKD **:** Mutasyon Taranmasındaki Klinik Durum
SDKE **:** Son Durumdaki Klinik Evre
SDKD **:** Son Durumdaki Klinik Durum
İD **:** İmatinib Dozu
ND **:** Nükleotid Değişimi
AD **:** Aminoasit Değişimi

Çizelge 3.2.6.*.Dirençle İlişkili Mutasyon Saptanmayan Hastaların Klinik Bilgilerinin Özeti*

HN	TKAY/C	IKHY	IKSY	ITS	MTKE	SDKE	SDKD	ID
1	(e)	Yok	Yok	60 ay	Akselere Faz	Akselere Faz	Sağ	800mg
3	18 (e)	Var	Yok		Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg
4	63 (e)			48 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	600mg
5	42 (e)	Var	Var	12 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg
6	23 (k)	Var	Var	15ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg
7	52 (k)				Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	
8	45 (k)				Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg
9	55 (k)	Var	Var	62 ay	Geç Kronik Faz	Geç Kronik Faz	Sağ	400mg
10	30 (k)	Var	Var	60 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg
11	31 (k)	Var	Var	24 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg
13	46 (e)	Var	Var	52 ay	Akselere Faz	Akselere Faz	Sağ	600mg
14	48 (e)	Var	Var	42 ay	Erken Kronik Faz	Erken Kronik Faz	Sağ	400mg

TKAY/C **:** Tanı Konulduğu Andaki Yaş (Yıl) / Cinsiyet
IKHY **:** İmatinibe Karşı Hematolojik Yanıt
IKSY **:** İmatinibe Karşı Sitogenetik Yanıt
ITS **:** İmatinib Tedavi Süresi (Ay)
MTKD **:** Mutasyon Taranmasındaki Klinik Durum
SDKE **:** Son Durumdaki Klinik Evre
SDKD **:** Son Durumdaki Klinik Durum
İD **:** İmatinib Dozu
ND **:** Nükleotid Değişimi
AD **:** Aminoasit Değişimi
* 2 ve 12 numaralı hastalar hakkında klinikten bilgi alınamadı.

4. TARTIŞMA

KML hastalarında imatinib direncinin moleküler temelinin tespiti; prognostik bilgi olarak ve direncin üstesinden gelmek üzere uygun tedaviyi tanımlamak açısından önemlidir (Branford ve ark., 2004). Ph kromozomu pozitif KML hastalarında kazanılmış imatinib direncinin majör nedeni olarak; BCR-ABL ile imatinib bağlanmasına zarar veren kinaz bölge mutasyonları gösterilmektedir (Gorre ve ark., 2001; Griswold ve ark., 2006; Hochhaus ve ark., 2002; Kang ve ark., 2006; Soverini ve ark., 2006).

Bizim çalışmamıza katılan 30 hastanın 16'sında (%53) mutasyon saptanmıştır. Hastalığın evreleri göz önüne alındığında akselere fazdaki 3 hastanın 1'inde (%33), blastik fazdaki 3 hastanın 3'ünde (%100), erken kronik fazdaki 14 hastanın 7'sinde (%50), 7 geç kronik fazdaki hastanın 4'ünde (%57) mutasyon saptanmıştır.

Kang ve ark.'nın (2006) yaptıkları çalışmada 68 hastanın 44'ünde (%65) mutasyon saptanmıştır. Soverini ve ark.'nın (2006) yaptığı çalışmada 297 hastanın 127'sinde (%43) mutasyon saptanmış olup, saptanan mutasyon oranları bizim çalışmamızda saptadığımız sonuçlar ile uyumludur. Willis ve ark.'nın (2005) çalışmasında akselere fazda gözlenen mutasyon oranı [27 akselere faz hastasının 10'unda (%37)], Wei ve ark.'nın çalışmasında ise geç kronik fazda gözlenen mutasyon oranı [7 geç kronik faz hastasının 4'ünde (%57)] bizim sonuçlarımızla korelasyon göstermektedir.

