TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PEDİYATRİK AML HASTALARINDA FMS LIKE TYROSIN KINASE 3 (*FLT3*) VE NUCLEOPHOSMIN1 (*NPM1*) MUTASYONLARI

Dr. SEVGİ BAŞER

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. NÜKET YÜRÜR KUTLAY

ANKARA
2013

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan 'Pediyatrik AML Hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase 3 (*FLT3*) ve Nucleophosmin1 (*NPM1*) Mutasyonları' başlıklı Dr.Sevgi Başer'e ait tez çalışması, aşağıdaki juri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi olarak** kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.05.2013

Prof.Dr.Hatice Ilgın Ruhi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Juri Başkanı

Yrd.Doç.Dr.Halil G. Karabulut

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye

Yrd.Doç.Dr.Nüket Yürür Kutlay

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye/Tez Danışmanı

İTHAF

Ebediyete intikal eden Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasında gerekli imkanı sağlayan, öneri, katkı ve yönlendirmeleriyle çalışmalarımın her noktasında bana yardımını esirgemeyen, güler yüzünü, anlayışını ve paylaşımını hiçbir zaman eksik etmeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Nüket Yürür Kutlay'a şükranlarımı sunuyorum.

Ülkemizde Tıbbi Genetik eğitiminin önde gelen kuruluşlardan biri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda eğitimimi tamamlamış olmaktan onur duymaktayım. Ezbercilikten ve kolaycılıktan uzak, her konuda neden-sonuç ilişkisi kuran ve her departmanda işin mutfağında çalışarak öğreten bir eğitim modeli uyguladıkları için başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hatice I. Ruhi'ye, Prof.Dr.F. Ajlan Tükün'e, Yrd.Doç.Dr.Timur Tuncalı'ya, Yrd.Doç.Dr.Halil G. Karabulut'a ve Yrd.Doç.Dr.Nüket Y. Kutlay'a teşekkür ediyorum. Engin bilgi ve tecrübesiyle bizleri her zaman güneş gibi aydınlatan örnek aldığım iş disiplini anlayışıyla kendisine hayran bırakan saygıdeğer hocam Prof.Dr.F. Ajlan Tükün'e yardımlarından dolayı ayrıca teşekkür ediyorum.

Hasta bilgilerine ulaşmada yardımlarını esirgemeyen, yardımcı araştırmacı hocalarıma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Mehmet Ertem'e ve Uzm.Dr.Hasan Fatih Çakmaklı'ya; Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof.Dr. Gülsan Yavuz'a ve Doç.Dr.Handan Dinçaslan'a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmamı gerçekleştirebilmek için gerekli fiziksel şartların oluşturulmasında büyük pay sahibi olan, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen moleküler bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan moleküler departman sorumlusu hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Halil.G.Karabulut'a çok teşekkür ederim.Tez çalışmamın laboratuvar kısmında beni destekleyen, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Tuğrul Sutay'a, Bio.Efsun Eren'e ve Bio.Beste Tokgöz'e, bölümde birlikte çalıştığımız, desteğini esirgemeyen çok kıymetli mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Pozitif enerji ve desteğini hep hissettiğim ve kendisiyle bir dönem çalışma imkanı bulduğum Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr.Fatma Sılan'a çok teşekkür ediyorum. Ayrıca Uzm.Dr.Vehap Topçu'ya, Uzm.Dr.Kenan Delil'e, Uzm.Dr. Leyla Özer'e, Uzm.Dr.Arzu Vicdan'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma da teşekkür ediyorum. Bu süreçte desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen Aileme çok teşekkür ediyorum. Desteğini, yardımlarını ve fedakarlıklarını her zaman hissettiğim; arkadaşım, dostum, meslektaşım, sevgili eşim Uzm.Dr.Hayati Başer'e ve bu çalışmalar sırasında kendisine yeterli vakit ayıramadığım , var olma sebebim canım biricik kızım İrem'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr.Sevgi BAŞER

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay…….…… ……..… …….....i
İthaf……...……..ii
Önsöz..... ..... …….....iii
İçindekiler……..…….. …..…..... …….....iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini…….…… …… .....……...vi
Şekiller Dizini..... ..... …….....x
TablolarDizini..... ..... …….....xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ .... …….....1

2. GENEL BİLGİLER..... ..... ……..... 5
2.1. Lösemiler..... ..... ….....5
2.1.1. Lösemi Tarihçesi..... ..... …..... 5
2.1.2. Lösemilerin Moleküler Patolojisi…….…… 7
2.2.Akut Myeloid Lösemiler..... 9
2.2.1. AML Etiyolojisi……...……..... 9
2.2.2. AML'de Tanı..... 10
2.2.3. AML Sınıflaması..... 11
2.2.3.1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML..... 15
2.2.3.1.1. t(8;21)(q22;q22) ile seyreden AML…… ……...15
2.2.3.1.2. inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile seyreden AML …… …… 15
2.2.3.1.3. t(15;17)(q22;q21), (PML/RAR α) ile seyreden AML (APL) ……....16
2.2.3.1.4. 11q23(MLL) anomalisi ile seyreden AML (Mixed-Lineage Leukemia Gen Mutasyonları ……..……..……..…… …...…….…18
2.2.3.2. Çoğul Seri Displazisi ile Birlikte Seyreden AML… ……. ...……18
2.2.3.3. Tedaviye İkincil AML ve MDS……..…… …….....19
2.2.3.4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML'ler…..…… ……...……...…..20
2.2.3.5. Varyant:Down Sendromunda Görülen AML/Myeloproliferatif Hastalık..…….. …… …….....21
2.2.4. AML'de Diagnostik ve Prognostik Belirteçler……..…….....…. 22
2.2.5. Tedavi…….……...…...28
2.3. FLT3 (FMS-Like Tyrosine Kinase 3) ve Hematopoezdeki Rolü... …….....29
2.3.1. FLT3 Ligandı ve İşlevi...…...… ……..…….…… …...……..... ……31
2.3.2. FLT3 Reseptörü……..…… ..…….....34
2.3.3. Lösemilerde FLT3 Mutasyonları…….…… …..……...39
2.3.3.1. *FLT3* İnternal Tandem Duplikasyon Mutasyonu…..…….…….... 40
2.3.3.2. *FLT3* Tirozin Kinaz Domain Mutasyonları…..…… …. ...42
2.3.3.3. Mutasyonlar Sonucu Aktive Edilen FLT3 Yoluyla Sinyal İletimi… ….43
2.3.3.4. *FLT3* Mutasyonlarının AML'de Klinik Önemi……...…… …….....45
2.3.4. FLT3 İnhibitörleri…….…… ……49
2.4. *Nükleofosmın1 (NPM1*)……..…….…… …….. ..52
2.4.1. *NPM1* geni ve Proteininin Özellikleri…….…… .....…....53
2.4.1.1. Ribozom Sentezine Etkisi…….....…… …….…….....56
2.4.1.2. Sentrozom Organizasyonundaki Rolü……...…… …...…….....57

2.4.1.3. Nükleozom Orgonizasyondaki Rolü…… ……....58
2.4.1.4. DNA Tamir ve Hücre Siklusu İlişkisi……...…… ……..…..59
2.4.2. *NPM2* geni ve Proteininin Özelliği……...…….…… ……...…...61
2.4.3. *NPM3* geni ve Proteininin Özelliği……..……...…… ……..…...62
2.4.4. İnsan Kanserlerinde Nükleofosmin……...…… …….……..63
2.4.4.1. *NPM1* İçeren Translokasyonlar…… ……...….....63
2.4.4.2. *NPM1* gen Mutasyonları……..……...…… …….....64
2.4.4.3. *NPM1* Mutasyonlarının Tipleri…….. ……...66
2.4.4.4. *NPM1* Mutasyonlarının Sitogenetik, Moleküler ve Klinik Özellikleri...69

3. GEREÇ VE YÖNTEM..... ……74
3.1. Araştırmaya Alınan Hasta Örnekleri …… …….…… ...……...……74
3.2. Yöntem……...…… ...……...…….74
3.2.1. Kullanılan Cihazlar…….…..…… ……..…….....….74
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar……..…… ..……..……....…75
3.2.3. Solüsyonların Hazırlanması…… ……..…….....76
3.2.4.DNA izolasyonu…….…… …….....…...76
3.2.5. RNA izolasyonu…….…… ……...…….….....77
3.2.6. cDNA sentezi…… ……..……..…77
3.2.7. Agaroz jel elektroforezi……..…… …….....….78
3.2.8. *FLT3* geni ITD mutasyon bölgesinin PZR ile incelenmesi… …….....78
3.2.9. *FLT3* geni TKD (D835) Mutasyon Bölgesinin RFLP ile İncelenmesi....…80
3.2.10. *NPM1* geni 12.ekzon Mutasyonların Dizi Analizi ile İncelenmesi ……...82
3.3. İstatistiksel Analiz…….…… …….....85

4. BULGULAR..... 86
4.1. AML Tanılı Hastaların Genel Özellikleri…… ……...86
4.2. Sitogenetik Analiz Sonuçları…… …….....96
4.3. Moleküler Genetik Sonuçları…….… …….....98
4.4. Moleküler Sitogenetik Sonuçları…….… …….....99
4.5. *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD ve *NPM1* ekzon 12 Mutasyonu Sonuçları….. 100

5. TARTIŞMA……..... 117

6. SONUÇLAR……. ……..……...136

ÖZET 138
ABSTRACT 140
KAYNAKLAR..... 142
EKLER..... 167

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALCL :Anaplastic large-cell lymphoma (Anaplastik büyük hücreli lenfoma)
AKT1 :Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALL :Akut Lenfoid Lösemi
AML :Akut Myeloid Lösemi
APL :Akut Promyeloblastik Lösemi
ARF :ADP-ribosylation factor (ADP- ribozilasyon faktörü)
ARF :Alternative Reading Frame Protein
ATRA :All-Trans Retinoic Acid
bç :Baz çifti
C/EBPA :CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha (CCAAT/Enhancer Bağlayıcı protein Alfa)
CAMT :Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia (Konj. amegakaryositik trombositopeni)
CBF :Core binding factor
CBFβ :Core Binding Factor β
CD :Cluster of differentiation
cDNA :Complementary DNA (Komplementer DNA)
CK-2 :Casein Kinase 2 (Kazein kinaz 2)
CLP :Common lymphoid progenitör (Ortak lenfoid progenitörler)
CMP :Common myeloid progenitör
CSF-1 :The colony-stimulating factor 1 (c-FMS ligandı)
CR :Complete Remission (Tam Gerileme)
DC :Dendiritic Cell (Dendritik hücreler)
DFS :Disease-Free Survival (Hastalıksız sağ kalım)
DIC :Disseminated Intravascular Coagulation (Yaygın Damar içi pıhtılaşma)
dH2O :Distile H2O
DNA :Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik Asit)
dNTP :Deoksinükleotid trifosfat
EDTA :Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EFS :Event-Free Survival (Olaysız sağ kalım)
EGIL Sınıflaması :European Group for the Immunological Classification of Leukemias
Eo-KYH :Eozinofil-Koloni Yapıcı Hücre
ERK1/2 :Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 (Ekstraselüler-sinyal düzenleyen kinaz)

ETO	:Eight twenty one geni
EtBr	:Etityum Bromid
FAB	:French-American-British
FGFR3	:Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	:Fluorescence In Situ Hybridization
FL	:FLT3 ligandı
FLT3	:Fms-like tyrosine kinase 3 (FMS benzeri tirozin kinaz 3)
FLT3-ITD	:Fms-like tyrosine kinase 3 Internal Tandem Duplication
flt3-R	:FLT3 Reseptörü
FS	:Flow Sitometri
G-CSF	:Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (Granülosit-monosit koloni stimule edici faktör)
G-CSFR	:Granülosit CSF Receptor
GM-CSFRα	:Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alfa (Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptör alfa)
GMP	:Granülosit/Makrofaj progenitörleri
Grb2	:Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 (Protein growth faktör reseptör bağlı protein 2)
HCl	:Hydrochloric Acid (Hidroklorik asit)
HLA DR	:MHC Class II Cell Surface Receptor
HSC	:Hematopoietic Stem Cells (Hematopoetik kök hücresi :HKH)
ITD	:Internal Tandem Duplication (İnternal tandem duplikasyon)
ITS2	:Internal Transcribed Spacer
KL	:KIT ligandı
KCl	:Potassium Chloride(Potasyum klorür)
KOH	:Potassium Hydroxide (Potasyum Hidroksit)
KHT	:Kök hücre transplantasyonu
KLL	:Kronik lenfoid lösemi
KML	:Kronik myeloid lösemi
JAK2	:Janus kinase 2
MAP	:Mitogen-Activated Protein
MAP kinaz	:Mitogen-activated protein kinases
MB	:Metal Binding Domain (Metal bağlayan domain)
Mb	:Mega baz
M-CSF	:Macrophage Colony-Stimulating Factor (Makrofaj koloni stimüle edici factor)
M-CSFR	:Makrofaj CSF Receptor

MDS :Myelodisplastik Sendrom
Meg-KYH :Megakaryosit-Koloni Yapıcı Hücre
MEP :Megakaryosit/eritrosit progenitörleri
MgCl2 :Magnezyum Klorid
M-KYH :Makrofaj-Koloni Yapıcı Hücre
MLL :Mixed-Lineage-Leukemia
MPD :Myeloproliferatif disorders
MPO :Myeloperoxidase
MPÖH :Multipotent öncü hücreleri
MRD :Minimal Residual Disease (Minimal Rezidüel Hastalık)
mRNA :Messenger RNA
MYH11 :Muscle Myosin Heavy chain 11 geni
NAB :Nükleer asit bağlayıcı domain
NaOH :Sodyum hidroksit
NCoR :Nüklear co-repressor
NES :Nuclear Export Signal (Nüklear Eksport Sinyali)
NK :Doğal öldürücü (natural killer) hücreler
NLS :Nuclear Localization Signal (Nüklear Lokalizasyon Sinyali)
N-RAS :Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog (Nöroblastoma RAS viral onkogen homoloğu)
NPM1 :Nucleophosmin (Nükleofosmin1geni)
OS :Overall survival (genel sağ kalım)
p :Kromozomun kısa kolu
PAS :Periodic acid–Schiff
PDGF α ve β :Platelet-Derived Growth Factor Receptors α ve β
PI-3 kinase :Phosphatidylinositol 3-kinase
PLC-β :Phospholipase C
PML :Promiyelositik lösemi geni
PU.1 :Ezb transformation–specific sequence ailesine ait bir transkripsiyon faktörü
PZR :Polimeraz zincir reaksiyonu
q :Kromozom Uzun Kolu
RARα :Retinoik Asit Reseptör alfa
RasGAP :RAS p21 protein activator 1
RFS :Relapse-Free Survival (Nüks olmadan sağ kalım)
RGS2 :Regulator of G-Protein Signaling 2 (G protein sinyal regülatörü)
RP L5 :NPM'nin ribozomal protein L5

RNA	:Ribonucleic Acid (Ribonükleik asit)
RNaz	:Ribonükleaz
RTK	:Reseptör Tirozin Kinaz
SB	:Sudan Black boyası
SCF	:Stem Cell Factor (Kök hücre faktörü)
SH2	:Src-homology-2
SSC	:Saline / Sodium / Citrate
SSS	:Santral sinir sistemi
STAT	:The signal transducers and activators of transcription factors family
Stell	:Stem Cell
SHC	:Src homology 2 domain containing transforming protein 1
SHP2	**:**PTPN11 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
ST-HSC	:Kısa süreli hematopoetik kök hücreler
TBE	:Tris / Borik asit / EDTA
TCR-β	:T-hücre reseptör beta
TEMED	:Tetrametil-Etilendiamin
TKD	:Tyrosine Kinases Domain (*FLT3* geni Tirozin Kinaz Domain)
TrkA	:Tirozin kinaz inhibitörü
VAV 1	:Vav 1 Guanine Nucleotide Exchange Factor (Guanine nucleotide exchange factor ailesinin bir üyesi)

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 İki basamaklı lökomogenez ve bu basamaklarda mutasyona uğrayan genler ve işlevleri ……..…….. ….… … …… ..8
Şekil 2.2 FLT3 Ligandı ve tipleri…… …. .. …… ….. ……. ...32
Şekil 2.3 FL'in biyolojik aktivitesi…….. ……...…… ….34
Şekil 2.4 Sınıf III reseptör Tirozin kinaz'ın şematize şekli, ……..…… …….....36
Şekil 2.5 FL-FLT3 reseptör sinyal yolağı ……..…… …….…….....37
Şekil 2.6 Hematopoetik hiyerarşide FLT3 ekspresyonunun rolü …… ….. …….38
Şekil 2.7 FLT3 reseptör aktivasyonunun diğer sinyal iletim yolakları ile ilişkisi ….45
Şekil 2.8 İnsan NPM proteinin şematize şekli……..…… …….....53
Şekil 2.9 Yaban tip NPM1'in fonksiyonel ve yapısal bölgesi…… ……..…….....54
Şekil 2.10 NPM1 proteininin işlevleri ……. ……..…… ……..56
Şekil 2.11 ARF, mdm2 ve p53 ilişkisi …… ……..……60
Şekil 2.12 İnsan NPM2 ve NPM3 proteinin şematik gösterimi… …… …..…….62
Şekil 2.13 Hematolojik malignitelerde değişmiş NPM proteinlerinin fonksiyonel ve yapısal bölgesi. ……..... ……...63
Şekil 2.14 NPM1 geninin şematik sunumu…… …....64
Şekil 2.15 Ekzon 12'deki *NPM1* mutasyon tipleri ve kodladığı proteinler… …....67
Şekil 2.16 Yaban tip ve mutant tip NPM1'in nükleostoplazmik trafiği…… …....68
Şekil 3.1 FLT3-ITD gDNA ekzon14-15 ve Primerlerin bağlanma yerleri…… ..…79
Şekil 3.2 FLT3-ITD Mutasyonu İçin Kullanılan (cDNA) Primerler ……...…..79
Şekil 3.3 FLT3-TKD mutasyonları için kullanılan (cDNA) Primerler…… 81
Şekil 3.4 *NPM1* geni ekzon 12 mutasyonları için kullanılan (gDNA) primerler… . 82
Şekil 3.5 Yaban tip *NPM1* dizi analizi görüntüsü…….. ……....84
Şekil 4.1 Çalışma grubundaki hastaların cinsiyete göre dağılımları... 86
Şekil 4.2 Hastaların yaşlarına göre dağılımları... ……..….86
Şekil 4.3 FAB Olguların FAB/WHO'a göre sınıflandırılması …… 95
Şekil 4.4 FLT3 geni ITD bölgesi PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü..101
Şekil 4.5 *FLT3* geni TKD bölgesi PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü101
Şekil 4.6 *FLT3*-TKD PZR ürününün EcoRV ile enzim kesimi sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü. ……...……102

Şekil 4.7 *NPM1* geninin PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü. ……..…102
Şekil 4.8 Olgu 5, Tip A *NPM1* mutasyonu..... 103
Şekil 4.9 Olgu 10, *NPM1* nokta mutasyonu..... 103
Şekil 4.10 Olgu 22, *NPM1* nokta mutasyonu…… ……103
Şekil 4.11 Nokta mutasyonun *NPM1* ekzon 12'daki lokalizasyonu……104
Şekil 4.12 22917. Lokalizasyondaki nokta mutasyon ve bu bölgeye en yakın miRNA'lar…… ….....105

TABLOLAR:

Tablo 2.1. AML'ye yatkınlık oluşturan faktörler…… ……..……....9
Tablo 2.2. AML'de FAB sınıflaması (1985)……...……..…..… ….....12
Tablo 2.3. EGIL Sınıflaması …… ...……..13
Tablo 2.4. Akut Lösemi WHO Sınıflaması (2001) …...…… …….…..…....14
Tablo 2.5.AML'de diyagnostik kromozomal anomaliler, ilişkili olduğu moleküler belirteçler ve prognostik önemi…… ….....……....24
Tablo 2.6. AML'de sitogenetik risk değerlendirmesi (2010)...…… ..……...……..26
Tablo 2.7. Sitogenetik ve Moleküler belirteçlerle risk grupları……..…….....27
Tablo 2.8. Sınıf III tirozin kinaz reseptör ailesinin üyeleri……. ..…….....35
Tablo 2.9. Pediyatrik AML'de FLT3/ITD mutasyonlarının prognostik etkisi.....48
Tablo 3.1. cDNA sentez içeriği…… ……..77
Tablo 3.2. cDNA PZR koşulları……..…… ……..77
Tablo 3.3. FLT3 geni ITD mutasyon bölgesi PZR içeriği…… ……...….78
Tablo 3.4. *FLT3* Geni ITD Mutasyonu İçin Kullanılan Primerler ve PZR ürün Boyutları…….. ……79
Tablo 3.5. FLT3 geni ITD mutasyon bölgesi PZR koşulları ……...……...…. ….80
Tablo 3.6. FLT3 geni D835 nokta mutasyonu PZR içeriği . ……. ……..80
Tablo 3.7. FLT3 Geni TKD Primerleri ..……... ……..…80
Tablo 3.8. FLT3/TKD PZR koşulları……. ……..…..81
Tablo 3.9. FLT3 Geni TKD Mutasyonu İçin Yapılan Enzim Kesiminin İçeriği…...81
Tablo 3.10. *NPM1* geni 12.ekzon PZR Mutasyonları İçeriği ……. ……..……82
Tablo 3.11. NPM Geni Ekzon 12 Mutasyonları İçin PZR Primerleri . ……..……..82
Tablo 3.12. *NPM* Geni PZR Koşulları……....83
Tablo 3.13. Sekans Primerleri…… ……....83
Tablo 3.14. Sekans PZR İçeriği…… …….83
Tablo 3.15. *NPM* Geni 12.ekzon dizi analizi PZR koşulları …….……84
Tablo 4.1. Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri ……..… …… …..89
Tablo 4.2. Rutin çalışılan pediatrik AML ve ALL panelleri.... ……..…...96
Tablo 4.3. Hastaların Tüm Genetik sonuçları……...… ……...106

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler çocukluk çağının en çok görülen malign hastalıkları olup çocukluk çağı kanserlerinin 1/4'ünü oluşturur. Akut lösemiler çocukluk çağı kanserleri içinde ölümcül etkisi bilinen en yaygın hastalıklardır. Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) 2001 yılı sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Akut Lenfoid Lösemi (ALL) diğer lenfoid maligniteler gibi tek bir öncül hücrenin malign dönüşümü ve klonal çoğalma sonucunda ortaya çıkmaktadır. Akut Myeloid Lösemi (AML) ise miyeloid, eritroid, megakaryositik ve monositik hücre dizi öncülerinin çoklu gen mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmelerinden kaynaklanan heterojen bir lösemi grubudur.

Myeloid lökomogenez; bir hematopoetik kök veya progenitör hücreyi, farklılaşamayacağı proliferatif bir hücreye dönüştüren kompleks bir işlemdir. Translokasyonlar, gen mutasyonları ve delesyonlar gibi çeşitli genetik değişimler bu işlemde rol oynar. Gen füzyonu oluşturan dengeli translokasyonlar bazı lösemi çeşitlerinde major bir lökomojenik rol oynar.

Lösemi tedavisinde daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi için öncelikle hastalığın patogenezinde etkili faktörler tanımlanmalıdır. Sonuç olarak lösemi patogenezinde rol oynayan belli mutasyonların saptanması hem hastalığın nedenlerinin anlaşılması hem de asıl amaç olan tedavi için yeni fırsatlar sunacaktır.

AML çocukluk lösemilerinin %15-20'si ve yetişkin lösemilerinin yaklaşık %35'ini oluşturan klinik ve genetik yönden heterojen bir hastalıktır. Yapılan sitogenetik analizler; AML'nin yüksek, orta ve düşük risk şeklinde sınıflandırılmasına olanak tanımıştır. Olguların %60-%70'ini içeren orta risk kategorisindeki AML hastaları için prognostik öneme sahip olan orjinal belirteçler belirlenmiştir.

Gen mutasyonlarının, normal karyotipe (NK-AML) sahip olguların gelişiminde

rol oynadığı düşünülmektedir. Gerçekten, *NPM1* ve *FLT3* gibi çeşitli genlerdeki mutasyonların tanımlanması prognoz açısından farklı alt gruplar oluşturmuştur.

Geleneksel olarak, pediyatrik AML'de kullanılan prognostik faktörler; morfoloji/fenotip, sitogenetik ve tedaviye yanıt olarak tanımlanmaktadır.

Pediyatrik AML ile ilgili yapılan çalışmalarda *FLT3* geni ve *NPM1* geni mutasyonlarının, sağ kalım ve tedavi düzenlenmesindeki etkisi belirlenmiştir. *FLT3* geni mutasyonları, pediyatrik AML'de en sık görülen mutasyon olup sıklığı %25-30 arasındadır. FLT3, sınıf 3 reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Hematopoetik öncü hücrelerde eksprese olur ve hematopoezde önemli rol oynar. *FLT3* gen mutasyonuna sahip hastalar, daha yüksek tekrarlama riski ve daha düşük sağ kalım oranına sahiptirler. Ayrıca mutant/normal *FLT3* gen oranlarının sağ kalımla ilişkili olarak bir takip kriteri olarak kullanılabileceği de son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Özellikle hedefe yönelik spesifik tedaviyi amaçlayan yakın zamanlı çalışmalarda; *FLT3* mutasyonu saptanan olgularda, FLT3 inhibitörlerinin tek başına veya bilinen protokollerle birlikte kullanılmasının remisyon oranında artış gösterdiği fakat sağ kalım üzerinde henüz net bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sağ kalım üzerindeki etkisini artırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir.

NPM'nin hücrede birçok temel role sahip olduğu gösterilmiştir. NPM'nin protein kümeleşmesini baskılamak, ısıya bağlı doğal yapının bozulması esnasında ortaya çıkan aktivite kaybına karşı enzimleri korumak ve kimyasal olarak bozulmuş denatüre proteinlerin yeniden renatürasyonunu artırmak gibi moleküler koruyucu aktiviteleri bulunmaktadır. NPM1 ribozom biyosentezinde kilit rol oynamaktadır. Bileşenlerin çekirdekten sitoplazmaya uygun bir şekilde nakledilmesini sağlamakta ve ribozom birleşmesi esnasında proteinlerin kümeleşmesini engellemektedir. Sonuç olarak, NPM'nin protein sentezini düzenlemede, hücre gelişiminde ve çoğalmasında önemli görevleri vardır. NPM ayrıca genomla ilgili kararlılığın idame ettirilmesinde de etkindir. NPM duplike olmayan sentrozomlara eşlik ederek ve duplikasyonu engelleyerek sentrozom duplikasyonunun regülasyonunu sağlamaktadır.

NPM1 geninin 12. ekzonundaki somatik mutasyonlar en sık rastlanan genetik anormalliklerdir; öyle ki, bu mutasyonlar yetişkin AML'sinde bütün vakaların yaklaşık %35'inde ve NK-AML'si olan hastaların %60'ında bulunmaktadır. Çocuklarda, *NPM1* mutasyonları çok daha az rastlanır ve bütün AML vakalarının %0-12'inde, normal karyotip taşıyan vakaların yaklaşık %25'inde görülür. *NPM1* mutasyonları NPM proteininin sitoplazmaya doğru tipik olmayan bir şekilde yerleşmesine yol açar, bu nedenle de NPMc+ AML olarak adlandırılır. NPMc+ AML ağırlıklı olarak normal karyotipli hastalarda görülür.

NPM1 mutasyonunun varlığı (NPMc+) olumlu prognostik etkiyle ilişkiliyken *FLT3- ITD* (internal tandem duplikasyon) mutasyonunun varlığı sağ kalım üzerinde olumsuz etkisidir. NK-AML'li yetişkin hastalarda *FLT3-ITD* mutasyonu olmaksızın *NPM1* mutasyonunun bulunması pozitif prognozlu belirteç olarak kabul edilir. Ancak NK-AML'li çocuklarda bulunması *NPM1* mutasyonunun EFS (event-free survival=olaysız sağ kalım) ve OS (overall survival=genel sağ kalım)'daki pozitif prognostik etkisi *FLT3-ITD* mutasyon durumundan bağımsız olarak değerlendirilmektedir.

NPM1 mutasyonu olan AML hastalarının yaklaşık %80'inde tedavinin 16. günü gibi erken döneminde lösemik hücrelerin uzaklaştırılmasıyla tam gerileme görülmektedir. *NPM1*'in mutasyona uğradığı AML'deki kemoduyarlılık nukleofosminin çekirdekçikten sitoplazmaya atipik dislokasyonuyla ilişkilendirilmekle birlikte altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmadaki amacımız; 2007-2012 yılları arasına pediyatrik hematoloji ve onkoloji kliniklerinden polikliniğimize yönlendirilen 23 pediatrik AML hasta grubunda *FLT3* ve *NPM1* genlerindeki mutasyonlarının sıklığını araştırmaktır. Bu amaçla *NPM1* mutasyonunun tespiti için dizi analizi, *FLT3*-ITD için PZR ve FLT3-TKD için RFLP yöntemleri kullanıldı. Hastaların sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçları karşılaştırılarak klinik özellikleri ile birlikte değerlendirildi. Literatürde, özellikle çocukluk çağı AML hastalarına ait *FLT3* ve

NPM1 genlerinin mutasyonlarının prognostik önemi bilinmekle beraber, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçların hepsinin birlikte değerlendirildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma aynı zamanda ülkemizde çocukluk çağı AML'li olgularda *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır. AML hastalarının izleminde *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının araştırılması, hastaların tedavilerinin belirlenmesinde yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lösemiler

Lösemiler hematopoetik sistemden kaynağını alan, klonal, neoplazik kan hastalıkları olarak tanımlanabilir. Lösemiler normal kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma ve/veya homeostasis sürecinde rol oynayan genlerin yapısal veya fonksiyonel olarak hatalı çalışmaları sonucu oluşur (1).

Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) 2001 yılı sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Akut lösemiler, hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişir. Normal kan hücrelerinin yapılamaması, aşırı çoğalma kabiliyeti gösteren lösemik hücrelerin kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesi ile karakterizedir (2).

2.1.1. Lösemi Tarihçesi

Kanser terimi ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) 'organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları' için kullanılmıştır. Vücut yüzeyinde büyüyen ve genellikle ülsere olan, kırmızı, sıcak, ağrılı, diğerlerinden farklı karakterde olup daha yavaş büyüyen şişliklere Hipokrat, "karkinos" ya da "karkinoma", Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise yengece benzettiği görünümü nedeniyle "kanser" adını vermiştir (3, 4).

Hematoloji deyimi ilk kez Thomas Schwenke tarafından 1743'de kullanılmıştır (5). Mikroskobun 1590 yılında Zaharias Jansen tarafından bulunmuş olmasına karşın tıp alanında ancak 19. yüzyıl başlarında kullanılmaya başlanması löseminin diğer kanser grubu hastalıklardan daha sonra tanımlanmasına neden olmuştur. Alfred Donne, mikroskobu ilk kez klinikte kullanmıştır. John Hughes Bennett (1812-1875) tarafından 1845'de lösemiyi anlatan bir makale yayınlamıştır. Bu makalede olguların klinik bulguları (splenomegali, hepatomegali, ateş, halsizlik) ve kanın mikroskobik incelenmesi (değişik hücre oluşumları, lökosit artışı) belirtilmiştir. Bu hastalığı ilk

gözlemleyen Donne olmakla birlikte, bulgularını 1855'e kadar yayınlamaması nedeniyle, Bennett'in yayını lösemi hakkındaki ilk klinik makale olarak kabul edilmektedir.

Lösemi ile ilgili ikinci olgu ise Virchow (1821-1902) tarafından rapor edilmiştir. Bennett'tan 6 hafta sonra yayınladığı makalesinde, alt abdomende dört yıldır şişlik şikayeti olan 50 yaşındaki hastanın ölümü sonrasında yaptığı inceleme sonucunda, damarların her yerinde iltihaba benzer bir oluşum ile birlikte değişik şekillerde hücre oluşumları olduğunu, normal kandaki eritrosit ve lökosit oranının tersine döndüğünü göstermiştir. Yaşayan hastada löseminin mikroskobik tanısı ise, ilk kez Henry Fuller tarafından 1846'da gerçekleştirilmiştir. Virchow, 1847'de benzer bir olgu yayınlamış ve bu yeni hastalığı tanımlamada "leukemia" (beyaz kan) terimini kullanmıştır. Bennett ise "leucocythaemia" terimini tercih etmiştir (4, 6, 7).

Virchow, 1849'da yayınladığı üçüncü olguda, kronik löseminin splenik ve lenfatik formlarının olduğunu bildirmiştir. Bu sınıflamadan 12 yıl sonra kronik löseminin, kronik lenfositik lösemi ve kronik miyelositik lösemi olarak iki ana tipini tanımlamıştır (6). Akut löseminin tanımı ise, 1857'de Nikolaus Friedreich tarafından yapılmıştır. Hastalığın ortaya çıkışı ve hastanın ölümü arasında geçen sürenin kısalığı ve hastalağın hızlı bir seyir izlemesi nedeniyle Friedreich, bu durumu akut löseminin lenfatik tipi olarak tanımlamıştır (4, 8).

On dokuzuncu yüzyılın ortalarına kadar kabul gören, kanın lenfatik glandüler ya da dalaktan kaynaklandığı düşüncesi, Virchow, Bennett ve Neumann tarafından sorgulanmaya başlanmış ve Ernst Neumann, 1870'de kemik iliğinin kan hücrelerinin yapımında önemli bir yeri olduğunu, löseminin kemik iliğindeki değişikliklerden kaynaklandığını göstermiştir. Paul Ehrlich'in, 1877'de kan hücreleri arasındaki farklılaşmayı gösteren boyama yöntemini bulması, tıpta yeni bir çağı başlatmıştır. Beyaz kan hücrelerinin üç farklı granülosit tipi (eozinofil, bazofil, nötrofil) olduğunu göstermiştir (1880). Bu yeni bulgu, kronik lösemide kemik iliğinin hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre, lenfoid ve miyeloid olarak sınıflandırılmasını kolaylaştırmıştır. Naegeli, 1900'de periferik kanda lenfoblast ve miyeloblastları

göstermiştir (7, 9). Akut monositer löseminin tanımlanması ise 1913 yılında Dr. Hasan Reşat Sığındım ve Dr. Schilling tarafından yapılmış (8,10) ve "Akut monositer lösemi" aynı yıl Münchener Medzinicher-Wochenschrift dergisinin 36. sayısında yayınlanmıştır (4, 11). Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia kromozomunun 1960'da bulunması kronik miyelositik löseminin patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Janet Rowley, 1973'de Philadelphia kromozomunun, 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyonu olduğunu göstermiştir (6, 9).

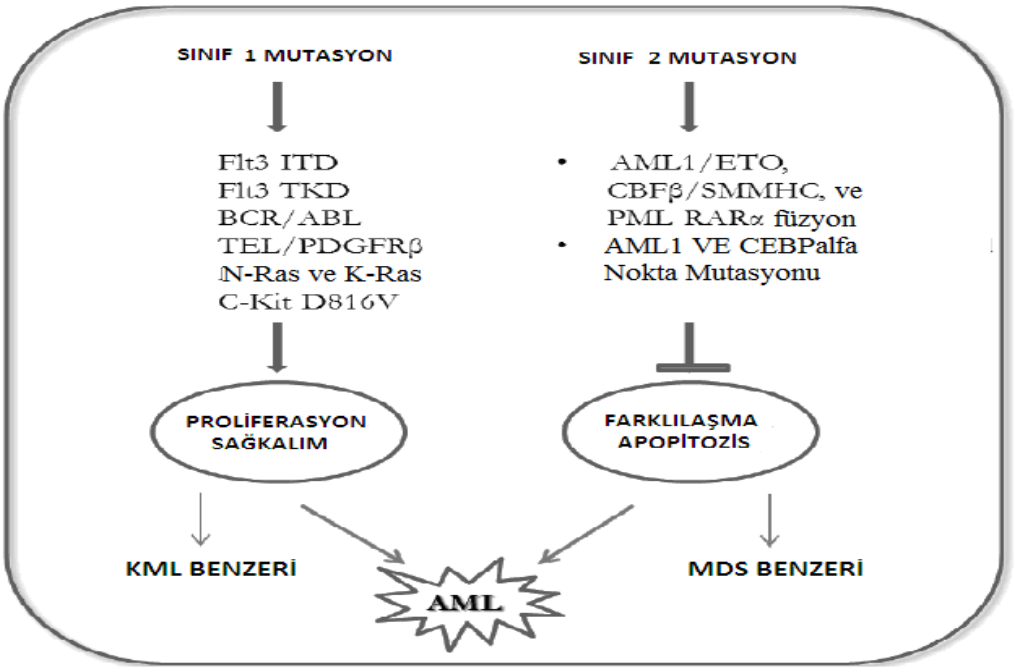
2.1.2. Lösemilerin Moleküler Patolojisi

Akut Lenfoid Lösemi (ALL) diğer lenfoid maligniteler gibi tek bir öncül hücrenin malign dönüşümü ile klonal çoğalma sonucunda ortaya çıkmaktadır. Akut Myeloid Lösemi (AML) ise miyeloid, monositik, eritroid ve megakaryositik hücre serilerinin kemik iliği prekürsörlerinden oluşan, heterojen bir dağılım gösteren hematolojik malignite grubudur. Özellikle AML'de tedavi protokollerinde son 30 yıldır yaşanan çok önemli gelişmeler sonucunda pediatrik hastalarda 5 yıl hastalıksız yaşam oranı yaklaşık %50 olarak bildirilmektedir (12).

Sitogenetik çalışmalar lösemilerin yaklaşık yarısında sık tekrarlayan kromozom anormalliklerinin bulunduğunu göstermiştir. Translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar şeklinde olan bu yapısal kromozomal anormalilerin etkilediği genler incelendiğinde, hematopoetik sistemin gelişiminde ve normal fonksiyonunda rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu genlerle ilgili kalıcı yapısal değişikliklerin (mutasyonlar) yanı sıra epigenetik değişiklikler de tanımlanmıştır. Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında bazı genellemeler yapılmaktadır. Bunlardan ilki; somatik dokulardaki normal hücrelerden farklı olarak gen kontrol mekanizmalarını bozan ya da kesintiye uğratan kromozom anormallikler görülmesidir. Normal hematopoez esnasında belirli bir noktada meydana gelen genetik bozukluk, özel bir hematopoetik farklılaşma hattının lösemisi ile sonuçlanır. Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında yapılan diğer bir genelleme de genel olarak kanserlerde olduğu gibi lösemilerin tek bir hücreden gelişerek klonal çoğalmalarıdır. Malign klonun dominant hale gelmesi normal klonlara göre daha hızlı ve dirençli bir şekilde çoğalması ile mümkün olabilecektir. Bu nedenle lökomogenezin en az iki basamaklı

bir süreç olduğu hipotezi ileri sürülmüştür. Bu süreçte lösemi hücrelerinin klonal olarak çoğalabilmesi için ilk olarak farklılaşmanın engellenmesi sonrasında ise aşırı çoğalmayı önleyecek hücresel basamakların ortadan kaldırılmasının gerektiği belirtilmektedir. Lösemide, hematopoetik farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin etkilendiğinin gösterilmesi bu hipotezi destekleyen verilerden biridir (13).

AML patogenezinde rol oynayan mutasyonlar genelde iki alt grupta tanımlanmaktadır. Bunlardan birinci grup sinyal ileti sistemini aktive ederler ki proliferasyon artışı veya sağ kalım avantajı ile sonuçlanır. İkinci grup ise transkripsiyon faktörleri üzerinden transkripsiyonel koaktivasyon komplekslerini etkiler ki farklılaşmada azalma ya da kendini yenileme kapasitesinde artış ile sonuçlanırlar. Nadiren aynı hastada aynı gruptan iki mutasyon birarada olmakla birlikte genelde iki gruptan ayrı mutasyonlar aynı hastada olma eğilimindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İki basamaklı lökomogenez ve bu basamaklarda mutasyona uğrayan genler ve işlevi, Takahashi ve ark. (14)'den alınmıştır.

2.2. Akut Myeloid Lösemiler

AML çocukluk çağı lösemilerinin %15-20'sini oluşturur. Dünyada insidansı her yıl milyonda 5-7 olarak bildirilmiştir. İlk iki yaş insidansın en yüksek olduğu yaştır (milyonda 11). Dokuz yaşına kadar insidans çok azalır, adolesan dönemde yeniden artış gösterir (milyonda 9). Sonra bu sıklıkta görülmeye devam eder. Kız ve erkek çocuklarda eşit oranlarda izlenir. Çocukların çoğunda AML gelişimini açıklayabilecek bir risk faktörü yoktur. Ancak bazı olgularda yatkınlık artırıcı, kalıtsal ve kazanılmış risk faktörleri saptanmıştır (15).

2.2.1. AML etiyolojisi

Tüm AML hastalarında etiyolojiyi açıklayacak bir risk faktörü bulunmamakla birlikte (de novo AML: yeni tanı AML), kalıtsal, kazanılmış ve çevresel yatkınlık artırıcı birçok faktör tanımlanmıştır (16), (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 AML'ye yatkınlık oluşturan faktörler, Liesveld ve ark. (16)'den alınmıştır.

Çevresel Faktörler	İyonize Radyasyon
	Kimyasallar
	Prenatal dönemde alkole maruziyet
	Prenatal dönemde sigara dumanına maruziyet
Kalıtsal Faktörler	Ailede AML öyküsü
	Ailevi trombosit hastalığı (FDP)
	Ataksi Telenjektazi
	Bloom Sendromu
	Diskeratozis konjenita
	Down Sendromu
	Dubowitz Sendromu
	Fankoni anemisi
	Klinefelter Sendromu
	Konjenital amegakaryositik trombositopeni (CAMT)
	Kostman sendromu
	Li Fraumeni Sendromu
	Nörofibromatozis Tip I
	Noonan Sendromu
	Poland Sendromu
	Schwachman – Diamond sendromu
	Seckel sendromu
	Willms Tümörü
	Wolf Hirschhorn sendromu

Edinsel Faktörler	Aplastik anemi
	Edinsel amegakaryositik trombositopeni (AAMT)
	Klonal sitopeniler
	Myelodisplastik Sendrom (MDS)
	Myeloma
	Polysitemia vera

Lösemilerle ilişkili genetik açıklamalar, tekrarlayıcı kromozom anomalilerinin bu hastalıkta tanımlanmaları ile başlamıştır. Translokasyonlar sonucu fonksiyonu değişen/bozulan genlerin incelenmesi, hematopoetik hücrelerin ana kontrol yollarının tespitini ve bozulduklarında lökomogeneze nasıl yol açtıklarının anlaşılmasını sağlamıştır. Translokasyonlar sonucu iki kromozomun karşılıklı parça değişimi sonrası burada bulunan genlerin birleşerek onkojenik özellikli bir füzyon genin oluşmasına neden olabilir. Karşılıklı yer değişim; genin fonksiyonunu artırarak onkojenik özellik kazanmasına ya da mevcut olan baskılayıcı özelliğini kaybederek, lökomogenez sürecine sokacak kazanımlara karşı hücreyi koruyamamasına neden olabilir (17).

AML fenotipik olduğu kadar, genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalık olup, olguların çoğunda tekrarlayıcı kromozom düzensizlikleri görülmektedir. AML ile ilgili translokasyonlar genellikle CBF *(core binding factor),* RARα (*retinoik asid reseptör alfa)* ve ETS (*E-twenty six*) ailesine ait transkripsiyon faktörlerini ve HOX (*Homeobox)* gen ailesini etkiler. Kromozomal translokasyonlar dışında AML hastalarında saptanan diğer bir genetik değişiklik *FLT3* genindeki aktive edici mutasyonlardır (17).

2.2.2. AML'de Tanı

Kesin tanıda kemik iliği aspirasyonu önemlidir. Kemik iliği aspirasyonu ağır trombositopenide bile yapılabilmektedir. Gerekirse kemik iliği biyopsisi uygulanabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) sınıflamasına göre kemik iliğinde blastların sayısı % 20'nin üzerinde ise (çocuklarda bazı çalışma gruplarında >% 30) AML tanısı konmaktadır. Ancak bu ayrımın yapılması bazen kompleks laboratuar incelemelerini gerektirmektedir. AML alt

tiplerinin belirlenmesinde morfolojik sınıflama (FAB, ***F**rench-**A**merican-**B**ritish*), sitokimyasal, sitogenetik, immunfenotipleme ve moleküler çalışmalar gereklidir (15).

Günümüzde hücreleri sahip oldukları yüzey proteinlerine göre (CD-Cluster of differentiation) ayıran bir immün fenotipleme işlemi olan flow sitometri (FS) lösemi ayırıcı tanısında kullanıma girmiştir. İmmunfenotipleme, hematolojik malinitelerin tanınmasına ve morfolojiye ek bilgiler kazandırarak tiplendirilmesine yardımcı olmaktadır. Hücre yüzey antijenlerinin çoğu bir hücre serisine eşlik etseler de o seriye özgün değildirler. Farklılaşmanın değişik evrelerinde sergilenen antijenler, hücrenin olgunlaşmasının takibinde kullanılabilir. Belli tümör hücrelerine özgün antijenlerin sayısı ise çok kısıtlıdır (ör; AML'de *PML-RARα*, KML'de *BCR-ABL* gen ürünleri), (18).

FS; AML'nin FAB sınıflamasına göre gruplandırılmasında, sitokimyasal yöntemlerin önüne geçmiştir. Özellikle M0 ve M7 olgularında tanı için immunolojik yöntemler gereklidir. AML hücreleri CD13, CD33, MPO'ya (Myeloperoxidase) özgün antikorlarla işaretlenir, diğer miyeloid antijenler sınıflamada yardımcı olsalar da prognostik değerleri sınırlıdır. Sitogenetik veriler prognozun belirlenmesinde en güvenilir işaretlerdir ve her genetik işarete özgün olan bir immunfenotip bulunmamaktadır (18, 19, 20).

2.2.3. AML Sınıflaması

Orjinal akut lösemi FAB sınıflaması 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemiler morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplandırılmıştır. Halen kullanılan FAB sınıflaması 1985 yılında tekrar gözden geçirilerek revize edilmiştir (Tablo 2.2), (21, 22).

Tablo 2.2 AML'de FAB sınıflaması (1985), Redner A. (23)'den alınmıştır.

Alt Tip	Tanımlama
M0	-Diferensiye edilmeyen akut miyeloblastik lösemi -Minimal diferansiasyon gösteren hücreler, immün fenotipleme olmaksızın bu hücrelerin miyeloid kökenli olduğunu göstermek zordur.
M1	-Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi -Bir miktar diferansiasyon mevcuttur. Bazı hücreler sitoplazmik granülasyon gösterir. Nadiren Auer cisimcikleri görülebilir. Myeloperoksidaz pozitiftir.
M2	-Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi -Diferansiasyon mevcuttur. Myeloperoksidaz pozitifliği, Auer cisimcikleri ve sitoplazmik granüllerde artma mevcuttur.
M3	-Akut promiyelositer lösemi -Promyelositik lösemi. Hücre sitoplazmaları fazla miktarda granül içerir. Myeloperoksidaz ile kuvvetli pozitif boyanır.
M3V	-Akut variyant promiyelositer lösemi (mikrogranuler)
M4	-Akut miyelomonositer lösemi -Myelomonositik lösemi, hem myeloid hem de monositer antijenler eskprese eder. Hem myeloperoksidaz hem de nonspesifik esteraz ile boyanır.
M4Eos	-Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a **M5b**	-Akut monoblastik lösemi -Akut monositer lösemi -Monositik Lösemi, peroksidaz ile negatif non spesifik esteraz ile pozitif boyanır.
M6	-Akut eritrolösemi -Eritrolösemi, displastik eritroid hücrelerin varlığı ile karekterizedir.
M7	-Akut megakaryoblastik lösemi -Blastların % 30'dan fazlası megakaryositik kökenlidir.

Akut lösemide; hücre yüzey antijenlerinin, sitogenetiğin öneminin fark edilmesi ve FAB sınıflamasının yeterli olmadığının gözlenmesi, akut lösemi immünolojik sınıflamalarını (MIC ve EGIL) gündeme getirmiştir (24, 25, 26).

"EGIL Sınıflaması'nda" (European Group for the Immunological Classification of Leukemias) AML'ler 2 veya daha fazla miyeloid marker (MPO, CD13, CD33, CDw65, Cd117) ekspresyonu ile tanımlanmış ve tablo 2.3'te gösterildiği biçimde gruplara ayrılmıştır (27, 28).

Tablo 2.3 EGIL Sınıflaması, (29)'den alınmıştır.

1-Bifenotipik Akut Lösemiler
2-Akut Lenfoblastik Lösemi
2a-B Lenfosit Kökenli: B-I,B-II, B-III,B-IV
2b-T Lenfosit Kökenli: T-I,T-II, T-III,T-IV
3-Akut Myeloblastik Lösemiler (AML)
a-Mo
b-Granülositik ve monositik farklılaşma
c-Akut Promyeloblastik Lösemi (APL)
d-Eritroid
e-Megakaryositik
4-Dendritik hücre öncüleri neoplazmları
5-Bazofil, Mast hücre öncüleri neoplazmları

AML'de WHO Sınıflandırması

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeni ile yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. WHO tarafından 2001 yılında akut lösemiler de dahil olmak üzere hematopoetik ve lenfoid neoplazileri içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünfenotipleme, sitogenetik ve moleküler genetik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir. WHO sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid, ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 2.4 Akut Lösemi WHO Sınıflaması (2001), James W. Vardiman ve ark. (30)'den alınmıştır.

Akut Miyeloid Lösemi (AML)

1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML
- t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML
- inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile AML
- Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q21), (PML/RARα) ile AML)
- 11q23 (MLL) anomalisi ile seyreden AML
2. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML
- Önceden miyelodisplastik sendromlu
- Önceden miyelodisplatik sendrom olmadan
3. Tedaviye İkincil AML ve MDS
- Alkilleyici ajanlarla veya radyasyonla ilişkili
- Topoizomeraz II inhibitörü ile ilişkili
4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML
- Minimal farklılaşma gösteren AML
- Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloid lösemi
- Olgunlaşma gösteren AML
- Akut miyelofibrozis ile panmiyelozlösemi
- Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
- RARα rearrajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi
- Akut miyelomonositik lösemi
- Akut monoblastik ve monositer lösemi
- Akut eritrolösemi
- Akut megakaryoblastik lösemi
- Akut bazofilik lösemi
- Myeloid sarkom

Akut Lenfoblastik Lösemi

1. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
2. Prekürsör T-lenfoblastik lösemi/lenfoma
3. Burkitt lenfoma/lösemi

Serisi Belirsiz Akut Lösemi

1. Bifenotipik akut lösemi
2. Farklılaşmamış akut lösemi

2.2.3.1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML

2.2.3.1.1. t(8;21)(q22;q22) ile seyreden AML

AML'deki en yaygın kromozomal düzensizliklerden biri t(8;21)(q22;q22)'dir. t(8:21)(q22;q22) sonucunda 21. kromozomda yer alan *RUNX1* (diğer isimleri: *AML1,CBFA2, EVI1, AMLCR1, PEBP2Ab, AML1-EVI-1)* geninin 8. kromozomdaki *MTG8* (diğer isimleri: *CDR, ETO, AML1T1, ZMYND2, CBFA2T1,RUNX1T1)* geni ile füzyonu meydana gelir. Tüm AML'ler içinde %5-12 oranında görülmektedir. FAB M2 grubunda sık görülür. *RUNX1* gen ürünü DNA'ya bağlanma özelliğindedir. *RUNX1-CBFα* transkripsiyon faktörü kompleksinin bir parçasıdır. *MTG8* geni ise bir "zinc finger" protein kodlamaktadır. Translokasyon neticesinde oluşan bu *RUNX1/MTG8* füzyon geni *RUNX1*'in DNA bağlayan kısmını ve *MTG8* geninin tamamını içerir. RUNX-1/MTG8 füzyon proteini ilgili diferansiasyon genlerinin transkripsiyonunu azaltır. Bu translokasyonlu AML'de genellikle kemoterapiye yanıt iyidir ve konsolidasyon fazında "*cytarabine"* ile tedavi edildiğinde uzun süreli sağ kalım ve tam remisyon oranı yüksektir. Olgun nötrofillerde auer cisimleri görülebilir. Anormal nüklear segmentasyonu ve histokimyasal boyamalarda anormallikler görülebilir. Nadiren kemik iliği blast oranı %20'nin altına inebilir. Bu translokasyonla birlikte cinsiyet kromozomu kaybı ve del(9)(q22) gibi genetik anomaliler sık görülmektedir. Nöral hücre adezyon molekülü olan CD56 ekspresyonu olumsuz prognostik gösterge olarak gözükmektedir (31, 32).