Jabbour ve ark. (2006)'nın yapmış olduğu çalışmada imatinib tedavisine karşı yetersiz yanıt gösteren 171 KML hastasından sadece 3'ünde (%2) T315I mutasyonu saptandığı ve bu hastalardan 2'sinin çalışma sırasında hayatta oldukları diğer hastanın ise öldüğü belirtilmiştir. Yine bu çalışma ile korelasyon gösteren Soverini ve ark.'nın (2005) yapmış olduğu çalışmada 19 hastanın hiçbirinde T315I mutasyonu saptanamazken; Branford ve ark.'nın (2003) yapmış olduğu çalışmada imatinib tedavisine başladıktan ortalama 8 ay sonra 27 hastadan 2'sinde (%7; bir hasta geç

kronik faz diğer hasta ise akselere fazda bulunmaktadır) T315I mutasyonu; 8 hastada ise (5 hasta akselere faz üç hasta ise geç kronik fazda bulunmakta) M351T mutasyonu saptanmıştır. T315I mutasyonunu daha yaygın olarak saptayan Hochhaus ve ark. (2002) 'nın yaptığı çalışmada imatinib tedavisi sırasında relaps gösteren 23 hastadan 6 (%26)'sında; Shah ve ark.'nın (2002) yaptığı çalışmada 37 hastanın 10 (%27)'sinde T315I mutasyonu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise imatinib tedavisine karşı yetersiz yanıt gösteren 30 KML hastasının 13 (%43)'ünde T315I [7'si (%50) erken kronik faz, 3'ü (%25) geç kronik faz ve 3'ü (%25) blastik faz] mutasyonu saptanmıştır. Çalışmalar arasında gözlenen bu farklılıklar, hastaların özelliklerinden, çalışma grubunu oluşturan hasta sayıları arasındaki farklardan ve mutasyonları saptamada kullanılan yöntemlerden kaynaklanabilir (Wei ve ark., 2006). Mutasyonları saptamada bizim kullandığımız ASO-PCR'ın yanı sıra real-time PCR, sekanslama, RT-PCR gibi yöntemler de kullanılmaktadır. ASO-PCR bilinen mutasyonların saptanmasında oldukça hassas bir yöntemdir ve kullanılan primerlere bağımlı olarak hassasiyeti değişmektedir. ASO-PCR, T315I ve E255K mutasyonları için 1000 yaban tip hücre arasından 1 mutant hücreyi; M351T mutasyonu için 100 yaban tip hücre arasından 1 mutant hücreyi saptayabilmektedir (Kang ve ark., 2006; Roche-Lestienne ve ark., 2002; Shah ve ark., 2002; Wei ve ark., 2006).

Bizim çalışmamızda daha fazla T315I mutasyonu saptanması, hastaların özelliklerinden, çalışma grubundaki hasta sayısının azlığından olabileceği gibi kullanılan metodun, kullanılan primerin hassasiyetinden de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. ASO-PCR ile mutant klon seviyesi düşük olan olgularda bile klinik olarak belirti vermeden mutasyonu saptamak mümkün olabilmektedir. Mutant klonların varlığını olabildiğince erken farketmek hastaların tedavisi açısından oldukça önem taşımaktadır.

Amino asit yer değişimlerinin biyolojik önemini saptamak için Hochhaus ve ark. (2002)'nın yaptıkları çalışmada in vitro ortamda imatinibin mutant kinaz aktivitesini inhibe etme yeteneği araştırılmıştır. İmatinibin yaban tip ABL'ı inhibe ettiği ortalama inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerinin 0.025μM olduğu, T315I ve E255K mutasyonlarının ise imatinibe karşı duyarlılığın azalmasına neden olduğu, imatinibin bu mutant kinaz aktivitesini inhibe edebilmek için konsantrasyonunun arttırılmasına