2.2.3.1.2. inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q22) (CBFβ/MYH11) ile seyreden AML

Core Binding Factor (CBF) bir transkripsiyon faktörüdür. İki alt üniteden oluşur. CBFα ve CBFβ. CBF normal hematopoetik diferansiasyonda görevli olan genlerin transkripsiyonunda görev alır. CBF fonksiyon bozukluğu hematopoetik diferansiasyonun yetersizliği ile sonuçlanır.

inv(16)(p13;q22) tüm AML'ler içinde yaklaşık %10-12 oranında görülmektedir. Genç hastalarda daha sık görülür. Morfolojik olarak bu AML tipi Akut Myelomonositik Lösemiyle (FAB M4) ilişkilidir. Bu genetik bozukluğa sahip vakaların çoğu AML M4Eos olarak tanımlanmıştır. Fakat bazı vakalarda eozinofil eksikliği bildirilmiştir. Seyrek olarak t(8;21) ile birlikte bulunur. Kemik iliği blast yüzdesi bu AML'de nadiren %20'nin altındadır. Morfolojik olarak yaygın görülen değişiklikler; monositik ve granülositik diferansiasyon, Auer çubukları içeren myeloblastlar, kemik iliğinde nötrofillerin azalması ve karakteristik eozinofil komponentleri gibi özelliklerdir. Yeni tanıda veya relapstaki myeloid sarkomlarda da görülebilir.

Hem inv(16)(p13;q22) ve hem de t(16;16)(p13;q22) sonucunda 16q22 bölgesinde bulunan *Core Binding Factor* β geni (*CBFβ)* ile 16p13 bölgesinde yerleşen (düz kas myozin ağır zincirini kodlayan) *Muscle Myosin Heavy chain 11* geni (*MYH11,* diğer isimleri: *AAT4, FAA4, SMHC, SMMHC*) füzyona uğrayarak *CBFβ-MYH11* füzyon geni oluşur. Bu genetik değişiklik geleneksel sitogenetik bantlama teknikleriyle gösterilemediği için Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemlerinin kullanılması gereklidir. Bu hastalar konsolidasyon fazında yüksek doz "*cytarabine"* ile tedavi edildiklerinde remisyon oranı yüksektir (31,33,34,35).

2.2.3.1.3. t(15;17)(q22;q21), (PML/RARα) ile seyreden AML (APL)

Akut Promiyelositik Lösemi (APL) çoğunlukla t(15;17) ile beraberdir. Tüm AML'ler içinde yaklaşık %5-8 oranında görülmektedir. t(15;17) 15. kromozomdaki *promiyelositik lösemi geni (PML*, diğer isimleri: *MYL, RNF71, PP8675, TRIM19*) ile 17. kromozomdaki *retinoik asit reseptör-α (RARα*, diğer isimleri; *RAR, NR1B1*) geninin füzyonuna yol açar. PML/RARα füzyon proteini promiyelositlerin diferansiasyonunda önemli bir yeri olan PML proteinin normal şartlar altında yaptığı görevi yapamaz. PML/RARα füzyon proteini, nüclear co-repressor (NCoR) ve histon deasetilaz isimli iki faktörü bağlar. Bu faktörler normal hematopoetik diferansiasyon için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlarlar. APL iki tipe ayrılır birinci tip

hipergranüler veya tipik APL; diğeri ise mikrogranüler (hipogranüler) APL'dir. Mikrogranüler APL hipergranüler APL'den lökosit sayısının fazlalığıyla ayrılmaktadır. Her iki tip APL'de de "*Dissemine Intravascular Koagulation*" (DIC) görülmektedir.

Hipergranüler tiple birlikte görülen değişiklikler; böbrek şeklinde çekirdekler, stoplazmada sıkı paketlenmiş büyük granüller, sitoplazmada Auer çubuk demetleri, tüm lösemik promyeloblastlarda güçlü myeloperoksidaz (MPO) reaksiyonu pozitifliği gibi özellikler görülür.

Mikrogranüler tipte görülen yaygın morfolojik değişikler; iki loblu çekirdekler, granüllerin yokluğu veya çok nadir görülmesi (submikroskobik azurofil granül), az sayıda anormal promyelositler, Auer çubukları, periferik kanda artmış lökosit konsantrasyonu, tüm promyeloblastlarda güçlü MPO reaksiyonu pozitifliği gibi özelliklerdir. Bazı durumlarda bu tanslokasyon maskelenerek sitogenetik olarak gösterilemeyebilir. FISH ve RT-PZR yöntemleri ile maskelenmiş olan bu genetik yeniden düzenlenmeler gösterilebilmektedir. APL hastaları bir farklılaşma ajanı olarak görev yapan "*All-Trans Retinoic Acid*" (ATRA) ile tedavi edildiklerinde yüksek oranda remisyon sağlarlar. Tedavide kullanılan ATRA, füzyon proteinine bağlanarak konfigürasyonunu değiştirir ve bu iki faktörün serbest kalmasını sağlar. PML/RARα degredasyonu, transkripsiyon süpresyonunun ortadan kalkmasına ve PML nüklear body yapısının yeniden düzenlenmesine neden olur. Diğer sinyal yolaklarının blokajı sağlanır. PML/RARα'nın anti apopitotik etkisi kaybolur (36).

Nadir görülen diğer tipinde ise 17. kromozomda bulunan *RARα* ile 11. kromozomda lokalize *ZBTB16 (*diğer isimleri *PLZF*, *ZNF145)* geni füzyon oluşturur. *ZBTB16* geni Krueppel C2H2-tipi çinko-parmak protein ailesinin bir üyesidir ve çinko parmak transkripsiyon faktörünü kodlar. Karboksi terminalinde dokuz tane Krueppel C2H2-tipi çinko-parmak içerir. Bu protein, hücre çekirdeğinde bulunur. Hücre siklusunun ilerlemesinde rol alır. Bir histon deasetilaz ile karşılıklı etkileşim içindedir. APL vakalarının yaklaşık %1'i *RARα* geniyle ilişkili olan

t(11;17)(q23;q21), t(5;17)(q32;q12) ve t(11;17)(q13;q21) gibi translokasyon varyantlarını içermektedir (31, 37).

2.2.3.1.4. 11q23(*MLL*) anomalisi ile seyreden AML (*Mixed-Lineage Leukemia Gen Mutasyonları*)

Mixed-Lineage-Leukemia (diğer isimleri: *HRX; TRX1; ALL-1; CXXC7; HTRX1; KMT2A; MLL1A; WDSTS; MLL/GAS7; TET1-MLL*) geni 11q23 de yer alır. Bu gen anomalisi tüm AML'ler içinde yaklaşık %5-10 oranında görülmektedir. AML'nin bu tipi çocuklarda daha sık olup oranı %15-20 olarak belirtilmiştir. İnfant AML ve tedaviye bağlı AML olmak üzere iki alt grubu vardır. Tedaviye bağlı gelişen genellikle topoizomeraz inhibitörleri kullanımından sonra meydana gelir.

11q23 bölgesinde yerleşmiş olan *MLL* geni gelişim sürecinde düzenleyici bir rol oynamaktadır. Yaklaşık 22-30 farklı translokasyonu bildirilmiştir. Bu değişiklik AML, ALL ve lenfomalarda görülür. En sık görülen değişiklik t(9;11)'dir. Ayrıca t(6;11), t(10;11), t(11;17) ve t(11;19) da görülebilir. Varlığı kötü prognozu gösterir.

11q23 anomalileri monositik görünümle ilişkili olup özellikle akut myelomonositik, monoblastik ve monositik lösemilerde (FAB M4, M5a ve M5b) ve nadir olarak da olgunlaşma göstermeyen ve minimal düzeyde olgunlaşmış AML'lerle (FAB M2 ve FAB M1) birlikte görülür.

Hastalarda DIC, ekstramedüller monositik sarkomalar ve/veya doku infiltrasyonu görülebilir. FISH ile bu farklı genetik anomaliler gösterilebilmektedir (31).

2.2.3.2. Çoğul Seri Displazisi ile Birlikte Seyreden AML

Bu tip AML ya de novo olarak ya da myelodisplastik ve myeloproliferatif bozukluklardan (MDS ve MPD) sonra görülür. Kan veya kemik iliğinde %20 ya da üzerinde blast görülür. Tedavi öncesi kemik iliği örneklerinden iki veya daha fazla hücre hattında, %50 ya da daha fazla hücrenin displazi göstermesiyle tanı konulur.

Daha çok yaşlılarda görülmekte olup olguların %85'inden fazlasını 70 yaş ve üzerindeki hastalar oluşturur (32, 38). Hastalarda çoğunlukla ciddi pansitopeni mevcuttur. Kemik iliği veya kanda çoğul seri displazisi, granülopoez bozuklukları, eritropoez bozuklukları ve megakaryopoez bozuklukları gibi değişiklikler yaygın olarak görülür.

Çoğul seri displazisi ile birlikte seyreden AML'lerin M6a ve M6b olmak üzere iki morfolojik tipi vardır. Bazı hastalarda bu iki morfolojik tip birlikte bulunabilmektedir. Bu tip lösemide başta 5. ve 7. kromozom olmak üzere belli kromozomlarda majör segmentlerin kaybı ya da kazancı şeklinde kromozom anomalileri görülebilmektedir (31, 38, 39).

2.2.3.3. Tedaviye İkincil AML ve MDS

Bu sınıfta yer alan AML sitotoksik kemoterapi ve/veya radyasyon tedavisi sonucu gelişir. Alkilleyici ajanlarla ve Topoizomeraz II ile ilişkili olmak üzere 2 formu vardır. Alkilleyici ajanlarla ilişkili olan tip, alkilleyici ajanlara veya radyasyona maruziyetten 5-6 yıl sonra gelişir (en kısa ve en uzun süre 10-192 ay olarak belirtilmiştir). Risk oluşumunda hem alkilleyici ajanın kümülatif dozu hem de hastanın yaşı etkilidir. Genellikle önce MDS tablosu gelişir. Bu evre çoklu seri displazisi ile seyreden AML ile benzerlik gösterir ve blast yüzdesi genellikle %5'in altındadır. MDS aşamasında vakaların yaklaşık %66'sında çoğul seri displazili refrakter sitopeni kriterleri bulunmaktadır. Vakaların %33'ü ring sideroblast yapısı sergilemektedir. Hiperselüler kemik iliği %50 olguda gözlenir. Olgular olgunlaşma gösteren akut myeloblastik lösemi (FAB-M2), akut monositik lösemi (FAB-M5b), akut myelomonositer lösemi (FAB-M4), akut eritrolösemi (FAB-M6a) veya akut megakaryoblastik lösemi (FAB-M7) morfolojisi göstermektedir. Vakaların %90'ından fazlasında sitogenetik anomaliler gözlenmektedir. Çoğunlukla 5. ve/veya 7. kromozom anomalileri gözlenmektedir. Kompleks kromozom anomalileri (3 veya daha fazla farklı anomaliler) en yaygın görülen bulgudur. Ortalama yaşam süresi tanıdan sonra yaklaşık 7-8 ay olarak bildirilmektedir.

Topoizomeraz II ile ilişkili olan tip ise Topoizomeraz II inhibitörleri (epipodofilotoksinler, teniposid, antrasiklinleri (doksorubisin ve 4-epi-doksorubisin)) ile tedavi gören hastalarda oluşur (33). Çoğul seri displazisi ile birlikte seyreden AML'ye göre daha erken dönemde (2 yıl sonra) ortaya çıkar (40). Vakaların çoğu akut monoblastik veya myelomonositik lösemi özellikleri ile karakterizedir. Bildirilen diğer morfolojiler promyelositik lösemi, MDS ve akut megakaryoblastik sendrom ile uyumludur (31, 33, 40).

2.2.3.4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML'ler

Yukarıda sayılan grupların hiçbirine girmeyenler FAB sınıflamasına göre belli tiplerdeki AML'lerin modifiye edilmesiyle gruplandırılmışlardır. Minimal diferansiasyon gösteren (FAB sınıflamasına göre M0) AML, olguların %5'ini oluşturmaktadır. Matürasyon göstermeyen tip (FAB sınıflamasına göre M1) AML olguların %10'unu oluşturur. Bu gruptaki hastaların çoğunluğu yetişkinlerdir. Kemik iliğinde noneritroid hücrelerde %90 veya daha fazla myeloblast görülür. Bu myeloblastlar azurofil ve/veya Auer çubukları içerebilir. Hiperselüler kemik iliği vardır. Matürasyon gösteren tipte (FAB sınıflamasına göre M2) kemik iliği veya kanda %20 veya daha fazla oranda myeloblast bulunmaktadır. Yine bu tipte %10 veya daha fazla farklı seviyelerde olgunlaşmış nötrofiller vardır. Morfolojik olarak azurofil granül içermeyen myeloblastlar, nötrofillerde anormal nükleer segmentasyon sıklıkla eozinofil prekürsörlerde azalma, genellikle hiperselüler kemik iliği gibi özellikler bulunmaktadır. Matürasyon gösteren AML'li anormal karyotipli olgularının yaklaşık %33'ü t(8;21)(q22;q22) ile ilişkilidir. Bunların prognoza etkisi olumlu yöndedir. Nadir durumlarda t(6;9)(q23; q34) ile ilişkilidir ve bunların prognoza etkisi olumsuzdur. Akut promyelositik lösemi t(15;17)(q22;q21), (PML/RAR α) ile seyreden AML (FAB sınıflamasına göre M3) yaklaşık %10 oranında görülür (31).

Akut myelomonositik lösemi (FAB sınıflamasına göre M4) nötrofil ve monosit prekürsörlerin proliferasyonu ile karakterizedir. Bu tip AML'li olguların %15-25'ini oluşturur ve hastaların bazılarında kronik myelomonositik lösemi öyküsü vardır.

Morfolojik olarak yaygın görülen değişiklikler; kemik iliğinde %20 veya daha fazla blast, %20 veya daha fazla nötrofil, monosit ve bunların prekürsörleri (kanda $5x10^9$/L veya daha fazla), monosit ve prekürsörlerinde non spesifik esteraz pozitifliği (NSE) gibi değişiklikler görülür. Bu tip AML'de çoğu olguda nonspesifik sitogenetik anomaliler gözlenirken bazı vakalarda 11q23 genetik anomalileri gözlenmiştir (31).

Akut eritroid lösemi'nin (FAB sınıflamasına göre M6a ve M6b) eritrolösemi ve pür eritroid lösemi olmak üzere iki tipi mevcuttur. Eritrolösemi (M6a) (eritroid/myeloid) tipi yetişkinlerde görülür. Bu tip AML'nin %5-6'sını oluşturur. Pür eritroid lösemi nadir görülür ve tüm yaşlarda ortaya çıkabilir. Morfolojik olarak görülen değişiklikler; kemik iliğinde tüm hücre popülasyonunda %50 ya da daha fazla oranda eritroid prekürsör, kemik iliğinde noneritroid popülasyonda %20 ya da daha fazla oranda myeloblast içermesi, displastik eritroid prekürsörler, ring sideroblastlar, hiperselüler kemik iliği, eritroid prekürsörler PAS pozitif boya alması gibi özelliklerdir. Bu tip AML için nonspesifik kromozomal anomaliler tanımlanmıştır. Kompleks karyotipli çoklu yapısal anomaliler yaygın olarak görülmektedir. Beşinci ve 7. kromozomlar sık etkilenmektedir. Bu kromozom anormallikleri olan olgularda anlamlı olarak hayatta kalma süreleri daha kısa olarak gösterilmiştir (31, 38).

Akut Megakaryoblastik Lösemi (FAB sınıflamasına göre M7) tüm yaş gruplarında, %3-5 oranında görülür. Megakaryositik blast oranının %50 ve üzerinde olduğu bildirilmiştir. Lenfositlere benzer morfolojik yapı gösterir. Morfolojik olarak hastalarda; megakaryoblastlar, bazofilik stoplazma, mikromegakaryositler, diseritropoez, displastik büyük trombositler, hipogranüler nötrofiller gibi özellikler görülür. Blast hücrelerinin sitokimyasal boyamalarında MPO ve SB (Sudan Black boyası) negatiftir. Blast; PAS, Asit Fosfataz ve NSE ile reaksiyon verir (31, 38).

2.2.3.5. Varyant: Down Sendromunda Görülen AML/Myeloproliferatif Hastalık

Down Sendrom'lu (DS: trizomi 21) hastalarda akut lösemilerin özellikle myeloid tipine yatkınlık artmıştır. Özellikle akut megakaryoblastik lösemi görülmektedir.

DS'lu yenidoğanların yaklaşık %10'unda lösemiye ait klinik özellikler; lökositoz, kanda %30'dan %50'ye uzanan blast yüzdesi ve ekstramedüller tutulum görülmektedir. Bu hücrelerin büyük bölümünü promegakaryositler oluşturur. Trizomi 21'e ek olarak bazı durumlarda özellikle trizomi 8 olmak üzere diğer klonal anormallikler de görülebilir. Spontan remisyon geçici durumda 1-3 ay içinde meydana gelir. Rekurrens ikinci spontan remisyonu takiben veya kalıcı hastalıktan sonra meydana gelebilir. Trizomi 21 ve kalıcı hastalığı olan pediatrik hastalar için tedavi sonuçları trizomi 21 olmayan akut lösemili çocuklar için olana göre daha iyi olabilir. Morfolojik bulgular içinde; promegakaryositler ve mikromegakaryositler, diseritroropoez, blast hücrelerinin sitokimyasal boyamalarında MPO ve SB negatif olması yer alır (31).

2.2.4. AML'de Diagnostik ve Prognostik Belirteçler

Periferik yayma ve kemik iliği aspirasyonunun mikroskobik incelemesi AML tanısının temelini oluşturmaktadır. Tanı için kemik iliği örneğinin morfolojik, sitokimyasal, immunofenotipik, sitogenetik ve moleküler incelenmesi gerekmektedir.

Wright-Giemsa ile boyanmış kemik iliği aspiratı selülarite, megakaryosit sayısı ve morfolojisi, miyeloid/eritroid hücre oranı, matürasyon durumu, displazi varlığı açısından değerlendirilip, blast oranı tespit edilmektedir. AML'de başlangıçta kemik iliği genellikle hiperselülerdir ve megakaryositler azalmıştır. Ancak MDS'dan gelişen AML lösemide hipo-normoselüler kemik ilikleri olabilir. Blastların dışında kalan hücrelerdeki displastik değişikliklerin dikkatle aranması gerekmektedir.

Kırmızı çubuk şeklinde inklüzyonlar olan Auer cisimleri yeni tanı alan AML hastalarının yaklaşık %30-50 kadarında görülür. Primer granüllerin agregatlarıdır. Özellikle t(8:21) gösteren AML vakalarında uzun çift Auer cisimcikleri görülür. Peroksidaz boyaması ile daha iyi görülen Ph cisimcikleri Auer cisimciklerinin öncüsüdür. Uzun bir süre boyunca akut lösemi tanısı alan hastalarda ALL-AML ayrımı sitokimyasal boyamaların yardımı ile yapılmıştır. Bunların en önemlileri, Myeloperoxidase (MPO), Sudan black B (SBB), Periodic acid–Schiff (PAS), Non

Specific Esterase ve Acid Phosphatase'dır. Günümüzde hücreleri sahip oldukları yüzey proteinlerine göre (CD-Cluster of differentiation) ayıran bir immün fenotipleme işlemi olan flow sitometri lösemi ayırıcı tanısında kullanıma girmiştir (30).

AML'de sık görülen genetik anomaliler ve diğer belirteçlerle ilişkisi, diagnostik, prognostik önemleri Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5 AML'de diyagnostik kromozomal anomaliler, ilişkili olduğu moleküler belirteçler ve prognostik önemi, Pizzo ve Poplack (41)'den alınmıştır.

AML'DE DİYAGNOSTİK KROMOZOMAL ANOMALİLER VE İLİŞKİLİ OLDUĞU MOLEKÜLER BELİRTEÇLER - 1							
Kromozomal Anomali	**AML FAB Tipi**	**Etkilendiği Gen**	**Fonksiyon**	**Sıklık (%)**	**Açıklama**	**Prognoz Üzerine Etkisi**	**Diyagnostik Etki**
t(8;21)(q22;q22)	M1, M2	ETO-AML1	Transkripsiyon faktör	5-15	Auer çubukları yaygın; Kloroma	İyi	+
t(15;17)(q22;q12)	M3, M3v	PML-RARA	Transkripsiyon faktör, Hormon reseptörü	6-15	Koagulopati; ATRA tedavisine cevap	İyi	+
t(11;17)(q23;q12)	M3	PLZF-RARA	Transkripsiyon faktör, Hormon reseptörü	Nadir	Koagulopati; ATRA tedavisine cevap yok	Kötü	
inv (16)(p13q22); t(16;16) (p13q22)	M4Eo	MYH11-CBFβ	Kas Proteini, Transkripsiyon faktör	2-11	SSS Lösemi; Bazofilik granüllü eozinofili	İyi	+
t(8;16)	M5b	MOZ-CBP	Transkripsiyon faktör	1	Infant ve genç erişkinlerde; yüksek BK sayısı; kloroma; eritrofagositozis; epipodolodoksin sonrası sekonder lösemi	Kötü	
t (9;11)(p22;q23)	M4, M5a	AF9-MLL	Homeodomain proteinleri	5-13	Infant ve genç erişkinlerde; yüksek BK sayısı; kloroma; eritrofagositoz; epipodolodoksin sonrası sekonder lösemi	Orta risk grubunda	
t(10;11)(p12;q23)	M5	AF10-MLL	Homeodomain proteinleri	Nadir	Infant ve genç erişkinlerde; yüksek BK sayısı; kloroma; eritrofagositoz; epipodolodoksin sonrası sekonder lösemi	Kötü	
t(11;17)(q23;q21)	M5	MLL-AF17	Homeodomain proteinleri	Nadir	Infant ve genç erişkinlerde; yüksek BK sayısı; kloroma; eritrofagositoz; epipodolodoksin sonrası sekonder lösemi	Kötü	

AML'DE DİYAGNOSTİK KROMOZOMAL ANOMALİLER VE İLİŞKİLİ OLDUĞU MOLEKÜLER BELİRTEÇLER - 2							
t(11q23) b	M4, M5	MLL, diğer gruplar	Homeodomain proteinleri	2-10	Infant; yüksek BK sayısı, SSS ve deri tutulumu; kötü prognozla ilişkilidir, özellikle t(4;11) kötü prognozla ilişkilidir	Kötü	+
t(1;22) (p13;q13)	M7	RBM15-MKL1	RNA bağlayan protein, DNA bağlayan protein	2-3	Down sendromlu olan infantlarda AML M7, myelofibrozis	Kötü	
t(6;9) (p23;q34)	M2, M4, MDS	DEK-CAN	Transkripsiyon faktör, Nükleer protein	<1	Bazofili	Kötü	
inv(3)(q21;q26) t(3;3) (q21;q26)	M2, M4, MDS	EVI1	Transkripsiyon faktör	<1	Öncesinde MDS; trombositozis ve anormal plateletler	Kötü	
-7/del(7)(q22-q36)	Alt tipler, MDS	?	?	2-7	Toksik doza maruz kalma; öncesi MDS; yaşlı erişkinlerde çok yaygındır; yaygın bakteriyel infeksiyon	Kötü	
-5/del(5)(q11-q35)	Alt tipler, MDS	?	?	Nadir	Toksik doza maruz kalma; öncesi MDS; yaşlı erişkinlerde çok yaygındır	Kötü	
+8	Alt tipler	?	?	5-13	Öncesinde MDS; Yaşlı hastalar	Orta risk grubunda	

AML, akut myeloid lösemi; ATRA, all-trans-retinoik asid; SSS, santral sinir sistemi; FAB sınıflaması; MDS, myelodisplastik sendrom; BK, beyaz küre.

a-Bu tablo çocukluk çağı AML hastalığı ile ilişkili tüm kromozomal anomalileri içermez, ancak yaygın bazı anomalilerin veya önemli fenotipik özelliklere sahip olanları kapsar.
b-MLL genini içeren 11q23 translokasyonlarının birçok farklı füzyon ortaklıklarına sahip olduğu gösterilmiştir.

AML'de sitogenetik, tüm yaş gruplarında major prognostik faktörlerden biri olarak kabul edilir. WHO tarafından hazırlanan, AML sınıflandırmasında da ilk olarak değerlendirilen faktörlerden biri olduğu izlenmektedir. Tek başına sitogenetik analiz sonuçları değerlendirildiğinde AML hastalarının nüks riskini etkileyen major risk gruplarının, hastalıksız hayatta kalım ve genel sağ kalım (OS: Owerall survival) açısından olumlu, orta ve olumsuz olarak 3 ana gruba ayırabileceği bildirilmiştir (Tablo 2.6), (42).

Son yıllarda pediatrik AML olgularında %15-20 oranında pozitif bulunabilen *MLL* gen (11q23) rearanjmanlarının da taranması gerekliliği vurgulanmaktadır. Her AML olgusu bu sitogenetik ve moleküler bulgular açısından mutlaka incelenmelidir. 11q23 anomalileri kötü prognozla ilişkilidir. Pozitiflikleri tedavi seçimi ve MRD (Minimal Rezidual hastalık) takibi açısından önemlidir.

Tablo 2.6 AML'de sitogenetik risk değerlendirmesi (2010), James M. Foran, (42)'den alınmıştır.

İyi Risk Grubu	-inv (16) veya t(16;16), t(8:21) ve t(15;17) -Normal sitogenetikli olgularda *FLT3* yokluğunda *NPM1* mutasyonu veya *CEBBA* mutasyonu olan olgular
Orta Risk Grubu	-Normal sitogenetik, +8, t(9;11) diğer tanımlanamayanlar -inv (16) veya t(16;16), t(8:21) olup *c-KIT* mutasyonu taşıyanlar
Kötü Risk Grubu	-Normal sitogenetik olup *NPM1* yokluğunda *FLT3*-ITD mutasyonu olması (bazı kılavuzlarda kötü risk grubunda yer almaktadır.) -Karmaşık (≥ 3 anormal klon) karyotip -5, 5q-, -7, 7q-, 11q23, non t(9;11), inv(3), t(3;3), t(6;9), t(9;22).

Son zamanlarda yapılan çalışmalardan moleküler belirteçlerin tanınması ve bunların prognoz üzerindeki etkisinin gösterilmesiyle risk sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir (Tablo2.7).

Tablo 2.7 Sitogenetik ve Moleküler belirteçlerle risk grupları, Ursula Creutzig ve ark. (43)'den alınmıştır.

Olumlu risk grubu	t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB-MYH11* t(15;17)(q22;q21)/*PML-RARA* Moleküler NK-AML *NPM1*-mutasyonu taşıyan *CEBPA* duble mutasyon taşıyan AML t(1;11)(q21;q23)/*MLL-MLLT11(AF1Q)* *GATA1s*
Ara risk:	Sitogenetik anomali tespit edilememiş olumlu veya olumsuz grup
Olumsuz risk grubu	- 7, -5 veya del(5q) inv(3)(q21q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2)/*RPN1-MECOM(EVI1-MDS1-EAP)* t(6;9)(p23;q34)/*DEK-NUP214* t(7;12)(q36;p13)/*ETV6(TEL)-HLXB9(MNX1)* t(4;11)(q21;q23)/*MLL-MLLT2(AF4)* t(6;11)(q27;q23)/*MLL-MLLT4(AF6)* t(5;11)(q35;p15.5)/*NUP98-NSD1* t(10;11)(p12;q23)/*MLL-MLLT10(AF10)* kompleks karyotip *FLT3*-ITD t(9;22)(q34;q11.2)

Risk belirlenirken;

-Özellikle DS hastalarında ve akut megakaryoblastik lösemili çocuklarda, GATA1s mutasyonlarının analizinin dahil edilmesi önerilmektedir. Trizomi 21 mozaikliğinde GATA1s-ilişkili löseminin tanımlanmasının gereksiz tedaviyi önlediği belirtilmiştir.

-Ara risk grubu olumlu alt grupta yer alanlar haricinde, normal karyotipli tüm AML'leri içermektedir. Bu olguların çoğu kötü prognozla ilişkilidir, fakat tedaviye farklı yanıt verebilecekleri için ayrı olarak bildirilmektedir. Bu gruptaki çoğu anomali için, prognostik önemleri hakkında kesin sonuçlar çıkarılabilecek kadar yeterli sayıda çalışma yapılmamıştır.

-WHO 2008 sınıflandırmasında belirtildiği gibi, monozomi 7 için rekürren genetik aberasyonların hariç tutulması gerektiği belirtilmiştir.

-t(10;11) (p12;q23) saptanan olgularda sonuçlar heterojendir. Bu nedenle Tablo 2.7'de olumsuz risk grubunda yer almakla birlikte prognoz etkisi açısından ara risk grubunda yer alabileceği belirtilmektedir.

-WHO tarafından tanımlanan nükseden translokasyonlar veya inversiyonların yokluğunda 3 veya daha fazla kromozom anomalisi bulunması olumsuz risk grubu içinde sınıflandırılmaktadır.

-AML'de t(9;22) nadir olmakla birlikte bu tabloya (Tablo 2.7)'a dahil edilmiştir. Bu translokasyonun prognoz üzerindeki etkisi olumsuz olarak bildirilmektedir.

2.2.5. Tedavi

AML'nin tedavisi remisyon indüksiyonu ve post remisyon (konsolidasyon) tedavisi olarak 2 basamaklı olarak tanımlanmaktadır. Yoğun indüksiyon ve konsolidasyon tedavileri ile tam remisyon %80-90 oranında sağlanabilmekte ve olguların %50-%60'ında genel sağkalım elde edilebilmektedir.

AML'de tedavinin amacı komplet remisyon sağlanmasıdır. Komplet remisyon platelet sayısının 100000/mm3 üzerinde, nötrofil sayısının 1000/mm3 üzerinde olduğu anda, kemik iliğinde %5'in altında blast olması olarak tarif edilmektedir. Sitogenetik komplet remisyon ise daha önceden tespit edilen genetik anormalilerin tedavi sonrası standart yöntemlerle tespit edilememesidir. İndüksiyon tedavisinin bir veya 2 serisi çocuklarda ve yetişkinlerde rutin olarak kullanılmaktadır. Standart indüksiyon terapisi bir antrasiklin'in 3 günlük tedavisinden oluşmaktadır (örneğin; daunorubicin en azından 60mg/m^2, idarubicin 10-12mg/m^2 veya anthracenedione mitoxantrone 10-12mg/m^2) ve 7-10 günlük cytarabine (100-200mg/m^2 sürekli olarak veya intravenöz olarak günlük 2 kez (örneğin "3+7" veya"3+10")) uygulanmaktadır. Bu dozajlarla çocuklar ve yetişkinlerin %85'inde tam gerileme (CR: complete remission) sağlanmaktadır. Etoposide veya 6-thioguanine gibi 3. bir ilaç sıklıkla indüksiyona dahil edilse de, faydaları kanıtlanmamıştır**.** AML'de temel ilaçların antrasiklin, sitarabin, etoposid ve tioguanin olduğu belirtilmektedir. Allojenik kök hücre nakli uygulamaları da yüksek riskli olgularda başarı oranlarının yükselmesini sağlamaktadır (43).

AML kemoterapisi yoğun indüksiyon tedavisinde (ADE10, ADE8) konsolidasyon 3 kür daha uygulanıp riske göre tedavi yönlendirilir.

→Eğer hasta düşük risk grubunda ise KİT yapılmadan, 2 kür daha kemoterapi ile devam edilir.

→Hasta orta risk grubunda ise aile içi verici varsa nakil, yoksa 2 kür daha kematetapi uygulanır.

→Hasta yüksek risk grubunda ise aile içi veya akraba dışı verici varsa nakil uygulanmaktadır. AML'de idame tedavi (maintenance) standart değildir.

AML tedavisinin temel ilaçlarından olan antrasiklinlerin yüksek dozlarda kullanılmasının oluşturacağı toksisiteyi azaltmak amacı ile daunorubisinin lipozomal formları kullanıma girmiştir. Kardiyotoksisitenin 375mg/m2 üzerindeki dozlarda arttığı bilinmekle beraber antrasiklin dozlarının azaltılması tedavi yanıtını düşürmüştür. Daunorubisin yerine idarubisin kullanıldığında blast düzeyinde etkileşimin daha hızlı ve uzun süreli olduğu gösterilmiştir. Idarubisinin metaboliti olan idarubicinolün 54 saatlik yarılanma süresinin olması ve BOS'a iyi geçişi tedavi başarısını artırmaktadır. MRC (Medical Research Council Acute Myeloid Leukemia) çalışmalarında mitoksantronun daunorubisin yerine kullanılması bir avantaj sağlamamıştır. Özellikle inv(16) ve t(8;21) gibi core binding factor (CBF) lösemilerde sağ kalımın artırılması için çoklu yüksek doz sitarabin kullanılması önerilmektedir. Süt çocuklarında (12 ayın altı ve 10 kg'ın altındaki çocuklarda) genel olarak vücut yüzeyine göre azaltılmış veya vücut ağırlığına göre ayarlanmış doz verilmektedir. Tedaviye iyi yanıtlı düşük riskli olgularda konsolidasyon yoğunluğunun azaltılması (5 yerine 4 blok) ve sadece kemoterapi önerilirken, t(8;21) ve inv(16) pozitif gibi iyi kemoterapi yanıtı beklenen düşük riskli grupta 15. gün- 28. gün yanıtının iyi olmadığı saptandığında *FLT3*- ITD gibi kötü prognostik genetik özelliklerin olabileceği düşünülerek hastanın yüksek risk grubunda tedavisi önerilmektedir (15).

Halen hastaların %40'ı doğrudan altta yatan hastalığa bağlı relaps veya tedavi yanıtsızlığı nedeniyle öldüklerinden özellikle yüksek risk grubundaki hastalar için yeniden tedavi yoğunlaştırması ve aynı zamanda destek tedavi önlemlerinin iyileştirilmesi gündemdedir (43).

2.3. FLT3 (FMS-Like Tyrosine Kinase 3) ve Hematopoezdeki Rolü

Hematopoetik sistem saniyede bir milyon kan hücresi üretiminin dengeli bir şekilde sürdürülmesini sağlayan, oldukça iyi işleyen bir sistemdir. Tüm hematopoetik hücreler kendini yenileme kapasitesine sahip olan pluripotent hematopoetik kök hücresinden (HSC) köken alırlar. Hematopoetik kök hücreler (HKH), uzun süreli-

HKH ve kısa süreli-HKH olmak üzere iki gruba ayrılır. Uzun süreli-HKH'ler hayat boyunca kendini yenileme potansiyeline sahip olmasına karşın kısa süreli-HKH'ler için bu süre yaklaşık 8 haftadır ve daha sonra *'multipotent'* öncü hücreleri (MPÖH) oluşturur (44, 45, 46).

Hematopoetik hücrelerin ekspresyon profilleri, sitokin ve büyüme faktörlerinin diferansiasyon kaskadını yönlendirmesine izin verir. Hematopoetik sistem, hücresel diferansiasyon ve proliferasyon sürecini dengeleyerek onkojenik mutasyonları sınırlamaktadır. Bununla birlikte moleküler ve sistemik kontrollere rağmen hematopoetik sistemde löseminin farklı formları ortaya çıkmaktadır (46).

FLT3, diferansiasyonunun düzenlenmesi ve kontrolünde rol oynamaktadır. Diferansiasyon çoğalma kapasitesinde kayıp ve apoptozise eğilimin artmasıyla sıkı bir şekilde ilişkilidir. Normal miyeloid progenitor hücreler, diferansiasyonla sınırlı ömre sahip olgun hücreye dönüşür. Diferensiasyonun engellenmesi kanser gelişiminde önemli bir mekanizmadır. Primitif hematopoetik hücrelerde öncelikli FLT3 ekspresyonu, bu proteinin diferansiasyonun düzenlenmesindeki rolünü göstermektedir. Yaban-tip FLT3 ile transfekte 32D hücrelerinde FL-aktivasyonu hücrelerin olgun nötrofillere diferansiasyonunu yavaşlatmakta ancak tam blok sağlamamaktadır (47, 48). Ancak mutant FLT3-ITD ile transfekte 32D hücrelerde morfolojik diferensiasyonda tam blok gösterilmiştir. Normal myeloid diferansiasyonu için CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBPα) ve PU.1 (Ezb transformation–specific sequence ailesine ait bir transkripsiyon faktörü) ekpresyonu gereklidir. *FLT3*-ITD mutasyonu varlığında her iki proteinin de baskılandığı görülmektedir. Daha ileri araştırmalarda diferansiasyondan kaçış için kritik yol olarak C/EBPα inhibisyonu tanımlanmıştır (49). Fakat AML hastalarındaki primer hücrelerde yüksek seviyede C/EBPα gösterilmiştir. Bu durum diferansiyasyonda daha etkili ve farklı mutasyonların olabileceğini düşündürmektedir (47, 48, 50).

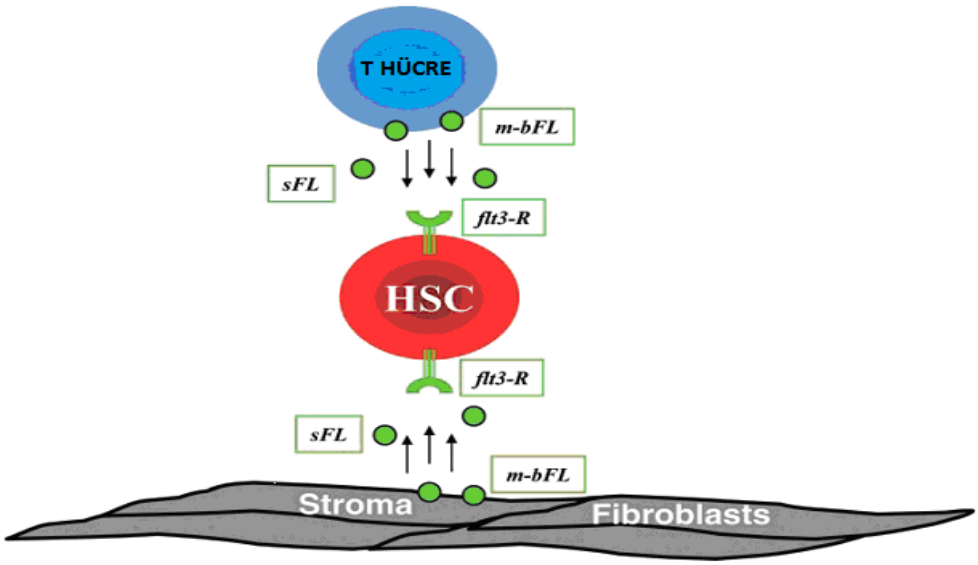
Bir G protein sinyal regülatörü olan RGS2 mRNA'sının, *FLT3*-ITD mutasyonu taşıyan AML örneklerinde mutasyonu taşımayan AML örneklerine göre belirgin olarak baskılandığı gözlenmiştir (53). 32D hücrelerinde *FLT3*-ITD mutasyonu

taşıyanlarda gen ekspresyon profili, FL ile uyarılmış yaban tip *FLT3* gen ekspresyon profilinden farklıdır. Birçok miyeloid seri hücre hattının granülositik diferansiasyon sırasında RGS2 ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. *FLT3*-ITD mutasyonunun granülosit diferansiasyonunu baskılamasının, RGS2'yi baskılaması aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. *FLT3*-ITD eksprese eden 32D hücrelerinde RGS2'nin fazla ekspresyonunun bu diferansiyasyon bloğunu aşabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak *FLT3*-ITD sinyalinin AML vakalarında diferensiasyon üzerine olan etkisinin hücresel içeriğe bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (51).

2.3.1. FLT3 Ligandı ve İşlevi

Kemik iliğinde birçok sitokin, kök hücre ya da progenitor hücre spesifik reseptörleri etkileyerek immatur hematopoetik hücrelerin birden fazla seriye farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlar. Fms Like Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT3 ligandı: FL) bir sitokindir ve erken hematopoezi kontrol eder. FL iki tipi vardır. Tip I bir transmembran proteini olup, kök hücre faktörü (SCF) ve makrofaj koloni stimule edici faktörleri (M-SCF) içeren küçük sitokin ailesinin bir üyesidir (52).

Diğer tip ise çözünebilen FL (sFL: soluble FL) proteini olarak adlandırılır ve serbest haldedir. FLT3 reseptörlerinin sınırlı dağılımının aksine FL mRNA'sı hematopoetik ve nonhematopoetik dokularda yaygın bir şekilde eksprese edilmektedir. Buna karşın FL proteini (hem membrana bağlı hemde çözünebilen formu) sadece T lenfositler ve kemik iliği mikroçevresindeki stromal fibroblastlarda bulunmuştur (46, 52, 53), (Şekil 2. 2).



Şekil 2.2 FLT3 Ligandı ve tipleri, Wodnar-Filipowicz (46)'den alınmıştır.
m-bFL: Membrana bağlı FLT3 Ligandı (FL), sFL: Soluble FL, flt3-R:FLT3 Reseptörü.

Hem membrana bağlı hem soluble FL'nın biyolojik aktiviteleri vardır. Her ikisi de FLT3 tirozin kinaz aktivitesini stimule ederler. FL hücrelerde genel olarak sabit durum hematopoezinde eksprese edilir, ancak serumda düşük seviyelerde idame ettirilir (53). FL'nin normal regülasyonu intrasellüler depolardan salınımını sınırlayarak primitif hematopoetik hücrelerin aşırı uyarılmalarını engeller. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda lökomogenezin intraselüler FL tutulumunda bozulma nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmektedir (46).

FL hem fare hem de insanda klonlanmıştır. Bu protein yapısal olarak FMS ligandı (CSF-1) ve KIT ligandına (KL) benzemektedir (55, 56). Farede FLT3'ün ya da FL'nin hedeflenmiş parçalanması, embryiogenezde letal etki göstermese bile genellikle kemik iliği hematopoetik prekürsörlerin azalmasına özellikle de lenfoid prekürsörlerin azalmasına yol açar.

Farelerde FL için reseptör yokluğunda hematolojik bozukluklar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarda reseptör ve FL eksikliğinde, B hücre öncüllerinin (pro-B) sayısının azaldığını ancak periferde fonksiyonel B hücrelerinin sayısının normal olduğu gösterilmiştir. FL olmayan farelerde bazal membranda myeloid ve lenfoid progenitörlerde azalma, lenfoid organlarda bulunan dendritik hücreler (DC) ve

natural killer (NK) hücrelerinde azalma saptanmıştır (57).

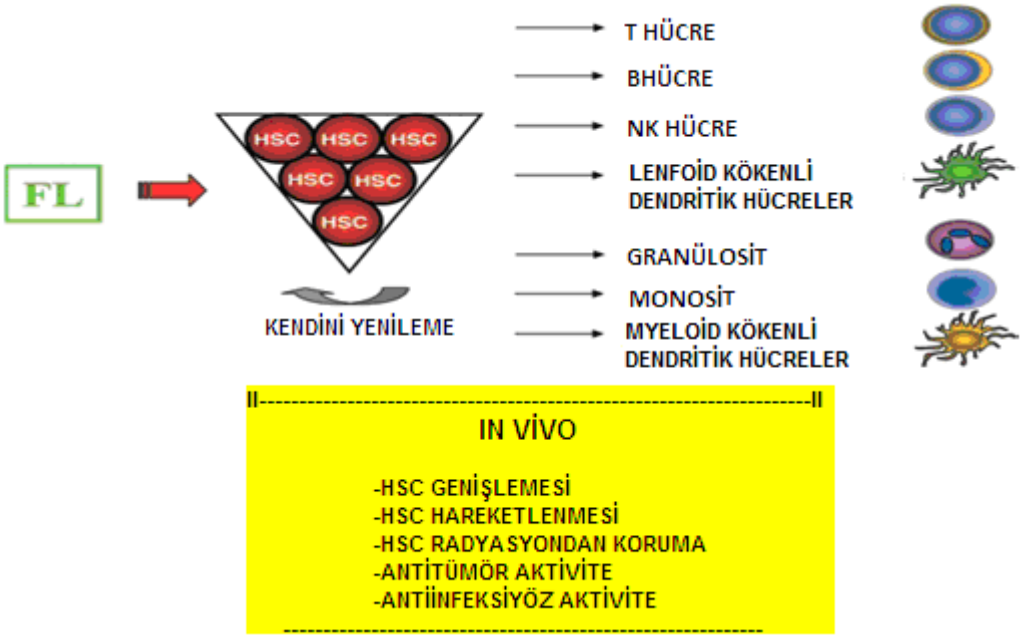
Fare çalışmalarında ligand stimulasyonu ile FLT3 dendritik hücre ve DC marker ekspresyonu yapan belli hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını başlattığı gösterilmiştir (58, 59). FL ekspresyonu immun yanıtı artırdığı için fare modellerinde solid ve hematopoetik tümörlerin regresyonunu sağlamak amacıyla terapotik olarak da kullanılmıştır (58). Hücre kültürlerinde, FL'ın IL-7 ve IL-11 ile birlikte eksprese edildiği deneylerde B-hücre progenitörlerinin klonal genişlemesi ve farklılaşması saptanmıştır. FL, in vitro B hücre lenfopoezini stimüle etmek için IL-7, C kit ligand, IL-11 ve IL-3 ile birlikte hareket etmektedir. FL'ın granülosit makrofaj-koloni stimülan faktör (GM-CSF) ya da IL-4 ile birlikte eksprese edildiğinde dendritik hücrelerin diferansiasyonunu in vivo ve in vitro olarak artırdığı gösterilmiştir (46, 60). FL fonksiyonunun in vivo analizi erken hematopoezin idamesinde ve proliferasyonundaki hayati rolünü destekler. FL, ayrıca immun cevapta çok önemli bir rol oynar. Ancak in vitro çalışmalarda FL'nın, tek sitokin olarak proliferasyonu yetersiz derecede artırdığı bildirilmiştir (61, 62).

FLT3 sinyal iletim yolları tam olarak bilinmemekle birlikte primitif hematopoetik hücrelerin proliferasyonu ve apoptozisindeki hayati rolü anlaşılmıştır.

Hemetopoetik hastalığı olan insanlardaki çalışmalar FL'nin hematopoezde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Sağlıklı bireylerde dolaşımdaki (plazmada) FL seviyesi, bazı hastalarda saptanan düzeyden daha düşüktür. Bununla birlikte, kök hücresi kompartmanını etkileyen hematopoetik bozukluklarda özellikle Fanconi anemisi ve kazanılmış aplastik anemi gibi hastalıklarda çözünebilir FL düzeyleri oldukça yüksek olarak saptanmıştır. Bu tür anemilerde kök hücrelerin eksikliğini gidermek amacıyla FL'nin üretebileceği ileri sürülmektedir (57).

FL, incelendiği neredeyse her dokuda eksprese olmaktadır. Ancak bu sitokinin fonksiyonu daha çok FLT3 reseptörünü eksprese eden hemotopoetik ve nöral doku gibi çok sınırlı sayıdaki dokuda gözlenir. İnsan hematopoetik hücrelerinde, FLT3 ekspresyonu kemik iliğinin CD34 pozitif fraksiyonuyla ve dendritik hücrelere

dönüşmek üzere planlanmış CD34 negatif hücrelerin küçük bir kısmıyla sınırlıdır (63, 64).



Şekil 2.3 FL'in biyolojik aktivitesi, Wodnar-Filipowicz (46)'den alınmıştır.
Şekilde FL'nın HSC (Hematopoetik Stem Cell: Hematopoetik Kök Hücre), NK(Doğal öldürücü hücreler), Myeloid kökenli dendritik hücreler, Lenfoid kökenli dendritik hücreler, Granülositler, T hücre, B hücre ve Monositler'e etkisi ve in vivo fonksiyonları gösterilmektedir.

2.3.2. FLT3 Reseptörü

FL; c-KIT, c-FMS, ve PDGFα/β'yı içeren Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) alt ailesinin bir bireyi olan transmembran reseptör FLT3 ile ilişkilidir. İnsanda *FLT3* geni 13. (13q12) kromozomda lokalizedir. Toplam 24 ekzondan oluşan bu gen 100 kilobazdan daha büyüktür.

Membranda yerleşim gösteren tirozin kinaz proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süperailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (65). RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. İstirahat halindeki hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile

etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (65, 66).

FLT3 sınıf III RTK ailesine ait bir reseptördür. Bu ailenin diğer üyeleri şunlardır: ‘‘Stem Cell (Stell) Factor Receptör (c-KIT)’’, ‘‘Macrophage Colony Stimılating Factor (M-CSF)’’, ‘‘Receptor-FMS, Platelet-Derived Growth Factor’’ Receptörleri (PDGF α ve β), (Tablo 2.8). FMS, KIT ve iki PDGF reseptörü ile daha fazla (%30), vasküler endotel büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörü reseptörü alt aileleri ile daha az homoloji gösterir (Şekil 2.4), (67).

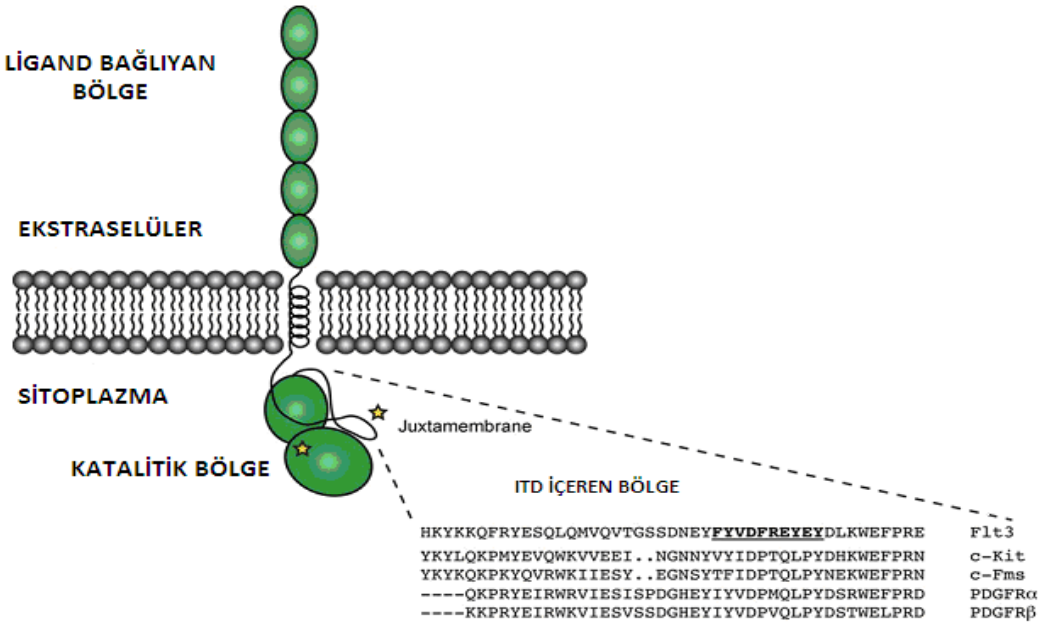
Tablo 2.8 Sınıf III tirozin kinaz reseptör ailesinin üyeleri, Lewis ve Small (67)’den alınmıştır.