(IC_{50} 'nin >5 μM) gerek duyulduğu bildirilmektedir. M351T mutasyonunun ise ABL kinaz aktivitesini azalttığı ancak IC_{50} değerinin henüz tanımlanamadığı belirtilmiştir. Bu araştırmacıların yaptığı çalışmada imatinib tedavisi sırasında relaps gösteren 23 hastadan 6 (%26)'sında T315I, 3 (%13)'ünde E255K ve 4 (%17)'sinde M351T mutasyonları saptanmıştır. Yine bu çalışmada klinik olarak uygulanan imatinib dozlarına T315I ve/veya E255K mutasyonu taşıyanlarda yanıt alınamazken M351T mutasyonu taşıyanlarda orta derecede yanıt alındığı saptanmıştır. T315I ve/veya E255K mutasyonuna sahip hastaların taşıdıkları mutasyon nedeniyle, hastalıklarının kronik fazdan akselere faza hatta blastik krize ilerlemesinde yakın ilişki olduğu bildirilmektedir (Soverini ve ark., 2006 Corbin ve ark., 2003).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada M351T mutasyonu saptanan bir hasta, mutasyon saptandığı zaman akselere fazda iken dozajın arttırılması ile (400mg-600mg, hasta 600mg'ı tolere edememiş ve dozaj 500mg'a çekilmiştir) ilaca yanıt alınıp, hastalık geç kronik faza geçiş göstermiştir. Oysa T315I mutasyonu saptanan başka bir hasta, mutasyon analizi yapıldığında erken kronik fazda iken, imatinibin dozu arttırılmasına karşın son klinik değerlendirmede hastalığın geç kronik faza geçiş gösterdiği saptanmıştır. Bu durum Hochhaus ve ark.'nın (2002) yaptıkları çalışmada saptadıkları gibi farklı mutasyonların farklı derecede imatinib direncine yol açtığını, M351T mutasyonunun neden olduğu direncin, imatinib dozajının arttırılması ile aşılabildiğini ancak T315I ve E255K mutasyonlara karşı imatinib dozu arttırılsa bile yanıt alınamadığını göstermektedir.

Hem akselere faz hem de kronik faz hastalarında, kötü prognoz ile "P-loopta" yer alan mutasyonlar arasındaki güçlü ilişki ilk olarak Branford ve ark. (2003, 2004) tarafından gösterilmiştir. Avustralya'da yapılan bu çalışmada "P-loop" mutasyonları saptanan imatinib tedavisi alan 13 KML hastasından 12'sinin öldüğü ve mutasyon saptandığı tarihten itibaren ortalama yaşam süresinin 4.5 ay olduğu ve mutasyonlarla akselere ya da geç kronik faz evreleri arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Bu 13 hastadan 5'inde "P-loop" bölgesinde yer alan E255K mutasyonu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise 30 hastadan 3'ünde E255K mutasyonu pozitif olarak saptanmıştır. Bu üç hastadan birincisinde çalıştığımız üç mutasyon pozitif olarak

saptanmış olup bu hastanın öldüğü öğrenilmiştir, E255K mutasyonu saptanan ikinci hastada da çalıştığımız üç mutasyon saptanmış ve bu hastada yan etki nedeniyle imatinib kesilmiş ve hasta için uygulanan tedavi değiştirilmiş, hasta bu dönemde interferon-α almış ancak hastalık tekrar nüksetmiştir. Son hasta sadece E255K mutasyonuna sahiptir, bu hasta KML'nin geç kronik faz evresinde olup, kullandığı imatinibin dozu arttırılmış olmasına rağmen yanıt alınamamıştır. P-loop mutasyonlarından özellikle E255K'ı taşıyan hastaların yüksek imatinib direncine sahip olduğu bildirilmektedir, bu mutasyona sahip olan hastalarda kombine ilaç tedavisi önerilmektedir (O'hare ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda E255K mutasyonu taşıyan hastalarda imatinibe yanıt alınamaması Hochhaus ve ark.'nın (2002) ve O'hare ve ark.'nın yaptıkları çalışmaları ile uyumlu olarak, arttırılmış imatinib dozunun direnci yenemediğini gösteren bir bulgu olarak yorumlanabilir.