RESEPTÖR	DİĞER İSMİ	LİGAND
Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)	FLK-2, stem cell kinase-1, CD135	FLT3 ligand
Steel factor receptor (c-KIT)	SCF-1, CD117	SCF
Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) α	CD140a	PDGF-A
PDGFR β	CD140b	PDGF-A,B,C
Macrophage colony stimulating factor receptor	CSF-1R, c-FMS, CD115	CSF-1

FLT3 geni 993-1000 amino asit proteini içerir. 572-603 ve 604-958 rezidüleri Juxta Membran (JM) ve tirozin kinaz domainlerine karşılık gelir. FLT3 golgide yoğun glikolizasyona maruz kalır. Matür ve immatür formları jel elektroferezinde

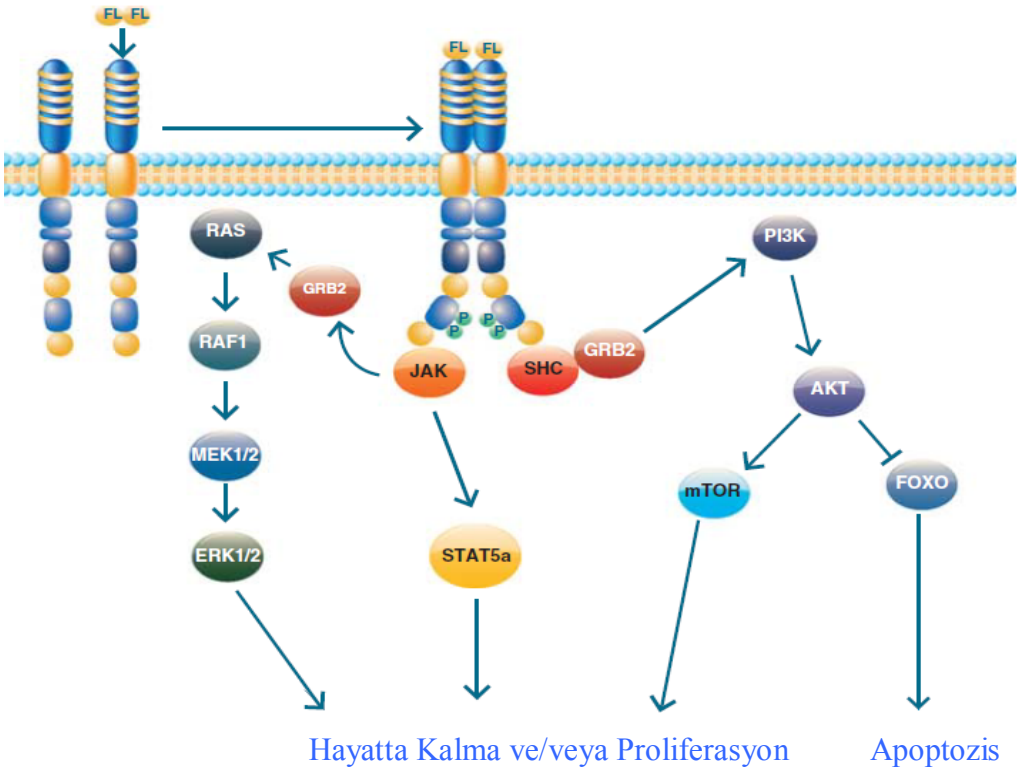
130-160kD bant olarak gözlenmektedir. N-bağlı glikolizasyon nedeniyle minör 140kD ve majör 160kD band olarak görülürken, glikolize olmadığı ve membrana bağlı olmadığı durumda ise 130 kD band olarak gözlenmektedir (68).

FLT3 reseptörünün yapısı tirozin kinaz alt ailesinin diğer üyelerine benzer özelliktedir. FLT3 reseptörü ekstraselüler bölgedeki 5 immünoglobulin benzeri domain, tek bir transmembran bölge, bir stoplazmik jukstamembran domainden ve kinaz domain aracılığıyla araya girmiş iki stoplazmik kinaz domaininden oluşmaktadır (67). FLT3 resptörünün yapısı ve ilişkili olduğu reseptör kinaz ailesinin diğer üyeleri şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Sınıf III reseptör Tirozin kinaz'ın şematize şekli, Perry M. Chan (69)'den alınmıştır. Ligant bağlayan kısım, Tek bir transmembran geçiş, İntraselüler Juxta Membran bölgesi, N ve C terminal loblu katalitik bölge.

FL bağlanınca FLT3 dimerleşir (homodimer) ve yapısal değişikliğe uğrar. Bu sayede aktivasyon ilmeği açılır, ATP bağlayan cep açığa çıkar. Oluşan dimer, sitoplazmik domainleri birleştirerek JM domaini üzerindeki Tyr589 ve Tyr591 gibi spesifik tirozin rezidülerinin transfosforilasyonunu sağlar (70).



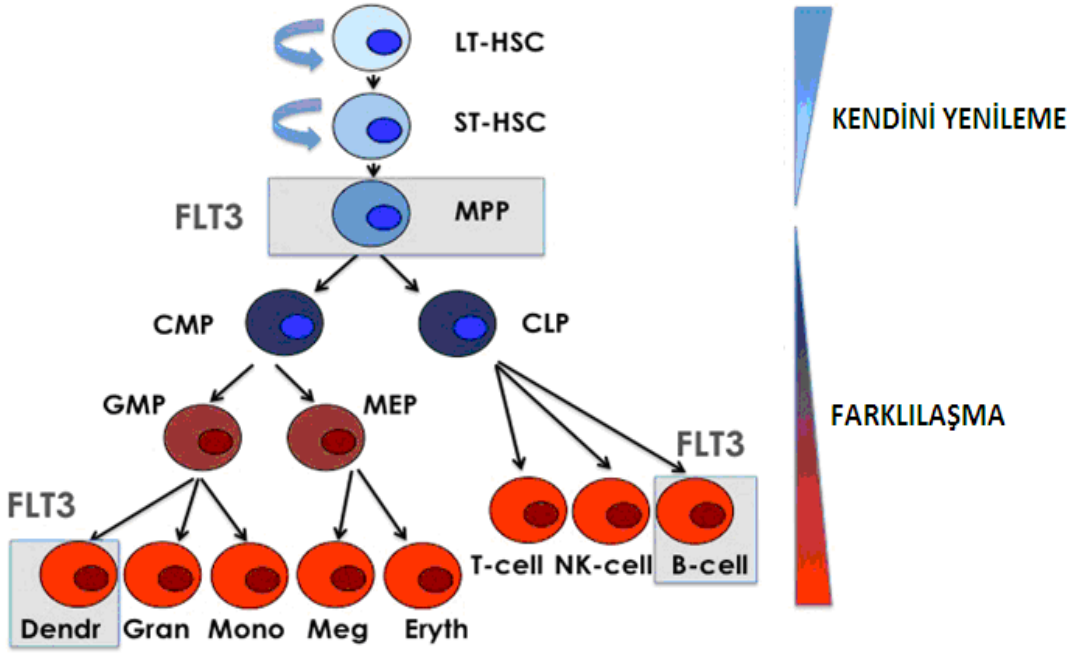
Şekil 2.5 FL-FLT3 reseptör sinyal yolağı, Swords ve ark. (71)'den alınmıştır.

Sinyal yolağı apoptozis, proliferasyon ve farklılaşma yollarında bulunan sitoplazmik efektör moleküllerin fosforilasyonu ve aktivasyonunu içerir. Sonuçta hücre büyümesini indükler ve apoptozisi inhibe eder. FLT3 reseptörü aracılığıyla iletilen sinyal bir düzenleyici protein olan fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) p85 alt ünitesine ve bir adaptör protein olan growth faktör reseptör bağlı protein 2'ye (Grb2) iletilir (72). Ras-GAP, PLC-β, PTC–kinaz, STAT5 ve MAP kinazın tümü FLT3 aktivasyonuyla bağlantılı önemli sinyal proteinleridir (71). Normal FLT3 sinyali ayrıca ekstraselüler-sinyal regüle edici kinazı (ERK1/2) aktive eder; ancak, deregüle sinyalizasyonun anahtar hedefi olan STAT5'i zayıf bir şekilde fosforile etmektedir (73).

Kemik iliğinde FLT3 ekspresyonu CD34+ hücreler ile dentritik prekürsor hücre subgrupları ile sınırlıdır (74).

Birçok araştırma, hematopoetik prekürsörlerin büyümesini indüklemek için, FL'nin diğer sitokinlerle sinerjik olarak çalıştığını göstermiştir. Hem murin hem de

insan sistemlerindeki çalışmalar FLT3 ekspresyonu ve fonksiyonunun temel olarak 'kısa süreli' yeniden yapılandırıcı hematopoetik kök hücrelerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin multilinage myeloid yeniden oluşum yeteneği vardır. Ancak kendini yenileme kapasiteleri sınırlıdır (67). Yapılan bir çalışmada adult kemik iliği ve kord kanında CD34 pozitif hücrelerde 'uzun süreli' yeniden yapılandırıcı hematopoetik kök hücrelerin yalnızca bir kısmında FLT3 ekspresyonu tespit edilmiştir (75). Birikmiş veriler, FLT3'ün erken hematopoezde önemli bir reseptör olduğunu açıkça göstermektedir (67).



Şekil 2.6 Hematopoetik hiyerarşide FLT3 ekspresyonunun rolü, Adolfsson, J., R. Mansson ve ark. (76)'den alınmıştır.
MPP:FLT3 reseptör multipotent progenitor hücreler; LT-HSC:Uzun süreli hematopoetik kök hücreler; ST-HSC:Kısa süreli hematopoetik kök hücreler; CMP:Ortak myeloid progenitörler: CLP:Ortak lenfoid progenitörler; GMP:Granülosit/Makrofaj progenitörleri; MEP:Megakaryosit/eritrosit progenitörleri; Dendr:Dendritik hücreler; Gran:Granülositler; Mono:Monositler; Meg: Megakaryositler; Eryth:Eritrositler; NK:Doğal öldürücü (natural killer) hücreler.

FLT3 reseptörü normalde hematopoetik progenitör hücrelerin hücre yüzeyinde eksprese olur fakat hücre matürasyonuyla bu ekspresyon kaybolur. FLT3 lenfoid ve myeloid farklılaşma potansiyeli olan erken hücre popülasyonlarında yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (61). Bu progenitör hücreler granulosit, monosit, B ve T hücre gelişim potansiyeline sahiptir; ancak daha ilkel kök/prekürsör hücrelerinin tersine, bu popülasyon eritroid ve megakaryosit serilerini

oluşturamamaktadır. FLT3 ayrıca plasenta, gonadlar ve beyinde, fonksiyonları bilinmemekle birlikte saptanmıştır (61).

2.3.3. Lösemilerde FLT3 Mutasyonları

FLT3 reseptörü çoğu pre B hücresinde, myeloid ve monositik lösemi hücre hatlarında eksprese olurken, FL ekspresyonunun büyük çoğunluğunun insan lösemi ve lenfoma hücre hatlarında olduğu gösterilmiştir. FL'nın aynı zamanda primer AML blastları tarafından yaygın olarak eksprese edildiği bulunmuştur (77). B lenfosit kökenli ALL'nin hemen hemen tüm örnekleri ve AML olgularının %90'dan fazlasında hem RNA hem de fonksiyonel protein olarak FLT3 ekspresyonu gösterilmiştir. Aynı şekilde, Kronik myelositer lösemi (KML)'de çok az olarak, kronik lenfositik lösemi (KLL) ve hatta T hücre ALL hücrelerinin de FLT3'ü eksprese ettiği gösterilmiştir. SEMK2-M1 lösemi hücre hattının yaban tip *FLT3* geninin amplifikasyonunu içerdiği bulunmuştur. Primer insan lösemi hücrelerinde normal kemik iliği ile karşılaştırıldığında daha büyük miktarlarda ve CD34 ekspresyonuyla yakın ilişkili olmayacak şekilde, anormal biçimde eksprese edilir (78, 79). Sonuç olarak FLT3 reseptör-ligand kombinasyonunun lökomogenezdeki önemi çeşitli hücre seri çalışmalarında gösterilmiştir.

Klinik ve deneysel çalışmalar FLT3'ün lösemik blast hücrelerinin yaşam süresini ve proliferasyon kapasitesini arttırabilme özelliği olan bir protoonkogen olduğunu göstermektedir. Yaban tip FLT3 reseptör ve ligandının ekspresyon değişikliklerinin yanı sıra lösemilerde *FLT3* mutasyonları da tanımlanmıştır. FLT3 reseptöründe temel olarak iki tip mutasyon görülmektedir (67). İlk tanımlanan *FLT3* internal tandem duplikasyon (*FLT3*/ITD) mutasyonudur. Daha sonra iki farklı grup *FLT3* kinaz domaininin aktivasyon ilmeğinde nokta mutasyonları (*FLT3*-TKD: Tirozin Kinaz Domain) tanımlamıştır (67).

2.3.3.1. *FLT3* İnternal Tandem Duplikasyon Mutasyonu

Bu mutasyon ilk olarak primer lösemi örneklerinde FLT3 ekspresyonu bakılan

bir çalışmada saptanmıştır. AML hastalarındaki FLT3'de yinelenen bu anomali not edilmiştir (80).

FLT3 kodlayıcı dizisinin jukstamemran kısmını her iki yandan gören primerler kulanılarak cDNA amplifiye edilen, 22 AML örneğinin 5 tanesinde beklenmedik bir biçimde daha uzun amplifikasyon örneği gözlenmiştir. DNA dizilemesi bu örneklerin çerçeve içi, ekzon 14 içindeki nükleotid dizisinin internal tandem duplikasyon mutasyonları olduğunu göstermiştir. Bu duplikasyonların büyüklüğü 3 ile 400 bç arasında değişmektedir. Bu orijinal olarak ekzon 11 olarak rapor edilmiştir. Fakat insan genom dizisinin tamamı elde edildiğinde tüm genin incelenmesi sonucunda *FLT3*'ün 21 ekzon değil, 24 ekzondan oluştuğu belirlenmiştir (81).

Genellikle duplike bölge 14. ve 15. ekzonlar arasında 90 baz çiftlik intron boyunca uzanır ve 15.ekzonun bir kısmını içerir. Duplike sekanslar arasında duplike olmayan nükleotidler bulunmakla birlikte sonuçta oluşan transkript daima çerçeve içinde kalır. Bazı çalışmalar ise dizinin triplikasyonunu rapor etmişlerdir (67).

FLT3 reseptörü JM bölgesindeki internal tandem duplikasyon (ITD) mutasyonu AML vakalarında en sık görülen mutasyonlardan biridir. Klinik çalışmalarda FLT3-ITD mutasyonlarının yetişkin AML vakalarında görülme sıklığı %20-40 (normal karyotipli olgularda ~%50) pediatrik AML'li olgularda ise bu oran %10 (normal karyotipli olgularda %18) olarak bulunmuştur (43).

FLT3 geninde görülen internal tandem duplikasyon mutasyonu sadece bu gene özgü değildir. Benzer mutasyon köpekgillerdeki mastosimalarda KİT reseptöründe gösterilmiştir. Ayrıca insanda hem AML hemde ALL'de *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL)* geninin parsiyel tandem duplikasyonu da tanımlanmıştır. Bazı vakalarda bu duplikasyonun, *FLT3*/ITD mutasyonuyla birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (67).

Bu duplikasyonların nedeni tam olarak bilinmemektedir. DNA replikasyonunda hatalı onarım ya da onarım esnasında kayma nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir.

Farklı bir mekanizma olarak; yanlış eşleme onarımının herhangi bir şekilde bozulması sonrasında, DNA replikasyonu sırasında kesintili zincirdeki palindromik bir dizi nedeniyle oluşan saç tokası yapısının, duplike dizinin oluşumuna yol açabileceği ileri sürülmüştür. Diğer bir spekülasyonda ise, DNA replikasyonu süresince kesintili ve kesintisiz zincirdeki eş zamanlı kırıkları izleyen onarım sırasında bir kayma olabileceğidir (82, 83).

ITD mutasyonlarını içeren FLT3 reseptörleri, COS-7,Ba/F3 veya 32D hücrelerinde eksprese edildiğinde, sürekli olarak otofosforilasyona uğramaktadır. Bu güne kadar, duplike dizinin uzunluğunun veya lokalizasyonunun otofosforilasyonunun derecesini etkileyebileceği ile ilişkili yayınlanmış herhangi bir veri yoktur. *FLT3*/ITD-transfekte hücre hatlarında, mutant reseptörlerin fosforilasyonu en üst seviyede görünmektedir ve bu durum eksojen FL'nin ilavesiyle çoğalmamaktadır. Ancak, mutant reseptörler, kendi içinde otofosforilasyonu etkileyebilmeleri nedeniyle yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. FLT3/ITD reseptörleri sadece homodimerize olmaz, aynı zamanda liganddan bağımsız olarak yaban tip reseptörle heterodimerize olurlar. ITD içeren FLT3 reseptörlerinin primer lösemi hücrelerinde sürekli olarak aktive edildiği genel olarak kabul edilmekle birlikte bunu destekleyen veriler sınırlıdır (67).

FLT3/ITD mutasyonlarını barındıran AML blastları içinde FLT3 fosforilasyonunun analiz edildiği 3 ayrı rapor yayınlanmıştır. *FLT3*/ITD mutasyonu olan AML blastlarındaki FLT3 fosforilasyonunun analiz edildiği bir raporda FLT3 otofosforilasyonun 18 olgunun sadece 12 tanesinde gösterildiği bildirilmiştir. Başka bir araştırmada ise mutasyon durumuyla fosforilasyon arasında hiçbir ilişki olmadığı bildirilmektedir. Önceki çalışmaların aksine birçok olguda ekzojen FL eklenmesi ile FLT3 fosforilasyonunun arttığı bildirilmiştir. Primer lösemi blastlarında ITD mutasyonu ile FLT3'ün sürekli aktivitesi ve liganda yanıt ilişkisini açıklayabilmek için; hücre kültürü koşulları, eksprese edilen reseptör miktarı, mutant-yaban tip reseptör oranı, FL'nın eşzamanlı ekspresyonu gibi birçok değişkenin değerlendirilmesi gerekliliği belirtilmektedir. Bununla birlikte, bugüne kadar olan bilgiler *FLT3/*ITD mutasyonunun sürekli FLT3 otofosforilasyonuyla ilişkili olduğu

düşüncesini güçlü şekilde desteklemektedir (67).

FLT3 –ITD'de sürekli kinaz aktivitesini açıklamak için Eph B2 örneği dikkate alınmaktadır. İnaktif Eph B2 reseptöründe, 2 tirozin rezidüsünü içeren (Y604 ve Y610) jukstamembran domainin bileşenleri, kinaz domaininin N terminal bölgesinin alfa heliksiyle sıkı şekilde ilişkilidir. Bu ilişki sonucunda, kinaz domainindeki aktivasyon ilmeğinin aktif konformasyonu önlenir. FLT3'deki 591. pozisyondaki tirozine karşılık gelen Eph B2'nin 610'daki tirozinin fosforilasyonunun, aktivasyon ilmeği ile olan yapısal sınırlamaları azaltarak bu ilişkiyi bozacağı öngörülmektedir. Eğer benzer bir mekanizma *FLT3* için de geçerli olursa, ITD mutasyonlarının temel otofosforilasyona yol açacak şekilde kinaz domainindeki juksta membran domainin yapısal engelini bozarak cis şeklinde etki edebileceği öngörülebilir (84). FLT3'ün de içinde bulunduğu birçok jukstamembran bölge kinaz aktivitesi ilişkisi olan reseptörün özellikle negatif düzenleyicileri içeren birden fazla mekanizmayla kontrol edildiği düşünülmektedir (85).

2.3.3.2. *FLT3* Tirozin Kinaz Domain Mutasyonları

FLT3'ün 835. pozisyonundaki aspartat rezidüsü, kinaz domaininin aktivasyon ilmeği içinde lokalize olmuştur. Bu rezidü birçok tirozin kinaz reseptör alt ailesinde korunmuştur. Farklı birçok reseptörde karşılık gelen rezidülerde, aktive edici nokta mutasyonları tanımlanmıştır. *KİT*, *MET* ve *RET* genlerinde tanımlanan bu mutasyonlar insanda çeşitli malignitelerle ilişkilidir (86, 87). Özellikle 816 *KİT* mutasyonları insan mast hücre lösemilerinde bulunmuştur. Yaygın olmamakla birlikte AML'de bazı alt gruplarla (core binding factor) ilişkili olabileceği bildirilmiştir (88, 89). Yapısal kinaz aktivitesine neden olan bu tip mutasyonların mekanizmasıyla diğer reseptör kinazlarla tespit edilenle aynı olduğu varsayılmaktadır.

AML hastalarında *FLT3 D835* nokta mutasyonu en yaygın olarak aspartatın tirozinle (D835Y) yer değiştirmesi olarak rapor edilmiştir. Aynı pozisyonda daha nadir olarak valin değişimi (D835V) olduğu da gösterilmiştir (90). Bu aspartat

değişiminin aktivasyon lopu içindeki 'açık' ATP bağlayan konformasyonu stabilize ettiği düşünülmektedir (91, 92). Bunun dışında *841*. pozisyonda izolösin asparajinle ve yine aynı pozisyonda tirozinin asparajinle yer değiştirdiği nokta mutasyonları da tanımlanmıştır. Yamamoto ve ark. 429 AML hastasında yaptıkları çalışmada; 22 tane D835Y, 5 tane D835V, 1 tane D835H, 1 tane D835E, ve 1 tane D835N olmak üzere toplam 30 hastada bu mutasyonu tespit etmiştir (93).

Yapılan diğer bir çalışmada Abu-Duhier ve arkadaşları 97 AML hastasınının 7'sinde aynı mutasyonu bulduklarını bildirmişlerdir (94). Erişkin AML'li olgularda mutasyonun %7 oranında görüldüğü tespit edilmiştir (93, 94, 95). Bu mutasyonun çocuklarda görülme oranı ise %3,3 olarak verilmektedir. 2003 yılında yapılan bir çalışmada AML tanısı almış 91 pediatrik hastanın 3 tanesinde *FLT3*-TKD mutasyonu tespit edilmiştir (96). 2006 yılında yapılan başka bir çalışmada AML tanılı 630 pediatrik olgunun 42 tanesinde (%6,7) *FLT3*-TKD mutasyonu saptanmıştır(54). 2011 yılında yapılan diğer çalışmada AML tanılı 62 pediatrik olgunun 3 tanesinde *FLT3*- TKD mutasyonu (% 4,8 insidansla) tespit edilmiştir (97).

Diğer çalışmalarda ise Thiede ve arkadaşları 979 hastanın 75'inde, Frohling ve ark. 224 hastanın 32'sinde, Moreno ve ark. 208 hastanın 28'inde *D835* mutasyonu tespit etmiştir. Bu çalışmalar da AML hastalarında mutasyonların %7'lik insidans oranını doğrulamıştır. Aktivasyon ilmek mutantlarının sinyal özellikleri ITD mutant reseptörlerininkinden farklı olabilir (95, 98, 99).

2.3.3.3. Mutasyonlar Sonucu Aktive Edilen FLT3 Yoluyla Sinyal İletimi

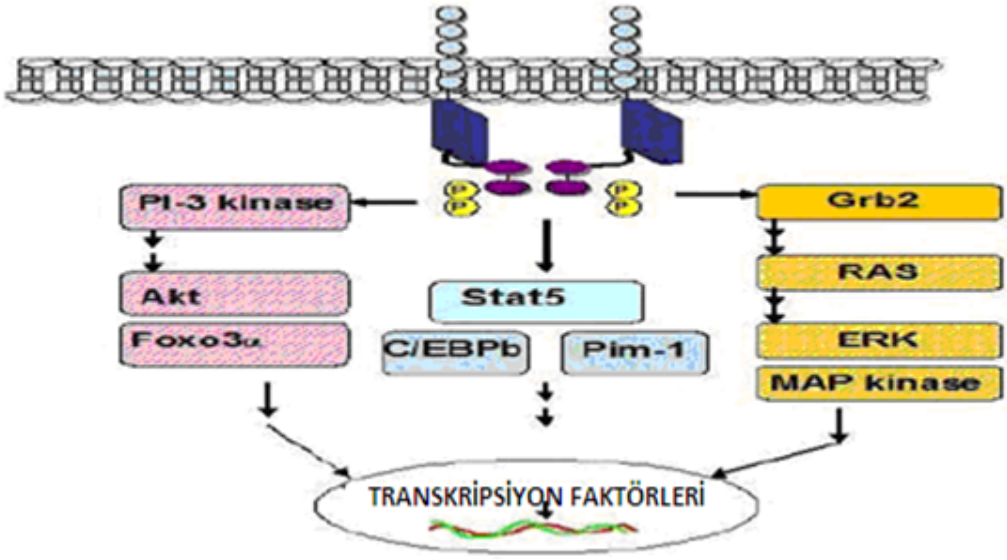
FLT3 reseptördeki aktivasyon mutasyonları, ilişkili RTK'lardakilerle benzer biçimde kinaz bölgesinin inaktif yapısının sürdürülmesi için kritik olan otoinhibitör mekanizmanın bozulmasına neden olmaktadır. Mutant reseptörler efektör proteinleri aktive ederek proliferasyon ve sağ kalımda ekili olurlar. Aynı zamanda liganttan bağımsız otofosforilasyon yoluyla diferansiasyonu bloke ederler. Proliferatif avantaj sağlayan normal olmayan protein stimulasyonu ilk olarak mutant-*FLT3* myeloid lösemi hücrelerinde saptanmıştır. İn vitro olarak ITD mutasyonu olan 32D fare

myeloid hücre hattında bağımsız proliferasyon ve radyasyonla indüklenen apoptozise direnç gösterilmiştir (100, 101).

Mutant FLT3'ün yaban tip reseptörle karşılaştırıldığı zaman farklı sinyal özelliklerine sahip olabileceği gösterilmiştir. STAT5, mutant *FLT3* transfekte edilen Ba/F3 ve 32D hücrelerinde fosforile edilmektedir. Fakat aynı hücreler yaban tip FLT3'le transfekte edildiğinde fosforile olmamaktadır. Yapısal olarak fosforlanan STAT5, *FLT3*/ITD mutasyonları olan primer AML blastlarında da gözlenmiştir. FLT3 inhibitörünün AML blastları üzerindeki sitotoksik etkilerinin, STAT5 inhibisyonu ile birlikte uygulandığında en fazla olduğu görülmüştür (100, 101).

Mutant *FLT3* transfekte edilmiş 32D ve BA/F3 hücrelerinde STAT5 yanı sıra, RAS yolağının da aktive olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık yaban tip FLT3 içeren hücrelerde FL ile uyarılmış MAP (Mitogen-Activated Protein) aktivasyonu ve minimal hücre büyümesi gözlenmiştir. STAT5 aktivasyonu gözlenmemiştir. Buna ek olarak; *FLT3*-ITD içeren tüm AML örneklerinden izole edilen blastlarda, MAP kinaz ve STAT5'in ikili aktivasyonu gösterilmiştir (100).

Mutant FLT3 reseptörlerinin normal efektör moleküllerin nicel olarak sinyal miktarını arttırarak mı yoksa alt yolaklardaki hedeflerde değişiklikler yaparak mı lösemi gelişmesinde etkili olduğu açık değildir. FLT3 aktive edici mutasyonların kompansatuar reseptör olmaksızın hedef proteinlerin devamlı fosforilasyonuyla sonuçlanabilir. Bu mutasyonların normal FLT3 sinyal yolağı içinde bulunmayan hedeflerin fosforilasyonuna da yol açabileceği bildirilmiştir. Örneğin yaban tip *FLT3*'ün Ras-GAP, PI3-kinaz Grb2, SHP-2, Shc ve Vav aracılığıyla sinyal iletiminde bulunduğu gösterilmiştir. Murin hücre hatlarında yapısal olarak aktive edilen FLT3'ün ekspresyonunun benzer şekilde MAP kinazı (muhtemelen Ras aktivasyonu aracılığıyla) ve AKT'yi (PI3-kinazın alt yolakları aracılığıyla) aktive ettiği gösterilmiştir. Bu deneysel sistemlerde, yaban tip *FLT3*'ten farklı olarak mutant *FLT3* tarafından Jak2 ve STAT3'ün de aktive edildiği gösterilmiştir (67).



Şekil 2.7 FLT3 reseptör aktivasyonunun diğer sinyal iletim yolakları ile ilişkisi, Parcells ve ark. (61)'den alınmıştır.
C/EBPα, CCAAT/ enhancer-bağlayan protein α; ERK, ekstraselüler -sinyal düzenleyen kinaz; MAP, mitojen-aktive edici protein; PI-3 kinase, fosfoinozitol 3 kinaz.

2.3.3.4. *FLT3* Mutasyonlarının AML'de Klinik Önemi

FLT3 geni Tirozin Kinaz Bölgesinde (TKD) yer değiştirme mutasyonları ve JM bölgesinde insersiyonel mutasyonları birbirinden farklı klinik özellikler gösterse de her iki mutasyon yapısal olarak aktif FLT3 reseptörüne neden olmaktadır.

FLT3-ITD mutasyonu, mutasyonu olmayan hasta grubundan anlamlı bir şekilde daha yüksek ortalama lökosit sayısıyla (lökositoz) karşımıza çıkmaktadır (102). *FLT3*-ITD mutasyonu olan olgularda beyaz küre ortalamasının tipik olarak 2 kattan daha fazla olduğu bildirilmiştir. Pediyatrik çalışmalarda lökositozun derecesi mutasyonlarla tutarlı bir şekilde ilişkili bulunmuştur. *FLT3*-ITD mutasyonu taşıyan hastalar bu mutasyonu taşımayanlara göre artmış lökositoz insidansına ve azalmış genel sağ kalıma (overall survival: OS) sahip olduğu bulunmuştur (82, 103).

Yetişkin AML popülasyonunda yapılan bir çalışmada (Schnittger ve ark, 2002) AML'li olgularda hasta yaşıyla *FLT3* geni mutasyonu arasında bir ilişki saptanmamıştır. Pediyatrik populasyonda yapılan 3 çalışmada *FLT3*-ITD mutasyonlarının 10 ve daha yukarı yaşa sahip hastalarda daha sık olduğu rapor

edilmiştir. Bu çalışmalarda yayınlanan 58 pediatrik AML olgusunun, 39 tanesi 10 yaş ve daha üzerindedir (67). FLT3-ITD mutasyonları insidansı diğer genetik faktörlerle uyumlu olacak şekilde değişken frekanslarda saptanmıştır (103, 104).

FLT3-ITD malign hücre bazlı morfolojik sınıflama olan FAB sınıflamasında tüm alt tiplerde saptanmakla birlikte en sık M3 (promyelositik) alt tipi ile birlikteliği saptanmıştır (83). Ancak yapılan çalışmaların genelinde, *FLT3*-ITD mutasyonlarının tüm diğer FAB alt tipleri boyunca dengeli bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir. İki grup M5 alt tipinde *FLT3* geni mutasyonlarının artmış insidansını not etmiştir. Çalışmalardan birinde özellikle M5b alt grubu için önemli derecede yüksek bir insidans (%28,8) verilmiştir (82, 95).

Yetişkin AML'de yapılan çalışmalarının büyük çoğunluğu, yaban-tip ve mutant *FLT3* olguları arasında tam remisyon (CR: Complete remission) oranlarında hiçbir farklılık bulunmamıştır (67). Ancak Kottaridis ve arkadaşlarının 854 AML tanılı hastayı kapsayan çalışmalarında mutasyonlu olgularda önemli derecede daha düşük CR oranı bildirilmiştir. *FLT3*-ITD mutant olgularda CR oranı %78, yaban tip *FLT3* olgularında CR oranı %84 olarak tespit edilmiştir. Mutant ve yaban tip arasındaki bu farklılığın göreceli olarak az olduğu da yorumlanmıştır. Farklı olarak pediyatrik grupta yapılan çalışmalarda CR oranında mutasyonla birlikte önemli azalma olduğu bildirilmiştir (103).

FLT3-ITD'nin prognostik etkisi, birlikte diğer genetik anomalilere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Örneğin; orta ve iyi risk grubu sitogenetik özellikleri olan hastalarda *FLT3*-ITD mutasyonu varlığında klinik sonuçlar kötü olarak yorumlanırken, *FLT3*-ITD taşıyan APL hastalarında prognozun minimal etkilendiği görülmüştür (67). Buna rağmen, 2005 yılında 250 erişkin AML hastasında çok değişkenli bir analizde *FLT3*-ITD'nin bağımsız kötü prognoz belirteci olduğu gösterilmiştir (105).

Yetişkin AML'li hastalarda yapılan çalışmalarda *FLT3*-ITD mutasyonlu olguların OS'de (overall survival=genel sağ kalım), DFS'de (disease free survival:

hastalıksız sağ kalım) ve EFS'de (event-free survival: Olaysız sağ kalım) azalma tespit edilmiştir. Ancak bu mutasyonların prognostik etkisi hakkındaki herhangi bir verinin yorumu için çalışılan AML altgrupları, mutasyon tipi, kullanılan hasta örneği sayısı, takip süresi, *FLT3* mutant-yaban tip oranları ve hastaların aldığı tedavi rejimleri dikkate alınmasının gerektiği belirtilmektedir.

Yetişkin AML'li olgularda yapılan çalışmalardan 16 tanesinden 15 tanesinde *FLT3* mutasyonu olan olgularda genel sağkalım, hastalıksız sağkalım, olaysız sağ kalımda anlamlı azalma saptanmıştır (67). Yamamoto ve ark. 201 ve Kottaridis ve ark. 854 AML hastasında *FLT3*-ITD mutasyonuna sahip ve sahip olmayan hastalar için 5 yıllık OS oranları belirlemişlerdir. Hastalar 50 ay gibi uzun süreli takip ile izlenmişlerdir. Bin hastanın incelendiği bu iki çalışmada karşılaştırılabilir tedavilerin verilmesinden 4 yıl sonra *FLT3*-ITD ekspresyonunun sağ kalımda azalma ile ilgili olduğu gösterilmiştir (103, 106).

Yapılan 3 çalışmada; Kottaridis ve ark. 854, Whitman ve ark. 82 ve Iwai ve ark. 94 AML hastasında *FLT3*-ITD ve TKD mutasyonları ile prognoz ilişkisini incelemişlerdir. En uzun takip edilen çalışma 34 ay olup, normal sitogenetiğe sahip hastalardaki sonuçlar araştırılmış ve *FLT3* mutasyonlarıyla ilişkili sağ kalımda önemli bir azalış bulunmuştur (82, 93, 95, 103). Diğer 2 çalışma 11,1 ve 12,2 aylık takip sürelerini içermektedir. Her iki grupta bu sınırlı takip süresinde *FLT3*-ITD mutasyonlarına sahip hastalarda EFS ve DFS'de önemli azalma bulunurken OS'de benzer bir sonuç saptanmamıştır (82, 95).

FLT3-ITD mutasyonları ile ilişkili önemli bir nokta, yaban tip alele göre göreceli olarak mutant alelin ekspresyon seviyesidir. Bir çalışmada 23 AML olgusunun 8 tanesinde yaban tip alelinin varlığı PZR ile belirlenememiştir. Bu hastalarda, yaban tip alel saptananlarla karşılaştırıldığı zaman önemli derecede yüksek periferik lökosit sayısı bulunmuştur. Yaban tip *FLT3* saptanamayan olguların hepsi daha kötü klinikle ilişkili bulunmuştur (103, 107). Benzer birçok çalışmada FLT3 mutant ve yaban tip oranının klinik ile ilişkili olduğu ve mutant oranı arttıkça klinik gidişin kötü yönde etkilendiği gösterilmiştir (107).

İlk tanı ve nüks AML örneklerinde yapılan çalışmalarda, *FLT3*-ITD mutasyonu olan olguların %20 veya daha azında relaps durumunda orijinal *FLT3*-ITD mutasyonunun bulunmadığı gösterilmiştir. Ayrıca tanıda yaban-tip *FLT3*'ü olan hastalarda rölapsla birlikte yeni tanıda *FLT3* mutasyonunun geliştiği bildirilmiştir (67, 95, 103).

Pediyatrik AML'de, *FLT3*-ITD mutasyonlarının negatif prognostik etkisi daha dramatik görünmektedir. Pediyatrik vakalarda, ITD mutasyonu daha negatif ve bağımsız prognoz belirtecidir. Altı pediatrik çalışmaya dahil olan toplamda 461 pediatrik AML hastası incelenmiştir (Tablo2.9). Hastalardan 58 tanesinde *FLT3*-ITD mutasyonuna sahip olduğu ve bunlardan sadece 11 hastanın yaşadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, pediyatrik çalışmalardaki yaban tip *FLT3*'e sahip hastalar için olan %58'lik sağ kalım oranlarıyla karşılaştırıldığı zaman, *FLT3*-ITD 'li hastalar için olan %19'lık sağ kalım oranına karşılık gelmektedir (67).

Tablo 2.9 Pediyatrik AML'de *FLT3*/ITD mutasyonlarının prognostik etkisi, Lewis ve Small (67)'den alınmıştır.

Çalışmalar	Total Hastalar	ITD olan hastaların sayısı	Sağkalım
Iwai ve ark.(1)	94	5	Azalmış
Xu ve ark.(2)	87	12	Azalmış
Kando ve ark.(3)	64	7	Azalmış
Meshinchi ve ark.(4)	91	15	Azalmış
Liang ve ark.(5)	80	9	Etkisi yok*
Arrigoni ve ark.(6)	45	10	Azalmış

*Bu çalışmada mutant-yaban tip oranı yüksek üç hasta ölmüştür.

AML tanılı 91 pediyatrik hastada yapılan bir çalışmada düzenli tedavi alan (CCG-2891 protokolü ile tedavi alan) hasta populasyonunda sitogenetik özellikler, lökosit sayısı ve indüksiyon rejimine bakılmaksızın *FLT3*-ITD mutasyonunun başlı başına bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (53). Pediyatrik AML çalışmalarında *FLT3* mutasyonu taşıyan hastalarda tam remisyon oranında anlamlı azalma saptanmıştır. *FLT3*-ITD mutasyonu taşıyan grupta remisyon indüksiyonu %40, taşımayanlarda isebu oran %74 olarak bulunmuştur (108). Pediyatrik AML'de

bu mutasyonların insidansı yetişkin hastalardan daha düşükken, mutasyonların varlığı yetişkin gruba göre prognozu daha kötü etkilemektedir (67).

2.3.4. FLT3 İnhibitörleri

FLT3 birçok hematopoetik malinitede artmış ekspresyonu, AML'de sık mutasyona uğraması, kötü prognostik kritere sahip olması ve sinyal yolunun birçok tümör oluşumu ile ilgili yolları içermesi nedenleriyle hedeflenmiş tedavi için uygun adaydır.

FLT3'e karşı aktivitesi olan birçok tirozin kinaz inhibitörleri tanımlanmıştır. Bu FLT3 inhibitörlerinin hepsi ATP'nin pürin bileşeninin yapısal bir taklidini içeren heterosiklik bileşiklerdir. FLT3'ün direkt yapısal analizi henüz tam bilinmemekle birlikte, farklı küçük moleküllü inhibitörlere bağlanan diğer kinazların kristal yapı verilerinin analizi, FLT3 inhibitörlerinin yapısal ilişkileri hakkında çıkarımlar yapılmasına olanak tanımıştır. Bu bileşiklerin çoğu ABL'ye bağlanan imatinib gibi reseptörün ATP bağlayıcı cebine girerek etki gösterir. Diğerleri ise anahtar kilit modeli şeklinde etki etmektedir. FLT3 inhibitörleri aktif, inaktif veya transisyonel durumdaki FLT3'e bağlanabilirler. FLT3 için olan seçicilik, tek aminoasit rezidüsünde farklılıkla değişebilir. Örneğin; FLT3 normalde imatinib mesylate ile inhibisyona uğramazken Phe-691'in threoninle yer değiştirmesi sonucunda reseptörün ilaca duyarlılığı oluşmaktadır. FLT3 inhibitörleri FLT3-bağımlı hücre hatlarının birçok çeşidinde hücre bölünmesini durdurur, proliferasyonu inhibe eder ve apoptozisi indükler. Birçok çalışmada, FLT3 inhibitörlerinin mutant *FLT3*'ü eksprese eden insan lösemi–kökenli hücre hatlarında sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde bu ajanlar FLT3/ITD yapısıyla transfekte edilen murin 32D ve Ba/F3 hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir.

Tanımlanan ilk FLT3 inhibitörleri tryphostin (AG1295 ve AG1296) bileşikleridir (107). Bu bileşikler orijinal olarak in vitro ortamda FLT3 otofosforilasyonunu inhibe eden PDGF-R inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. FLT3 otofosforilasyonunun inhibisyonunu sağlayan dozlarda FLT3 bağımlı hücre hatlarına sitotoksiktirler.

AG1295, FLT3/ITD mutasyonu olan primer AML blastlarına seçici olarak sitotoksiktir.

İndolocarbazol türevi olan CEP-701 (Lestaurtinib) aslında TrkA (tirozin kinaz inhibitörü) olarak tanımlanmıştır. AML'deki klinik çalışmalar Faz II düzeyindedir. İn vitro ve in vivo olarak FLT3 otofosforilasyonunu çok güçlü ve seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. FLT3'ü olan lösemi hücrelerine de sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Primer AML hücrelerindeki in vitro etkinliğine rağmen düşük çözünürlükleri nedeniyle klinik kullanımlarını engellemiştir.

SU5416 ilk indolinon bileşiği olup potent FLT3 inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda VEGF2 ve c-KIT inhibisyonu yaptığı da gösterilmiştir (109). SU5416, aktive FLT3 ekspresyonu yapan hücre serilerinde hücre döngüsünde duraklama ve apoptozise neden olmaktadır. Yapılan bir faz I klinik çalışmada, relaps olan ya da 70 yaşından yaşlı 55 AML hastasına 4 hafta boyunca haftada 2 kez i.v. infüzyon tedavisi verilmiştir (110). Dört hastada klinik olarak anlamlı yanıt alınırken diğer 3 hastada parsiyel yanıt alınmıştır. Başka bir faz I klinik çalışmada, 43 refrakter AML hastasına haftada 2 gün tedavi verilmiş, yedi hastada parsiyel yanıt alınmış, bir hasta remisyona girmiştir (111).

İndolinon türevi PKC412 (Midostaurin) orijinal olarak protein kinaz C inhibitörü olarak tanımlanmıştır (109). Ancak PKC412'nin FLT3-ITD ile transfekte edilen Ba/F3 hücrelerinin büyümesini ve yaşayabilme potansiyelini baskılaması nedeniyle FLT3 mutasyonları varlığında terapotik bir ajan olarak kullanabileceği gündeme gelmiştir (112). PKC412 yüksek konsantrasyonlarda, PDGFα, PDGFβ, c-KIT, ve VEGF2 gibi birçok RTK'ı inhibe etmektedir (112). Klinik araştırmalarda Faz III çalışmaları başlamıştır (71). İlaç ölçülebilir etki göstermiş olup; 14 hastanın periferik blast sayımı % 50 azalmış, 7 hastada 2-log'dan daha fazla azalma saptanmış, 6 hastada da kemik iliğinde blast sayısında % 50 azalma saptanmıştır. PKC412 genellikle iyi tolere edilmiştir (111).

CEP-701 ve PKC ile ilgili yapılan iki çalışmanın her ikisi de yoğun şekilde önceden tedavi edilmiş, monoterapi olarak CEP-701 veya PKC412 alan ve

çoğunlukla daha yaşlı olan AML hastalarından oluşan 20'den az denekle çalışılmış nispeten küçük çalışmalardır. İn vivo olarak ilacı alan hastalarda FLT3 inhibisyonunun yanı sıra önemli toksisiteye yol açmadıkları görülmüştür. Bu çalışmadaki FLT3 mutasyonu taşıyan, relaps ya da refrakter 14 AML vakasından beşinde anlamlı klinik yanıt elde edilmiştir (113). Yanıt çoğunlukla periferik blast sayısında azalma olarak görülmüştür. Minimal derecede toksisite gözlenmiştir (113).

Bu tedavisi güç, önceden yoğun şekilde tedavi almış AML hastalarında, yanıtlar sıklıkla kısa süreli (1-3ay) olmasına karşın, her iki ilaçta da kemik iliği blastlarında ve periferik blast sayımlarında azalma izlenmiştir. PKC412 ile tedavi edilen en azından bir hasta tam yanıt vermiştir (1/17), (113).

SU11248 bileşiği FLT3'ü inhibe eden diğer indolinon türevi olup, VEGF2, PDGFβ, ve FGF1'e karşı da aynı etkiyi göstermektedir (113). SU11248, MV4-11 ve *FLT3*-ITD transfekte 32D hücrelerinin proliferasyon ve hayatta kalmalarını inhibe etmiştir. Bir faz I çalışmasında, ilacı artan dozlarda oral olarak kullanan 29 AML hastasından üçünde FLT3 fosforilasyonunda anlamlı derecede azalma gösterilmiş, hastaların küçük bir kısmında gastrointestinal ya da kardiak toksisite bulguları gözlenmiştir (114).

MLN518 (Tandutinib) bir piperarazinil kinazolin olup *FLT3*-ITD transforme hücrelerin in vitro ve in vivo büyümelerini inhibe eder (115). Aynı zamanda PDGF-β ve c-KIT inhibisyonu yaptığı da gözlenmiştir. İn vitro, MLN518, *FLT3*-ITD transfekte Ba/F3 hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmalarını engellemektedir (115). AML'de Faz I klinik çalışmaları vardır. Ayrıca relaps ve refrakter AML hastalarının her ikisinde de kullanılmış ve kemik iliği blast sayısında % 50'den fazla azalma saptanmıştır (116, 117).

Reseptör tirozin kinazların PDGF-R alt ailesinin dizi benzerlikleri nedeniyle geliştirilmekte olan FLT3 inhibitörlerinin çoğu, KİT ve PDFG-R'yi neredeyse eşit potansiyelle inhibe etmektedir. Bu benzerlik nedeniyle FLT3 inhibitörlerinin klinik kullanımında, kemoterapi sonrası iyileşmeyi önleyecek ya da geciktirecek olası

etkilerinden çekinilmektedir. Akut lösemide ilaç dirençliliğinin gelişimi kadar, lökomojeneze muhtemelen katkıda bulunan mutasyonların sayısı dikkate alındığında, bir FLT3 inhibitörünün AML'de monoterapi olarak önemli bir zaman süreci boyunca etkili olması olasılıklı görünmemektedir. İnhibitör ve kemoterapinin optimum kombinasyon oluşturmasının laboratuar ve klinik verilerin etkili entegrasyonuna gereksinimi vardır.

2.4. Nükleofosmin1 (*NPM1*)

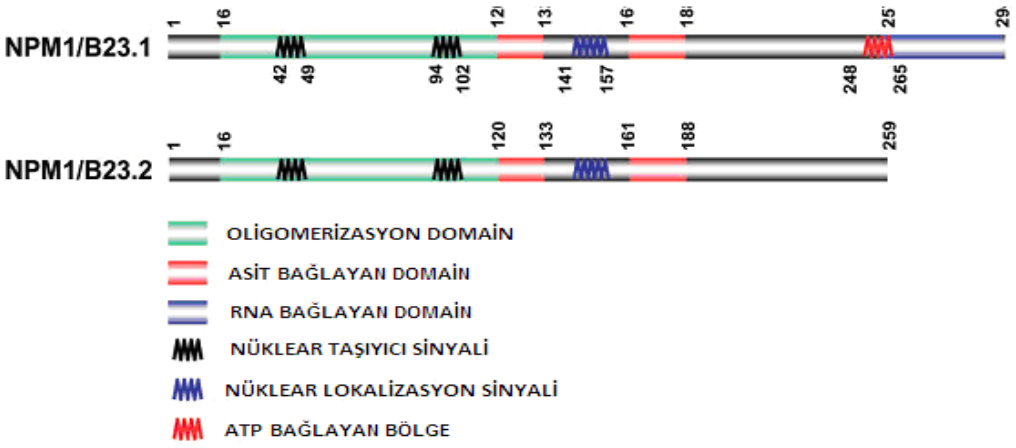
Nükleofosmin (NPM), nüklear şaperonların nükleoplazmin/nükleofosmin ailesine ait olan, yüksek derecede korunmuş, ubikitinöz olarak eksprese edilen nükleolar bir fosfoproteindir. Fare germ hattında nükleofosmini kodlayan genin inaktivasyonu, gebelik ortasında embriyonik ölümle sonuçlanan gelişimsel defektlere yol açmaktadır. İnsanlarda NPM'nin kanser patogenezinde direkt olarak ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar artmaktadır. NPM'nin çeşitli histolojik orjinli solid tümörlerde aşırı derecede eksprese edildiği ve tümör progresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Nükleofosmin ailesinde ***NPM1, NPM2*** **ve** ***NPM3*** olmak üzere üç gen bulunmaktadır. Çeşitli hematolojik malignensilerde NPM1 lokusunun delesyonu veya onkojenik füzyon proteinleri oluşturacak şekilde translokasyona uğradığı bilinmektedir. Yeni tanı AML'de son yıllarda en sık tanımlan genetik lezyonlarından biri olan *NPM1* mutasyonları AML'li yetişkin hastaların yaklaşık 1/3'de görülmektedir (117).

2.4.1. *NPM1* Geni ve Proteininin Özellikleri

*NPM1*geni insanlarda 5q35 kromozomal bölgesinde haritalanmıştır. Bu gen 23.181 bç uzunluğunda olup 12 ekzon içermektedir. *Nükleofosmin1* geni (*NPM1*), B23, NO38 veya numatrin olarak da bilinen, nükleolar bir fosfoprotein kodlar. Bu protein nükleolusun granüler bölgesinde yüksek oranda eksprese olur. Alternatif ayıklanma sonucunda B23.1 ve B23.2 olmak üzere iki tip protein oluşmaktadır (Şekil

2.9). Tüm dokularda en sık rastlanan izoform olan, B23.1, 294 aminoasit içerir. B23.1 temel olarak nükleolusda lokalize olurken, proteinin çok az bir kısmı sentrozomlarda bulunur. Yalnızca B23.1 de bulunan C-terminal bölgesi, nükleolar lokalizasyon için gereklidir (118). Nükleofosmin fonksiyonları ve karşılıklı etkileşimleri üzerine yapılmış olan çok sayıda çalışma bu proteinin büyümeyi baskılayıcı rolü olduğunu göstermektedir.