Bu tez çalışmasında, nokta mutasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalar arasında yaş ($p>0.05$), cinsiyet ($p>0.05$), imatinibe karşı gösterdikleri hematolojik yanıt ($p>0.05$) ve sitogenetik yanıt ($p>0.05$) açısından bir fark bulunamamıştır. Ancak sekonder direnç açısından nokta mutasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalar arasında ($p<0.01$) farklılık bulunmuştur. Nokta mutasyon saptanan hastaların %100'ünde ilaca karşı sekonder direnç varken nokta mutasyon saptanmayan hastaların %54,5'inde imatinib tedavisine sekonder direnç vardır. Bu durum imatinibe karşı direnç gelişiminde çalışma kapsamına alınan mutasyonlardan başka nokta mutasyonların veya tirozin kinaz domainindeki nokta mutasyonlar dışındaki dirence neden olan mekanizmaların da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tartışmalarda farklı araştırmacılar tarafından farklı yorumlanan başka bir konu ise BCR-ABL kinaz domaininde oluşan mutasyonların ne zaman meydana geldiği ile ilgilidir. Shah ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, başlangıçta imatinibe yanıt veren ve sonrasında relaps gösteren KML hastalarının %90'nında mutasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da T315I ve M351T mutasyonunu birlikte saptadığımız 2 hastada başlangıçta imatinib tedavisine yanıt alınırken daha sonra yanıt alınamadığı gözlemlenmiştir. 2006 yılında Ritchie ve Nichols'ün yayınladıkları derlemede kanser hücrelerinin yalnızca imatinib direncini kalıtsal olarak aktarmayabileceğini aynı

zamanda başlangıçta direnç yokken imatinib tedavisinden sonra direncin kazanılabileceği görüşünü vurgulamışlardır.

Çalışmamızda tek mutasyona sahip hastaların oranı %30, iki mutasyona sahip hastaların oranı %16.6 ve her üç mutasyona sahip hastaların oranı %6.6'dır. Bu üç mutasyonun görülmediği hasta oranı ise %43.3 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda 5 hastada T315I ve M351T mutasyonu birlikte bulunmuş olup, bu iki mutasyonun birlikte bulunma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.008). Bizim bilgilerimize göre ilk kez birden fazla hastada bu birliktelik saptanmıştır. 2004 Yılında İqbal ve ark.'nın (2004) yayınladıkları olgu sunusunda 1 KML hastasında T315I ve M351T mutasyonunu birlikte saptadıklarını ve bu iki mutasyonun aynı hastada saptanmasının literatürde ilk olgu olduğunu belirtmişlerdir. Birden fazla mutasyonun birlikte bulunmasının daha komplike imatinib direnci oluşturup, tedaviyi yönlendirmede tek mutasyon taşıyanlara göre daha fazla güçlük yaratabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Kang ve ark. 2006 yılında yayınladıkları çalışmada bir hastada T315I ve E255K mutasyonunu beraber saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 2 hastada T315I ve E255K mutasyonu birlikte saptanmış olup her üç mutasyona sahip hastaların sayısı 2'dir. Tek mutasyona sahip hastalar ile iki ya da üç mutasyona sahip hastalar arasında imatinibe karşı gösterdikleri hematolojik yanıt açısından farklılık saptanmıştır (p=0.024). Tek mutasyona sahip hastaların %100'ü imatinibe karşı hematolojik yanıt gösterirken, iki ya da üç mutasyona sahip hastaların %50'si imatinibe karşı hematolojik yanıt göstermektedir. Bu durum birden fazla mutasyona sahip hastaların hastalık seyrinin tek mutasyona sahip hastaların hastalık seyrine göre daha riskli olduğunu göstermektedir.

İmatinib direncine neden olan tirozin kinaz domain mutasyonları ile klinik parametreler, prognoz ve tedavi seçenekleri arasındaki ilişkiye ait ilgili bilgilerin iyi yorumlanabilmesi için geniş serilerle yapılan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması ile;

- İlk kez, imatinib tedavisine karşı yetersiz yanıt gösteren 30 KML hastasında T315I, E255K ve M351T mutasyonları araştırılmış olup, bu hastaların %43'ünde T315I; % 10'unda E255K ve %27'sinde M351T mutasyonları saptanmıştır.

- T315I mutasyonu ile M351T mutasyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, T315I mutasyonu pozitif hastalarda M351T mutasyonunun bulunma olasılığının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bilgi literatürde daha önce saptanmamış olması nedeniyle dikkat çekicidir.

- Hastalarda mutasyon saptanma oranı ile sekonder direnç gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

- Sonuç olarak ASO-PCR yöntemiyle Imatinib direncine neden olan mutasyonların ülkemizde ilk kez bu tez çalışması ile saptanması hastalığın prognozunu ve tedavi protokolünü yönlendirici olması nedeniyle klinik uygulamada yol gösterici olacaktır.

ÖZET

Imatinib Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında T315I, E255K ve M351T Mutasyonlarının Saptanması

Kronik Myeloid Lösemi (KML); Philadelphia (Ph) translokasyonunun t (9 ; 22) (q34 ; q11) varlığı ile karakterize BCR ve ABL genlerinin füzyonu ile sonuçlanan malign hematopoietik kök hücre hastalığıdır. Imatinib mesylate; ABL kinaz bölgesindeki amino asitlere bağlanır ve adenozin trifosfat (ATP) 'ın bağlanmasını bloke ederek BCR-ABL proteininin inaktif konformasyonda kalmasını indükler.

İmatinib tedavisi etkin bir tedavi yöntemi olmasına karşın, hastalar zamanla direnç geliştirebilmektedir. Bu çalışmada imatinib tedavisi alan KML hastalarında literatürde en sık gözlenen, imatinib bağlanma bölgesinde bulunan T315I; P-loop bölgesinde bulunan E255K ve katalitik bölgede bulunan M351T mutasyonlarının ASO-PCR ile taranması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda T315I, E255K ve M351T mutasyonları sırasıyla %43, %10 ve %27 oranında KML hastalarında saptanmıştır.

T315I mutasyonu ile M351T mutasyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve T351I mutasyonu taşıyan hastalarda M351I mutasyonunun bulunma olasılığı yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Hastalarda mutasyon saptanma oranı ile sekonder direnç gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Imatinib Direnci, ABL kinaz domain mutasyonları, ASO-PC

SUMMARY

Detection of T315I, E255K and M351T mutations in Chronic Myeloid Leukemia patients treated with Imatinib

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant hematopoietic stem cell disorder that is characterized by the Philadelphia (Ph) chromosome caused by t (9; 22) (q34; q11) which results in fusion of BCR and ABL genes. Imatinib mesylate induces the BCR-ABL protein stay in the inactive conformation by binding to amino acids in the ABL kinase domain and blocks the binding of adenosine triphosphate (ATP).

Although imatinib therapy is an effective treatment, some patients develope resistance to imatinib in time. In this study we've aimed to scan T315I, E255K and M351T mutations are found in imatinib binding region; P-loop region catalytic region respectively,which are observed frequently in the literature by ASO-PCR method in CML patients treated with imatinib.

In our study, T315I, E255K and M351T mutations are seen in %43, %10, %27 of CML patients respectively.

The correlation between T315I and M351T mutations are statisticaly significantly and M351T mutation is found high propability in the patient who carried T315I mutation. The relation between determination rate of mutation in the patients and development of seconder resistance is also significant.

Key Words: Imatinib resistance, ABL kinase domain mutations, ASO-PCR.

KAYNAKLAR

AGIRRE, X., ROMAN-GOMEZ, J., VAZQUEZ, I., VELASCO, A.J., LARRAYOZ, M., LAHORTIGA, I., ANDREU, E.J., MARQUEZ, J., HEREDIA, J.M., ODERO, M.D., PROSPER, F., CALASANZ, M.J., (2005). Coexistence of different clonal populations harboring the b3a2 (p210) and e1a2 (p190) BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* **160**:22-26.