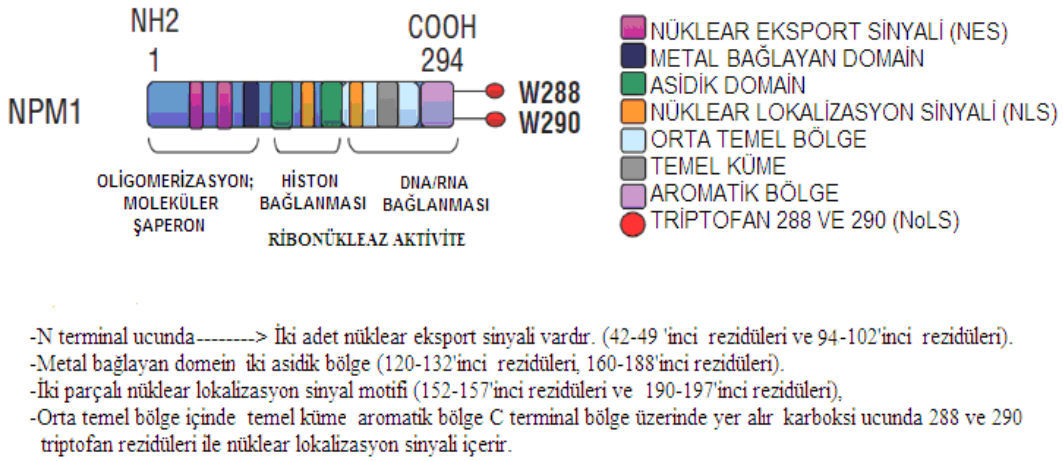
Şekil 2.8 İnsan NPM1 proteinin şematize şekli, Mitsuru Okuwaki (118)'den alınmıştır.

Nükleofosmin multifonksiyonel bir proteindir ve çoklu biyokimyasal fonksiyonlarının gerektirdiği şekilde özelleşmiş bölgelere sahiptir (117).

B23.1'in C–terminalinden 35 aminoasit yoksun olan B23.2, 259 aminoasit içerir. Düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. B23.1 nükleolusun, olgunlaşan pre-ribozomal partikülleri içeren, granüler komponentinde bulunurken, daha nadir görülen B23.2 izoformu çoğunlukla nükleoplazmada lokalize olur. B23.1'in nükleolusdaki lokalizasyonu nükleik asit bağlanma domaini sayesinde gerçekleşir (117).

NPM'nin N terminal hidrofobik kısmı molekülün kendi oligomerizasyonundan ve şaperon aktivitelerinden sorumlu olan bölgeler içermektedir. Normal koşullarda dinlenme ya da proliferasyon halindeki hücrelerde NPM proteininin %95'i oligomer olarak bulunmaktadır (119). N terminal hidrofobik domaini aracılığıyla, NPM;

çekirdekçikteki protein birikimini önleyerek, histon ve nükleozom düzeneğini destekleyerek ve asetilasyona bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi artırarak bir şaperon aktivitesi sergilemektedir (120, 121). NPM'nin oligomerizasyon domaini ayrıca in vivo koşullarda bir tümör baskılayıcı protein olan ADP- ribozilasyon faktörün (ARF) bağlanmasına aracılık eden yüksek derecede korunmuş bir motif içermektedir (Şekil2.19).



-N terminal ucunda--------> İki adet nüklear eksport sinyali vardır. (42-49 'inci rezidüleri ve 94-102'inci rezidüleri).
-Metal bağlayan domein iki asidik bölge (120-132'inci rezidüleri, 160-188'inci rezidüleri).
-İki parçalı nüklear lokalizasyon sinyal motifi (152-157'inci rezidüleri ve 190-197'inci rezidüleri),
-Orta temel bölge içinde temel küme aromatik bölge C terminal bölge üzerinde yer alır karboksi ucunda 288 ve 290 triptofan rezidüleri ile nüklear lokalizasyon sinyali içerir.

Şekil 2.9 Yaban tip NPM1'in fonksiyonel ve yapısal bölgesi, Brunangelo Falini ve ark. (117)'den alınmıştır.

NPM1 çoğunlukla nukleolusda kalmakla birlikte çekirdekle sitoplazma arasında mekik dokumaktadır. NPM1; iki adet, yüksek oranda korunmuş, hidrofobik lösinden zengin "Nüklear Eksport Sinyali" (NES) motifi (L-xxx-V -xx-V -x-L) içerir. Bu iki "Nüklear Lokalizasyon Sinyal" (NLS) motifi ise 152-157 ve 190.-197. rezidular arasında yer almakta olup NPM'nin C terminalinde bulunan triptofan rezidüleri (288-290) ile birlikte NPM'nin sitoplazmadan nukleusa geçişini sağlar. Normal koşullarda yaban tip NPM1'in nukleolus içine alınımı sitoplazmaya geçişinden baskındır. NPM'nin fosforilasyonu hem nüklear-sitoplazmik mekik işleminde hem de ribozom sentezi ile ilişkili olarak nükleolar komponentteki işlevinde indükleyici rol oynamaktadır. NPM1'nin şaperon aktivitesi iki asitik domainden ilki üzerinden gerçekleşmektedir (122,123). NPM1 oligomerinin dış yüzeyinde bu bölgede yer alan negatif yük birikimi; nukleustaki ribozom oluşumu sırasında ribozomal protinlerle rRNA arasındaki özgün olmayan etkileşimi minimalize ederek ribozamal bazik proteinler için bağlanma yeri olarak görev yapar (119). NPM'deki bu ilk asidik

segmentte kazein kinaz 2 (CK-2) bölgesi (Ser125) de bulunmaktadır. Nükleolus bol bulunan CK-2 tarafından bu bölgenin fosforilasyonu, NPM'nin substrata olan afinitesini azaltıp ayrışmasını kolaylaştırarak NPM'nin şaperon aktivitesine katkıda bulunur (124).

NPM'nin C terminalinde bulunan iki mutasyon, lösemilerde saptanan NPM'nin aberan lokalizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. NPM'nin C terminalindeki mutasyonun lösinden zengin ek bir NES motifi oluşturabileceği ya da 288-290. rezidülerdeki triptofan kaybının NLS işlevini bozacağı ileri sürülmektedir. Sonuç olarak NPM nukleolus yerine sitoplazmada lokalize olmaktadır (117, 125, 126).

Nükleofosmin, dokularda yaygın bir şekilde ifade edilen yüksek oranda korunmuş bir proteindir. NPM'nin prolifere olan hücrelerde, dinlenme halinde olanlara göre çok daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. NPM'nin aşırı ekspresyonunun; stres koşulları altındaki hematopoetik kök hücrelerin iyileşmesini ve sağ kalımı desteklediği, insan HL-60 lösemik hücrelerinde retinoik asit tarafından indüklenen farklılaşma ve apopitozise duyarlılığı azalttığı bildirilmiştir. NPM'nin kaybı veya NPM trafiğinin inhibisyonu protein translasyonunu bloke eder ve hücre döngüsünü durdurur. NPM'nin hücre büyümesi ve çoğalması üzerindeki kontrolünün; ribozom biyogenezinin yanı sıra, p53 ve ARF gibi proteinlerle, histonlarla etkileşimini içeren birçok aktivitesinin sonucu olabileceği ileri sürülmektedir (117). İn vivo çalışmalarda NPM ekspresyonunun doğrudan myc ile kontrol edildiği gösterilmiştir (127). Bu yönüyle de proliferasyon artışı ile NPM'nin aşırı ekspresyonu ilişkilendirilmektedir (117).

NPM ve diğer proteinler arasındaki etkileşimlerin nükleolusların kurulması ve dağılımıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (117).

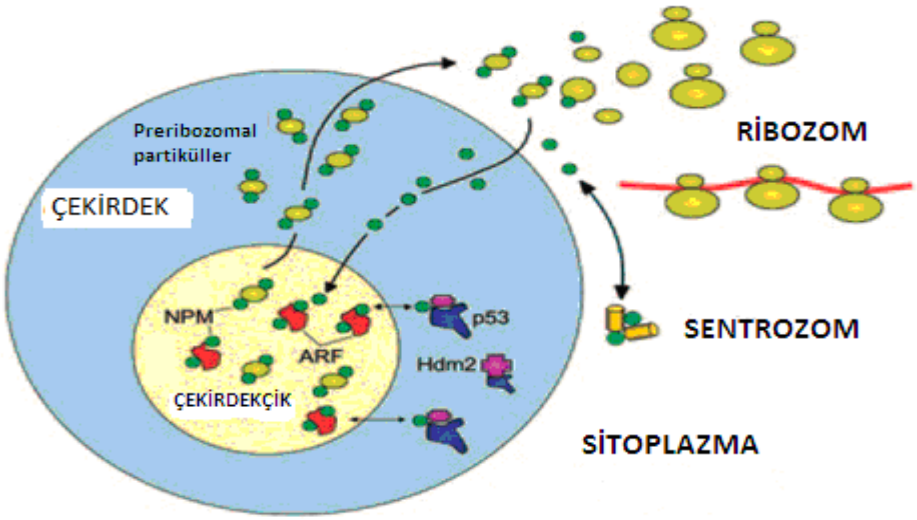
NPM1'nin birçok temel hücre işleminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. NPM1'in protein kümeleşmesini baskılamak, ısıya bağlı doğal yapının bozulmasına bağlı olarak oluşan aktivite kaybına karşı enzimleri korumak ve kimyasal olarak

bozulmuş denatüre proteinlerin yeniden renatürasyonunu sağlamak gibi moleküler düzeyde koruyucu etkileri vardır (128).

2.4.1.1. Ribozom Sentezine Etkisi

Ribozomların yapılanması nükleolusda gerçekleşir. Nükleolus, denetimli ve yeterli rRNA sentezi ve işlenmesi ile ribozomal alt birim yapılanması gereksinimini karşılayan bir ribozom fabrikası olarak çalışır.

NPM, nükleostoplazmik mekik dokuma özeliği ve intrinsik RNA'az aktivitesi, nükleik asitlere bağlanma yeteneği ile pre-mRNA moleküllerini işlemesiyle ve bir şaperon gibi protein birikimini engelleyerek ribozom oluşumu sürecinde çekirdekçikte ribozomların işlenmesi ve/veya oluşumuna katkıda bulunur (117).



Şekil 2.10 NPM1 proteininin işlevleri, Falini ve ark. (129)'den alınmıştır.

Yapılan çalışmalar, NPM1'nin preRNA işlenmesi ve ribozom oluşumu sürecinde etkili olduğunu göstermektedir. 47S pre-rRNA nukleusta sentezlenir ve kompleks bir seri kesimden sonra olgun 18S, 5.8S ve 28S RNA'lar oluşturulur NPM1'nin ribonükleaz aktivitesi ile fosfodiesteraz olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu proteinin pre-rRNA'da spesifik ITS2 (İnternal Transcribed Spacer) bölgesinden endonükleotik olarak kesim yaptığı gösterilmiştir (130,131).

NPM'nin ribozomal protein L5 (RP L5) ile doğrudan ilişkisi ribozom oluşumunda etkili olmaktadır. RpL5'in nüklear eksport için gerekli olduğu gösterilmiştir (126). NPM, ribozomal protein S9'un nukleusta seçici olarak depolanmasını ve korunmasını sağlamaktadır. Bu yolla da ribozom biyogenezine yardımcı olmaktadır (132).

Ribozom biyosentezi sırasındaki protein konsantrasyonu oldukça yüksektir. Bu durum agregasyon ve immobilizasyon riskini de beraberinde getirir. Termal stres altında Hsp 70'in nükleolusdaki lokalizasyonunun artması, stres durumunda şaperon proteinlerine duyulan ihtiyacın arttığının göstergesidir. Hsp 70'in, alt üniteleri kısmen bir araya gelen ribozomları ve ribozom oluşumunda rol alan molekülleri koruduğu düşünülmektedir (133). Normal fizyolojik koşullar altında NPM1'in de Hsp70 ile benzer görevi olduğu düşünülmektedir. Ribozomal proteinler ribozomda bulunmadıkları zamanlarda çökme eğilimindedir. NPM-ribozomal protein yapılarının, proteinlerin ribozom bünyesinde toplanması sırasında bir geçiş fazı olarak görev yaptığı gösterilmiştir.

2.4.1.2. Sentrozom Organizasyonundaki Rolü

Memeli hücrelerinde sentrozom duplikasyonu kontrol edilen bir süreçtir. Anormal sentrozom duplikasyonu hemen hemen tüm kanser tipleri ile ilişkilenen anöploidi ile bağlantılıdır. Sentrozom duplikasyonunun regülasyonuna ilişkin mekanizma tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Ancak birçok hücresel faktör bu sürece katkıda bulunur (134, 135).

NPM1, mitoz sırasında DNA tamir mekanizmalarını ve sentrozom duplikasyonunu kontrol ederek genomik stabilitenin sürdürülmesini sağlar. NPM duplike olmayan sentrozomla birlikte bulunup, duplikasyonu inhibe ederek sentrozom duplikasyonu düzenler. NPM'nin ayrılması sentrozom duplikasyonunu tetikler. PLK1 ve NEK2A tarafından serin 4 rezidüsünün fosforilasyonuyla mitoz süresince NPM mitotik iğ iplikçiklerinde sentrozomla yeniden birlikte olur. Tanımlanan bu CDK2/cyclin E yolağında ROCK II kinazın (Rho küçük GTP'azın bir

efektörü) etkili olduğu gösterilmiştir. NPM inaktivasyonu sınırlandırılmamış sentrozom duplikasyonuna ve genomik instabiliteye yol açmaktadır. NPM -/+ farelerde sınırlandırılmamış sentrozom duplikasyonu sonucunda myelodisplastik benzeri sendrom geliştiğinin gösterilmesi NPM1'in bu rolünü desteklemektedir (117, 136, 137, 138, 139).

2.4.1.3. Nükleozom Orgonizasyondaki Rolü

Hatasız nükleozom oluşumu ve üst seviye kromatin yapılanması için nükleer şaperonlara ihtiyaç duyulur. NPM1 histon şaperon aktivitesine sahip olan bir moleküldür (140). Histon asetillenmesi, histonların net pozitif yükünü azaltır ve hem DNA'ya bağlanmasını hem de diğer proteinlerle etkileşimini zayıflatır. Ayrıca histonların asetillenmesi nükleozomal DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını ve DNA'ya bağlanan proteinlerin kromatinlere ulaşabilirliğini arttırır (140).

NPM ve core histonların asetilasyonunun kromatin transkripsiyonunu artırmada gerekli olduğu gösterilmiştir. Asetile NPM'nin asetile olan histona afinite artışı göstermekle kalmadığı aynı zamanda histon transferinin yapılmasını kolaylaştırdığıda gösterilmiştir. Böylece asetile NPM, nükleozom yapısını bozmakta ve transkripsiyonel aktivasyonu sağlamaktadır. Sonuç olarak NPM1 asetilasyon bağımlı transkripsiyonel aktivitenin artışında histon şaperonu olarak görev yapar (141).

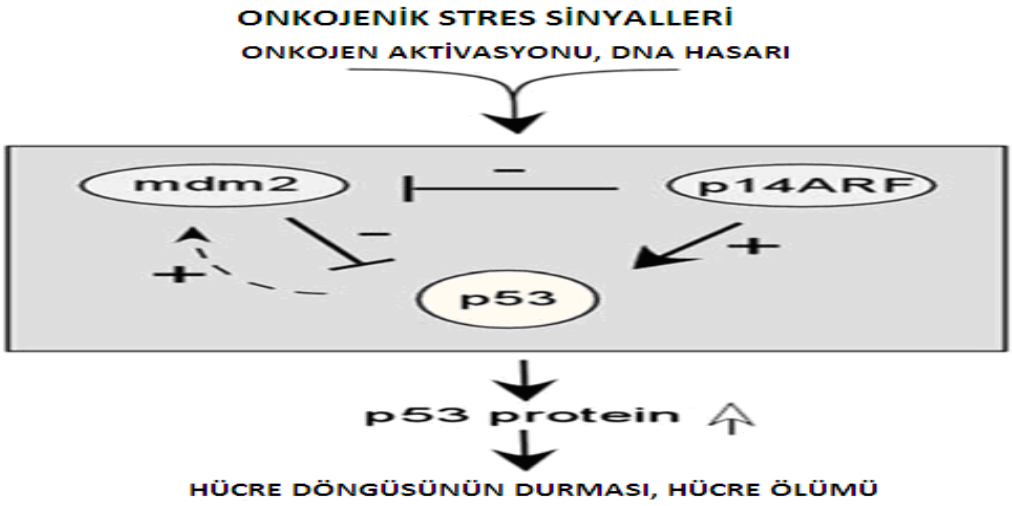
2.4.1.4. DNA Tamir ve Hücre Siklusu İlişkisi

NPM, p53 ve ARF proteinleri karşılıklı etkileşime geçerek hücre proliferasyonu ve apotozisi kontrol etmekte önemli bir rol oynar (142). NPM1, hücre stresine cevap olarak p53'ün aktivasyonu ve stabilizasyonu için hayati önem taşımaktadır (143). İnsan MDM2 (HMDM2) nüklear ve nükleo stoplazmik bir proteindir. MDM2, p53 seviyesini E3 ubikitin ligaz özelliği ile kontrol eder. Hücre stresi NPM1'in nükleoplazmik lokalizasyonuna neden olur. Bu yer değişimi sonucunda NPM MDM2'yi inhibe eder. Sonuç olarak p53 stabilizasyonu ve aktivasyonuna yol açar

(144). Ayrıca, p53 aktivasyonu GADD45 α ile kontrol edilir. Bir pro-apoptotik protein olan GADD45α ile p53'ün etkileşimi, iyonize radyasyon ve ultraviyole gibi hücresel streslerden sonra hücre siklusunun G2-M fazında durmasına yol açar (145). NPM doğrudan GADD45α'ya bağlanır (146). Sonuç olarak GADD45α'nın nüklear lokalizasyonunu ve p53 ile ilişkisini kolaylaştırır. Bu nedenle NPM1, p53'e bağlı hücre siklusunun durmasını kontrol etmede etkin bir rol oynamaktadır.

Alternate reading frame (ARF) proteini(farelerde p19 ARF, insanlarda p14ARF) onkojenik strese yanıt olarak oluşan nukleolusa ait bir proteindir. ARF'nin apoptotik programların düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün durmasında rolü vardır. ARF, HMDM2'yi nukleus içinde lokalize ederek baskılar, bu da p53'ün aktivasyonuna ve stabilizasyonuna neden olur (147, 148). NPM1, yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler oluşturarak ARF ile birlikte çekirdekçikte yerleşim göstermektedir. Büyük olasılıkla ARF, sadece NPM1'e bağlandığı zaman stabil yapıda kalmaktadır. Böylece birçok yanlış katlanmış proteinin maruz kaldığı hızlı proteazom aracılıklı yıkımdan kendini korumaktadır.

ARF, p53'e bağımlı olan metabolik yolların yanı sıra, p53'ten bağımsız olarak da hücre döngüsünü düzenleyebilmektedir. ARF ribozom biyosentezini baskılayarak hücre çoğalmasına engeller. ARF'nin, NPM1'nin çekirdek ve sitoplazma arasındaki gidiş-gelişini baskılayarak hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. ARF, çekirdekçikte NPM1 ile ilişkide bulunarak işlenmiş rRNA'nın taşınmasını önler (149, 150, 151, 152, 153).



Şekil 2.11 ARF, mdm2 ve p53 ilişkisi, Ruth A.Gjerset (154)'den alınmıştır.

Gerekli durumlarda hücre döngüsünün durdurulmasını tetikleyen ve onkogenik uyarıya cevaben apoptotik programlarda görev alan ARF, p53'ün negatif regülatörü olan MDM2'yi inhibe eder. MDM2 ve NPM1 nükleoplazmada ARF'ye bağlanmak için yarışırlar. Sonuç olarak MDM2-NPM ve ARF-MDM2 ikili kompleksleri oluşur. MDM2' nin bu şekilde ikili kompleksler dahilinde tutulması p53'ü MDM2 bağımlı yıkımdan korur. Negatif regülasyonu baskılanan p53'ün yarı ömrü artar ve p53 ifadesi güçlenir. Sonuç olarak hücre döngüsü baskılanır, hasarlı hücre tamir edilmeye çalışılır veya hücre apopitoza gider (117, 155, 156).

Aynı zamanda NPM1'nin Bax için bir şaperon olarak görev yaptığı da bilinmektedir. Bu proteinde yapısal değişiklik yaparak mitokondriye translokasyonunu sağlar. Sonuç olarak apopitotik yolağın kontrolünde anahtar bir rol oynar (157).

Nükleoplazma ve sitoplazmada NPM çok düşük miktarda, sentrozom duplikasyonu ve ribozom biyosentezi gibi farklı hücresel aktiviteler için gereklidir. Bu NPM rezervlerinin büyüklüğü NPM trafiğinin farklı hücre içi kompartmanlar boyunca düzenlenmesine sıkı şekilde bağlıdır. NPM'nin nükleolar bileşenlere daha çok veya daha az etkinlikle bağlanma kapasitesi çeşitli değişkenlere bağlı olarak düzenlenmektedir. Bu değişkenler molekülün oligomerizasyon durumu, NPM'nin ARF ile veya diğer nükleolar proteinlerle etkileşimi, CDK1 bölgelerinin

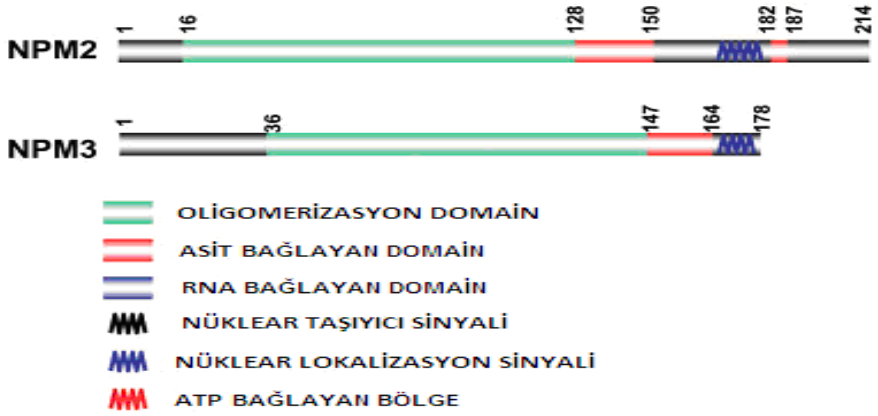
fosforilasyon durumu 288 ve 290. pozisyondaki kritik triptofanlar olarak gruplandırılmaktadır (125, 126).

2.4.2. *NPM2* geni ve Proteininin Özelliği

Nucleophosmin/nucleoplasmin *2* (*NPM2*) insanda 8p21.3 bölgesinde lokalize olup 12.056 bç uzunluğundadır. *NPM2* geni insan ve farede klonlanmıştır. Protein ürünü insanda 214 aa içermektedir. Fare ile %61 homoloji gösterir. Fare çalışmalarında genin 14. kromozomda lokalize olduğu ve 9 ekzon içerdiği saptanmıştır (158). NPM2'nin döllenmeyi izleyen 8 hücreli aşamaya doğru embriyoda pronukleus ve nukleuslarda lokalize olduğu bildirilmiştir. Ancak blastokistte zorlukla saptanabildiği vurgulanmaktadır.

NPM2 geni tarafından sentezlenen NPM2 proteini ilk olarak Afrika çengelli kurbağası *Xenopus laevis*'in yumurtalarında izole edilmiştir. Burada bol bulunan bir nüklear proteindir.

NPM2 histonlara bağlanır. Ayrıca histon proteinleri ve DNA'dan nükleozom oluşumuna aracılık eder. NPM2 ayrıca *Sperm Nuclear Basic Proteins* (SNBP)'lere de bağlanır. Fertilizasyonu takiben paternal kromatin yapısında olan değişikliği ve dekondansasyonu düzenler (159).



Şekil 2.12 İnsan NPM2 ve NPM3 proteininin şematik gösterimi, Mitsuru Okuwaki (160)'den alınmıştır.

2.4.3. *NPM3* geni ve Proteininin Özelliği

Nucleophosmın/Nucleoplasmın Family Member 3 *(NPM3)* 5,5 kilobaz olup insanda 10q24-26 bölgesinde lokalizedir. *NPM3* geni hem insanda hem farede klonlanmıştır. İnsanda bulunan NPM3 proteini 178 aminoasit içermektedir ve %87 oranında fare ile homoloji gösterir. Faredeki *NPM3* geni 19. kromozomda yer alır. Farede *NPM3* geni 6 ekzon içermektedir ve 2 kilobaz büyüklüğündedir (128). *NPM3* insan geninin fare ile aynı ekzon yapısına sahip olduğu bulunmuştur (161). İnsanda pankreas ve testisde yüksek seviyede, akciğerlerde ise düşük seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir.

NPM3, NO29 olarak da adlandırılmıştır. NPM ailesinin en son keşfedilen üyesidir. Nükleolar yerleşimli bir protein olup birçok dokuda yaygın olarak bulunur. NPM3, NPM1'in ribozomal RNA sentezinin regülasyonuna yardımcı olur. Buna ek olarak memeli oositlerinde eksprese olur ve paternal kromatin dekondansasyonuyla ilişkilidir. Alt omurgalılarda NPM2'ye benzer yapıda olduğu gösterilmiştir (159).

2.4.4. İnsan Kanserlerinde Nükleofosmin

NPM'nin mide, bağırsak, over ve prostatın da olduğu çeşitli histolojik orijinli tümörlerde aşırı ekspresyona uğradığı bulunmuştur. *NPM1* geni, hematopoetik malign tümörlerde saptanan kromozomal translokasyonların en sık hedeflerinden biri olarak tanımlanmaktadır (162). ALK (+) lenfomalar içinde tanımlanan füzyon proteinlerinin %80'ini *NPM1-ALK* füzyonlarının oluşturduğu bilinmektedir.