BARNES, D.J., PALAIOLOGOU, D., PANOUSOPOULOU, E., SCHULTHEIS, B., YONG, A.S.M., WONG A., PATTACINI L., GOLDMAN J.M., MELO J.V., (2005). Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Research*. **65(19)**:8912-8919.

BEKSAÇ, M., (1997). Kronik Myelositer Lösemi. *Klinik Hematoloji*. Antıp Basımevi.

BRANFORD, S., RUDZKI, Z., WALSH, S., PARKINSON, I., GRIGG, A., SZER, J., TAYLOR, K., HERRMANN, R., SEYMOUR, J.F., ARTHUR, C., JOSKE, D., LYNCH, K., HUGHES, T., (2003). 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 apoor prognosis. *Blood*. **102(1)**:276-283.

BRANFORD, S., RUDZKI, Z., PARKINSON, I., GRIGG, A., TAYLOR, K., SEYMOUR, J.F., DURRANT, S., BROWETT, P., SCHWARER, A.P., ARTHUR, C., CATALANO, J., LEAHY, M.F., FILSHIE, R., BRADSTOCK, K., HERRMANN, R., JOSKE, D., HUGHES, T., (2004). Real-time quantitive PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*. **104(9)**:2926-2932.

BUBNOFF, N., PESCHEL, C., DUYSTER, J., (2003). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*. **17**:829-838.

CORBIN, A.S., La Rosee P., STOFFREGEN, E.P., Druker, B.J., Deininger, M.W., (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood.* **101**:4611–4614.

DAUB, H., SPECHT K., ULLRICH, A., (2004). Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nature Reviews*. **3**:1001-1010.

DEININGER, M., GOLDMAN, J.M., MELO, J.V., (2000). The molecular biology of chroniv myeloid leukemia. *Blood*. **96(10)**:3343-3356.

DEININGER, M., BUCHDUNGER E., DRUKER BJ., (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. **105**:2640-2653.

FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., O'BRIEN, S., KURZROCK, R., KANTARJIAN, H., (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine.* **341(3)**:164-172.

FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., KANTARJIAN, H., (1999). Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann Intern Med.* **131**:207-219.

FRANKS, L.M., TEICH, N.M., (2001). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. New York: Oxford University Pres, Inc., 3rd Edition. Chapter 12.

GAMBACORTI-PASSERINI C., GUNBY R., PIAZZA R., (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Lancet Oncology*. **4**:75-85

GAMBACORTI-PASSERINI C., BARNI, R., COUTRE, P., ZUCCHETTI, M., CABRITA, G., CLERIS, L., ROSSI, F., GIANAZZA, E., BRUEGGEN, J., COZENS, R., PIOLTELLİ, P., POGLIANI, E., CORNEO, G., FORMELLI, F., D'INCALCI, M., (2000). Role of α1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR- ABL(+) leukemic cells to the Abl inhibitor STI571. *Journal of the National Cancer Institute* **92**:1641–1650.

GORRE M.E., MOHAMMED M., ELLWOOD K., HSU, N., PAQUETTE, R., RAO, P.N., SAWYERS C.L., (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* **293**:876-880.

GRISWOLD I.J., MACPARTLIN M., BUMM T., CROSS V.L., O'HARE T., LEE K.A., CORBIN A.S., STOFFREGEN E.P., SMITH C., JOHNSON K., MOSESON E.M., WOOD L., POLAKIEWICZ R.D., DRUKER B.J., DEININGER M.W., (2006). Kinase domain mutants of BCR-ABL exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Molecular and Cellular Biology.* **26(16)**:6082-6093.

HOCHHAUS A., KREIL S., CORBIN A.S., ROSEE, P., MULLER, M.C., LAHAYE, T., HANFSTEIN, B., SCHOCH, C., CROSS, N.C.P., BERGER, U., GSCHAIDMEIER, H., DRUKER, B.J., HEHLMANN, R., (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. **16**:2190-2196.

IQBAL, Z., SIDDIQUI, R.T., QURESHI, J.A., KHALID, A.M., (2004). Case study of primary imatinib resistance and correlation of BCR-ABL multiple mutations in chronic myeloid leukemia. *Therapy*. **1(2):**249-254.

İLHAN, O., (2003). Kronik Miyelositer Lösemi. www.osmanilhan.com

JABBOUR, E., KANTARJIAN, H., JONES, D., TALPAZ, M., BEKELE, N., O'BRIEN, S., ZHOU, X., LUTHRA, R., MANERO, G.G., GILES, F., RIOS, M.B., VERSTOVSEK, S., CORTES, J., (2006). Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. **20**:1767-1773.

KANG, H.Y., HWANG, J.Y., KIM, S., GOH, H.G., KIM, M., KIM, D.W., (2006). Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia resistant to imatinib. *Haematologica.* **91**:659-662.

LITZOW, M.R., (2006). İmatinib Resistance Obstacles and Opportunities. *Arch Pathol Lab Med*. **130**:669-679.

MAHON, F.X., DEININGER, M.W.N., SCHULTHEIS, B., CHABROL, J., REIFFERS, J., GOLDMAN, J.M., MELO, J.V., (2000). Selection and characterization to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* **96(3)**:1070–1079.

MELO, J.V., CHUAH, C., (2006). Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters.*

NARDI, V., AZAM, M., DALEY, G.V., (2004). Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology.* **11**:35-43.

O'HARE, T., WALTERS, D.K., STOFFREGEN, E.P., SHERBENOU, D.W., HEINRICH, M.C., DEININGER, M.W., DRUKER, B.J., (2005). Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib. *Clin Cancer Res*. **11(19)**:6987-6993.

REN, R., (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nature*. **5**:172-183.

RITCHIE, E., NICHOLS, G., (2006). Mechanisms of resistance to imatinib in CML patients: a paradigm fort he advantages and pitfalls of nolecularly targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* **6(8):**645-657.

ROCHE-LESTIENNE, C., SOENEN-CORNU, V., GRARDEL-DUFLOS, N., LAI, J.L., PHILIPPE, N., FACON, T., FENAUX, P., PREUDHOMME, C., (2002). Several types of mutations of the abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can preexist to the onset of treatment. *Blood.* **100**:1014-8.

ROCHE-LESTIENNE, C., PREUDHOMME, C., (2003). Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Seminars in Henatology.* **40(2)**:80-82.

SAWYERS, C.L., (1999). Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **340**:1330-1340.

SHAH, N.P., NICOLL, J.M, NAGAR, B., GORRE M.E., PAQUETTE, R.L., KURIYAN, J., SAWYERS, C.L., (2002). 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*. **2**:117-125.

SOVERINI, S., MARTINELLI, G., ROSTI G., BASSI,S., AMABILE M., POERIO A., (2005). 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 sorter survival: a study by the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. *J.Clin. Oncol*. **23**:4100-4109

SOVERINI, S., COLAROSSI S., GNANI A., ROSTI G., CASTAGNETTI F., POERIO A., IACOBUCCI I., AMABILE M., ABRUZZESE E., ORLANDI E., RADAELLI F., CICCONE F., TIRIBELLI M., LORENZO R., CARACCIOLO C., IZZO B., PANE F., SAGLIO G., BACCARINI M., MARTINELLI G., (2006). Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients. *Clinical Cancer Research.* **12(24)**:7374-7379

VAN ETTEN, R.A., (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular funtions of c-ABL. *Cell Biology.* **9**:179-186

WALZ, C., SATTLER, M., (2005). Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Clinical Rev. İn Onc/ Hemat*

WEI, Y., HARDLING, M., OLSSON, B., HEZAVEH, R., RICKSTEN, A., STOCKELBERG, D., WADENVIK, H., (2006). Not all imatinib resistance in CML are BCR-ABL kinase domain mutations. *Ann Hematol*.

WEISBERG, E., GRIFFIN, J.D., (2001). Mechanisms of resistance imatinib (STI571) in preclinical models and in leukemia patients, Drug Resistance Updates. **4**: 22-28

WILLIS, S.G., LANGE, T., DEMEHRI, S., OTTO, S., CROSSMAN, L., NIEDERWIESER, D., STOFFREGEN, E.P., MCWENNEY, S., KOVACS, I., PARK, B., DRUKER B.J., DEININGER, M.V., (2005). High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* **106**:2128-37.

The Leukemia & Lymphoma Society, Novartis Oncology. (2003).

Ek-1

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek amacıyla düzenlenmiş olup, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizi kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Adı: Imatinib **(**Gleevec)'e karşı dirençli Kronik Myeloid Lösemi hastalarında farklı mutasyonların saptanması.

Araştırmanın Amacı: **K**ronik **M**yeloid **L**ösemi (KML); BCR ve ABL genlerinin füzyonu ile sonuçlanan bir hematopoietik kök hücre hastalığıdır. BCR-ABL füzyon geni sürekli olarak aktif kinaz üreterek etkilenen hücrelerin bölünerek çoğalmasını sağlar. Gleevec, BCR-ABL füzyon geninin enzimatik aktivitesini inhibe etmek üzere tasarlanan tedavi edici bir ajandır. KML tedavisi gören hastalarda Gleevec'e karşı direnç oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada amaç, direnç mekanizmasında etkili olduğu gösterilen ABL tirozin kinaz bölgesindeki nokta mutasyonlarından, literatürde en sık gözlenen mutasyonların araştırılmasıdır. Araştırma sonuçları, klinik hekimlere tedaviyi yönlendirici katkıda bulunacaktır.

Çalışmanın Protokolü: Bu çalışmaya katılacak hastalardan 5ml kan alınacak ve gen düzeyinde çalışma yapılacaktır. Çalışmaya katılacak bireylerin kimlikleri gizli tutulacak, elde edilen DNA'lar anonim olarak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilecektir.
Bu çalışma sizin için ekonomik açıdan bir yük getirmeyecektir.
Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabileceksiniz. Ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabileceksiniz.

Ben....., bu çalışma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim. Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

Bu bilgiler ışığında elde edilen DNA'mın ;

□ başka amaçla kullanılmaması
□ kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer araştırmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hastanın adı-soyadı: Sorumlu Araştırmacı:

Adresi: İmza:

Tel:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Dilara

Soyadı: Akçora

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 05.08.1981

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

Adres ve Telefon: Çiğdem mah. Ebru 1 Sitesi C Blok D:14 Balgat/ Ankara

akcoradilara@yahoo.com

312-284 43 82 / 0 542 545 07 77

Mezun Olduğu Okullar:

- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
- Polatlı Anadolu Lisesi
- Ayhan Gökay Busch Koleji

Yabancı Dil: İngilizce

Seminer: Histon Modifikasyonları ve Kanser

Bilimsel İlgi Alanları

Yurt Dışı Kongrelerde Poster Sunumu:

1. Sunguroglu A, Gumus-Akay G, Ozkal P, Varol N, **Akcora D**, Altinok B, Gokmen D, Avci A, Erguder IB, Devrim E, Durak I. Antiproliferative and apoptotic effects of garlic on chronic myeloid leukemia cell line. 54th Annual Congress on Medicinal Plant Research, 29 August-2 September 2006, Helsinki, Finland. Planta Medica. 2006: 72: 1057.

2. Durak I, Sunguroglu A, Avci A, Devrim E**,** Erguder IB, Gumus-Akay G, Ozkal P, Varol N**, Akcora D**, Altinok B, Gokmen D. Effects of aqoeus garlic extract on oxidant/antioxidant status in 32D and 32Dp210 cell lines. 54th Annual Congress on

Medicinal Plant Research, 29 August-2 September 2006, Helsinki, Finland. Planta Medica. 2006: 72: 1058.

Yurt İçi Kongrelerde Poster Sunumu

1. Gümüş-Akay G, Özkal P, Varol N, **Akçora D**, Altınok B, Durak I, Sunguroğlu A,. Sarımsağın BCR-ABL pozitif fare myeloid hücre serisi üzerindeki antiproliferatif ve apoptotic etkisi. IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi; 24-27 Kasım 2005, Manisa, s:72.