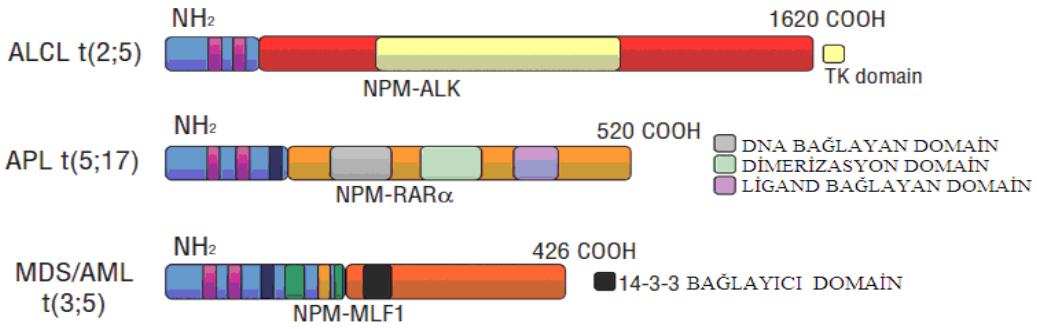
AML'den başka tümörlerde *NPM1*'in mutasyonu çalışmaları seyrektir. AML dışında hematopoetik ve ekstra hematopoetik neoplazmlarda yapılan çalışmalarda immunohistokimyasal analiz sonucunda *NPM1* mutasyonu bulunmadığı bildirilmiştir. *NPM1* mutasyonları erişkin AML hastalarının yaklaşık 1/3'ünde bulunurken, insan myeloid lösemi hücre hatlarında sadece 1/79 oranında saptanmıştır (117).

Caudill ve arkadaşları tarafından 2006 yılında, 60 kronik myelomonositik lösemi (KMML) hastasında yapılan çalışmada *NPM1* gen mutasyonu saptanan 3 hastada bir yıl içinde AML geliştiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada 38 MDS hastasından yalnızca 2'sinde *NPM1* gen mutasyonlarına rastlanılmıştır. Ancak başka çalışmalar bu bulguyu henüz desteklememektedir. NPM1 mutasyonu ve MDS ilişkisini açıklamak için daha geniş serilerde çalışma yapılmasının gerektiği vurgulanmaktadır. *NPM1* gen mutasyonlarına genellikle de novo AML'li hastalarda rastlandığı ve sekonder AML gelişiminde çok nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (117).

2.4.4.1. *NPM1* İçeren Translokasyonlar

İnsanlarda *NPM'*nin direkt olarak kanser patogenezi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Hematopoetik tümörlerin yanısıra kolon, karaciğer, mide, over ve prostat tümörlerini de kapsayan çok sayıda histolojik orjinli solid tümörde *NPM1*'in yüksek ekspresyonu söz konusudur.

Çeşitli hematolojik malinitelerde *NPM1* lokusunun kaybı veya NPM'de fonksiyon kaybına neden olan translokasyonların varlığı bildirilmiştir. Söz konusu kromozomal translokasyonlar onkogenik füzyon proteinlerinin oluşumu ile sonuçlanır. Anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL)'da t(2;5) sonucu NPM-ALK füzyon proteini; akut promiyelositik lösemi (APL)'de t(5;17) translokasyonu sonucu NPM-RARα füzyon proteini; AML'de ve myelodisplastik sendrom (MDS) da t(3;5) translokasyonu sonucu NPM-MLF1 füzyon proteini oluşur (Şekil 2.13).

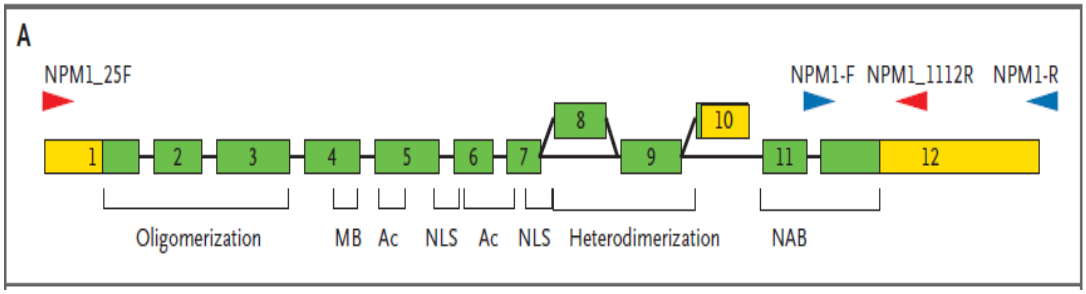


Şekil 2.13 Hematolojik malignitelerde değişmiş NPM proteinlerinin fonksiyonel ve yapısal bölgesi, Falini ve ark. (117)'den alınmıştır.

Ayrıca yeni tanı MDS hastalarında ve bazı solid tümörlerde *NPM1*'in lokalize olduğu kromozom bölgesinin delesyonu ya da tedaviye bağlı MDS (sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi sonrasında tedaviye bağlı olarak gelişen MDS tipi) hastalarında monozomi 5 görülür (117,135,163).

2.4.4.2. *NPM1* gen Mutasyonları

NPM1 geni ile ilişkili olarak tanımlanan en sık anomali AML hastalarında görülen *NPM1* gen mutasyonlarıdır. 2005'te Falini ve arkadaşları yetişkin AML vakalarının yaklaşık %35'inde NPM'nin olağan dışı sitoplazmik lokalizasyonu (NPMc+) ile sonuçlanan *NPM1* ekzon 12 mutasyonunu rapor etmişlerdir (164). Araştırılan diğer neoplazmalarda NPM'nin çekirdekle sınırlı olduğu gösterilmiştir (164,165,166). NPMc+, AML dışında kronik miyeloproliferatif düzensizliklerde ve miyelodisplastik sendromda saptanmıştır (167,168). Kronik miyeloproliferatif vakalar incelendiğinde, hepsinin kronik miyelomonositik lösemi olduğu ve çoğunun bir sene içinde AML'ye ilerlediği bildirilmiştir. Bu vakaların monositik farklılaşmayla aslında M4 ve M5 AML olabileceği düşünülmüştür. Birden fazla seride tutulum ve displastik özellikler NPMc+ AML'de sık rastlanan bulgulardır. Bu nedenle mutasyonu olan NPM'li AML ile MDS arasında ayrım yapmanın zor olabileceği belirtilmiştir (164, 169).



Şekil 2.14 NPM1 geninin şematik sunumu, Falini, Mecucci ve ark. (170)'den alınmıştır.
Yeşil bölgeler kodlama dizilerini, Sarı kısımlar 3' 5' bölgelerini, MB: Metal bağlayan domain, Ac: Asidik domain, NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali, NAB: Nükleer asit bağlayıcı domain olarak gösterilmiştir.

NPM1 geni mutasyonu tüm vakaların %25-35'inde, NK-AML'li olguların ise %45,7-63,8'de bulunmaktadır. Pediyatrik AML olgularında bu oran çok daha düşük olup, %0-12 olarak bildirilmiştir. Pediatrik grupta NK-AML'de ise %9-26,9 oranında bu mutasyonun bulunduğu gösterilmiştir (43, 164, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175).

Mutasyonun sıklığı yaşla birlikte artış göstermektedir (164, 169, 171, 172, 173, 174). 3 yaşın altındaki çocuklarda (0/126) *NPM1* mutasyonları saptanmamıştır. NPM1 mutasyonlarının 21 yaşından sonra görülme sıklığı devamlı olarak artmaktadır. 21-35 yaşındaki hastaların yaklaşık %15'i, 35-60 yaşındaki hastaların %40'ı, 60 ve daha yukarı yaşlardaki hastaların %50'si *NPM1* mutasyonları taşımaktadır. Bu veri miyeloid kök/progenitör hücrede *NPM1* mutasyonu kazanma riskinin kümülatif olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca NPM'nin yaygın ve tipik olmayan mutasyonları çocuklarda ve daha genç yetişkinlerde daha fazla saptanmaktadır (164, 168, 169, 102, 176, 177).

Çok küçük çocuklarda *NPM1* mutasyonunu çarpıcı bir şekilde bulunmaması nedeniyle *NPM1* mutasyonu sonrasında lösemi transformasyonu için gerekli başka mutasyonların oluşumunun yıllarca sürebileceği görüşü ileri sürülmüştür. Alternatif olarak, küçük çocuklardaki kök/progenitor hücrelerin *NPM1* mutasyonlarına karşı göreceli olarak daha dayanıklı olabiliceği hipotezi geliştirilmiştir. Bu bulgular NK-AML'nin moleküler patogenezinin yetişkinlerde ve çocuklarda farklı olabileceğini düşündürmektedir (156).

Bazı çalışmalarda *NPM* mutasyonlarının kadınlarda erkeklere göre önemli derecede daha fazla olduğu bulunmuştur (164, 167, 168, 176, 177, 169, 174, 178). Bu kadın üstünlüğü pediyatrik populasyonlarda da bulunmuştur (169, 179, 180). Ancak farklı araştırmalarda *NPM1* mutasyonu görülme sıklığı ve cinsiyet arasında bir ilişki kurulamamıştır (164, 171, 175, 173, 168).

Asya populasyonlarında *NPM1* mutasyonunun düşük görülme sıklığı nedeniyle, bu mutasyonun sıklığında etnik farklılıkların etkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bir

pediyatrik araştırmada NK-AML'li 33 Japon hastada hiçbir *NPM1* mutasyonu saptanmamıştır (166, 172). Tayvanlı çocuklarda yürütülmüş olan diğer bir araştırmada *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığı sadece %2.1 olarak bulunmuştur (173). Buna karşılık Avrupa ve Birleşik Devletlerde AML tanısı alan çocuklarda *NPM1* mutasyonunun görülme sıklığı %6.4 ile %8.4 arasında olduğu bildirilmiştir (175, 181). Bu mutasyon, Avrupa kökenli erişkin hastalarda yaklaşık %35 oranında görülürken Çinli ve Japon yetişkinlerde sırasıyla %14.3 ile %28.2 olarak saptanmıştır (164, 172, 173, 174). Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, etnik köken ve coğrafik dağılıma bağlı olarak *NPM1* mutasyon sıklıklarının değişim gösterebileceği ileri sürülmüştür (156).

2.4.4.3. *NPM1* Mutasyonlarının Tipleri

Çok nadir görülen ekzon 11 ve ekzon 9 mutasyonları dışında *NPM1* mutasyonları genellikle ekzon 12 ile sınırlıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda *NPM1* geninin 12. ekzonunda meydana gelen 55 farklı tip mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 956.- 971. pozisyonlar arasında meydana gelir. En sık rastlanan *NPM1* mutasyonu 956.-959. pozisyonda bulunan TCTG tetranükleotidin duplikasyonudur. Vakaların yaklaşık %75-80'inde görülür ve mutasyon A olarak adlandırılır. Mutasyon B ve D olarak adlandırılan mutasyonlar sırasıyla %10 ve %5 oranında görülürken diğer mutasyon tiplerine çok nadir rastlanır. Mutasyon tipinden bağımsız olarak, tüm mutasyon varyantları, 4-5 bazlık bir kazanım ile NPM proteinin C-terminalini kodlayan bölgede bir çerçeve kaymasına neden olur (Şekil 2.15). Bu durum C-terminalinde bulunan aromatik triptofan rezidülerinin kaybı ve sonuç olarak da NPM'nin anormal sitoplazmik lokalizasyonu ile sonuçlanır (117, 155, 182).

B, C ve D mutasyonları aynı çerçeve kaymasıyla sonuçlanan, 956. pozisyondaki farklı 4-baz çiftlik insersiyonları içerir. E ve F mutasyonları ise, 965'den 969'a kadar olan nükleotitlerin (GGAGG) delesyonu ve aynı çerçeve kaymasına neden olacak 9 nükleotid insersiyonu ile oluşur (Şekil 2.15). En sık görülen altı NPM mutant proteininde 288 ve 290. pozisyonlarındaki triptofan rezidülarından en azından

birinde mutasyon vardır. Bu altı mutant protein de aynı beş aminoasit rezidüsü (VSLRK) ile sonlanmaktadır (Şekil 2.15), (175).



Mutasyon Tipleri	GenBank Accession No.	DİZİ ANALİZİ	Kodladığı Protein
None (wild type)	NM_002520	GATCTCTG....GCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQWRKSL
Mutasyon A	AY740634	GATCTCTGTCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutasyon B	AY740635	GATCTCTGCATGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCMAVEEVSLRK
Mutasyon C	AY740636	GATCTCTGCGTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCVAVEEVSLRK
Mutasyon D	AY740637	GATCTCTGCCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutasyon E	AY740638	GATCTCTG....GCAGTCTCTTGCCCAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLAQVSLRK
Mutasyon F	AY740639	GATCTCTG....GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLEKVSLRK

Şekil 2.15 Ekzon 12'deki *NPM1* mutasyon tipleri ve kodladığı proteinler, Falini ve ark. (175)'den alınmıştır.

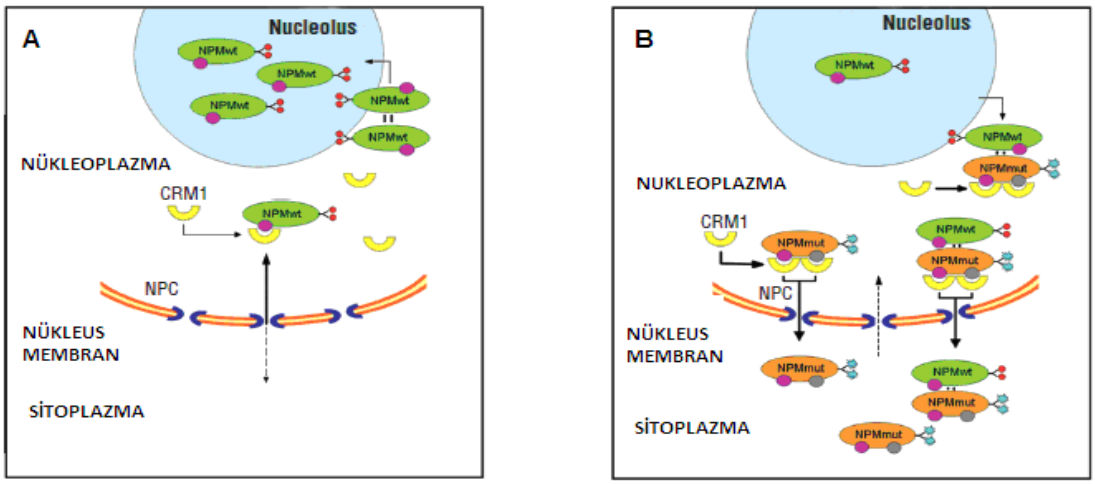
NPM mutantlarının en ayırt edici özelliklerinden biri, lösemik hücrelerin sitoplazmasındaki anormal yerleşimidir. Bunun nedeni proteinin C ucundaki değişikliklerdir. Bu değişiklik sonucunda:

1-Yeni NES motifinin oluşumu

2-NLS kaybı gelişmektedir.

Mutant NPM1'de oluşan ilave NES motifi sitoplazmik birikim için katkı sağlamaktadır. 288. ve 290. pozisyonda bulunan aromatik aminoasitlerin NPM1'nin nükleolar yerleşimini zorlaması nedeniyle NES motifleri tek başına nükleer eksport için yetersizdir. NPM1 mutantlarının %95'inden fazlasında 288 ve 290. pozisyonda bulunan triptofan rezidüleri bulunmamaktadır. Arta kalan yaklaşık %4'lük mutasyonda ise yalnızca 290. pozisyondaki triptofan rezidüsünün kaybı görülmektedir. Ancak tüm lösemik mutant proteinler sitoplazmada yerleşim göstermektedir. Bu durum, 288. pozisyonda bulunan triptofanın nükleolar yerleşim için yeterli olmadığının göstergesidir. Triptofanların ikisinin de kaybıyla sonuçlanan mutasyonlar en sık rastlanan NES motifi ile ilişkilendirilirken (L-xxx-V-xx-V-x-L), yalnızca 290. pozisyondaki triptofanın kaybıyla sonuçlanan mutasyonlar NES motifinin varyantlarının oluşumu ile sonuçlanır. İkinci pozisyondaki valinin lösin, fenilalanin, sistein veya metiyoninle yerdeğiştirmesi sonucu oluşan NES motifleri bu varyantlara örnek verilebilir (182).

Ayrıca mutant NPM proteinlerinin, yaban tip NPM proteinlerini nükleolusdan nükleoplazmaya oradan da sitoplazmaya taşıdığı bildirilmiştir. NPM mutantları korunmuş N terminal dimerizasyon domaini aracılığıyla yaban NPM proteinleri ile heterodimerler oluşturur ve yaban tip proteinleri de beraberinde sitoplazmaya çıkarır (Şekil 2.16). Bununla birlikte NPM'ye bağlı halde bulunan ARF de mutasyonlar sonucunda sitoplazmaya çıkar (182).



Şekil 2.16 Yaban tip ve mutant tip NPM1'in nükleostoplazmik trafiği, Brunangelo Falini ve ark. (117)'den alınmıştır.
A-Yaban tip NPM'nin stoplazmadan nukleolusa eksportu şematize edilmektedir. Mor daireler; zayıf fizyoloji NES motifi Kırmızı dairaler; C ucundaki iki triptofan olarak gösterilmiştir. Çekirdek ve sitoplazma arasındaki NPM trafiğinin düzenlenmesi çoğunlukla NLS ve NES motifleri aracılığıyla oluşmaktadır. B-Mutant NPM'nin nukleolustan sitoplazmaya geçişi. Mutant NPM1 sitoplazmada birikir ve ek bir NES motifi oluşturmaktadır. Gri daireler; ek NES motifini göstermektedir ve Crm1 aracılı nüklear eksport için kullanılabilir. Mavi yıldızlar; Mutasyonda bozulmuş nüklear lokalizasyonundaki triptofonlar gösterilmiştir.

2.4.4.4. *NPM1* Mutasyonlarının Sitogenetik, Moleküler ve Klinik Özellikleri

NPM1 mutasyonları ağırlıklı olarak NK-AML grubunda gözlenmektedir. Yönlendirici bir bulgu olarak kromozomal yeniden düzenlenmelerin bulunmaması nedeniyle (NK-AML'lerde) *NPM1* mutasyonlarının tanımlanmasının geç olabileceği ileri sürülmektedir. Her ne kadar mutasyon tipini gösteremese de bu hasta grubunda sitoplazmik NPM'nin immunohistokimyasal olarak belirlenmesinin bir tarama testi gibi kullanılabileceğini savunan araştırmacılar vardır (117).

Sitogenetik açıdan normal olan AML vakalarında çeşitli gen mutasyonları tanımlanmıştır. *FLT3* gen mutasyonları da normal karyotipli AML vakalarında oldukça sık rastlanan değişimlerdendir. *NPM1* gen mutasyonlarının görülme sıklığının, *FLT3* mutasyonlarının görülme sıklığı ile ilişkilendirilmesi dikkat çekicidir. *FLT3-ITD* mutasyonları, *NPM1* mutasyonunu taşıyan normal karyotipli AML vakalarında, *NPM1* mutasyonunu taşımayan normal karyotipli AML vakalarına oranla iki kat daha sık görülür (78).

Birçok çalışma NPM1 mutasyonunun AML'de öncü genetik lezyon olduğunu göstermektedir. İlk tanıdan yıllar sonra gelişen relapslarda, birden fazla relaps gösteren hastalarda ve ekstramedüller tutulumla giden relapslarda bu mutasyonun stabil olarak gösterildiği bir çok çalışma vardır. Ayrıca *NPM1* mutasyonu taşıyan AML hastalarının %40'ında *FLT3*-ITD mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Tedaviye yanıtla birlikte *FLT3*-ITD ya da TKD mutasyonları kaybolurken, *NPM1* mutasyonlarının bu iki mutasyona göre devamlılığının gözlendiği bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada erişkin AML'de görülme oranına benzer şekilde pediatrik AML hastalarında da NPMc+ AML hastalarının %40'ında *FLT3*-ITD mutasyonu bulunduğu gösterilmiştir (164, 169, 171, 172, 173, 174, 179, 180).

Bazı çalışmalarda NPM1 mutasyonu ile *FLT3*-TKD nokta mutasyonları arasında da pozitif korelasyon gösterilmiştir. Geniş bir çalışma grubunda *NPM1* mutasyonu olan hastaların %8,8'inde *FLT3*-TKD mutasyonu saptandığı ve bu oranın diğer hastalardan (%4,8) anlamlı olarak fazla olduğu bildirilmiştir (162).

Normal karyotipe sahip 2 AML olgusunda yapılan tüm genom dizilemesi sonucunda *NPM1* mutasyonu dışında tekrar eden bir lezyon tanımlanmadığı raporlanmıştır. *NPM1* ve *IDH1* gen mutasyonunun birlikte görüldüğü bir AML hastasında görülen relapsta yapılan incelemede *NPM1* mutasyonunun devam ettiği ancak *IDH1* mutasyonunun kaybolduğu rapor edilmiştir. Bu bulguların hepsi *NPM1* mutasyonunun AML gelişiminde öncü bir genetik değişiklik olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca *KIT, NRAS*, *P53* ve *MLL-PTD* mutasyonlarının *NPM1* mutasyonu ile az oranda birlikte olduğu gösterilmiştir (164, 169, 178). *CEBPA*

mutasyon sıklığının *NPM1*'in mutasyon taşıyan ya da taşımayan NK-AML olgularında farklılık göstermediği rapor edilmiştir. Ancak bazı araştırmalarda *NPM1* mutasyonlu hastalarda *CEBPA* mutasyonlarının önemli ölçüde daha az sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir (173,168). Bazı çalışmalarda *NPM1* ve *NRAS* mutasyonları arasında anlamlı birlikteliğin olmadığının gösterilmesine karşın, bir çalışmada negatif, başka bir çalışmada ise pozitif korelasyondan söz edilmektedir (162). AML'de görülen *p53* ve *NRAS* mutasyonları genellikle ikincil genetik değişiklik olarak tanımlanmaktadır (182). Son yıllarda *NPM1* ile *PTN11* mutasyonunun ilişkisi de araştırılmaya başlanmıştır. Erişkin AML hastalarında bu iki mutasyonun sıklıkla birlikte olduğu bildirilmiştir (162).

Farklı morfolojik gruplarla ilişkili olmasına karşın, NPMc+ AML çoğunlukla M4 ve M5 ile birlikte görülür. İmmunohistokimyasal olarak NPMc+ AML olgularının %95'inden fazlasında CD34 negatifliği gösterilmiştir. Bu bulgulara ek olarak; *NPM1* mutasyonu olan blastlarda CD34 negatifliğinin yanısıra CD133'ün de daha az ekspresyonu saptanmıştır (164, 169, 173, 175, 178). NPMc+ AML olguları ile ilgili bir başka çarpıcı özellik, *HOX* ve *TALE* genleri gibi homeobox bölgesi içeren transkripsiyon faktörü ailesinin birçok üyesinin aktivasyonunun görülmesidir. Bu genlerin bir kısmının hematopoetik gelişim ve lökomogenezis sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir. NPMc+ AML-NK vakaları ile minör kromozomal anomali taşıyanların benzer moleküler değişiklikler gösterdiği bildirilmektedir. Bu bulgu NPMc+AML'nin lösemiler içinde farklı bir alt grup olarak tanımlanması görüşünü desteklemektedir. Görülen minör kromozomal anomaliler sıklıkla *NPM1* mutasyonu ile birliktedir ve sekonder olarak geliştiği düşünülmektedir (117).

NPM1 mutasyonları AML'nin tüm FAB morfolojik alt tiplerinde bulunmakla beraber *NPM1* mutasyonlu M3 AML vakası nadir olarak gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda M3 AML'li sadece bir hastanın *NPM1* mutasyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Yetişkinlerle yapılan çalışmalarda *NPM1* mutasyonları büyük sıklıkla M4 ve M5 AML tipleri ile birliktedir (164, 169, 171, 173, 174). Çocuklarda bu dağılım biraz farklıdır. AML'li 107 çocukla yapılmış bir araştırmada *NPM1* mutasyonları M1 grubunda 1/21, M2 grubunda 2/19 ve M6 grubunda 1/3oranında

saptanmıştır. Bu çalışmada M5 grubunda olan çocuk hastalarda (0/18) *NPM1* mutasyonu saptanmamıştır (175). Diğer pediyatrik çalışmalarda da M5 AML hastalarında *NPM1* mutasyonlarının bulunmadığı gösterilmiştir (169, 180).

NPM1 mutasyonları olan olgularda daha yüksek beyaz kan hücresi sayımı ve tanıda daha yüksek blast yüzdesi gözlenmektedir. AML-NK olgularda NPMc+ hastalardaki trombosit miktarının NPMc- hastalara göre belirgin oranda fazla olduğu gösterilmiştir (164, 169, 171, 173, 174, 178). Bu klinik gözlemi destekler biçimde; K562 hücrelerinin *NPM1* mutant transfeksiyonundan sonra megakaryositik diferansiasyon yeteneğinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca NPMc+ AML-NK olguların, *NPM1* mutasyonları olmayan AML-NK olgularına kıyasla daha fazla ekstramedüller (gingival hiperplazi ve lenfadenopati) tutulumla ilişkili olduğu gösterilmiştir (178). Ekstramedüller tutulum AML hastaları içinde en sık M4 ve M5 alt grublarında görülmektedir. NPMc+ AML-NK olgularında ekstramedüller tutulumun fazla olması zaten bu alt gruplarda bu mutasyonun fazla görülmesi ile ilişkilendirilmiştir (182, 184).

Sonuç olarak, eşlik eden bir *FLT3-ITD* olmadan *NPM1* mutasyonları, olumlu prognozlu AML-NK hastalarının bir alt grubunu tanımlamaktadır. 60 yaşın altında olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %60 olarak açıklanmaktadır. *NPM1* mutasyonu olan *FLT3*-ITD–negatif hastalarda allojenik kök hücre transplantasyonunun da daha iyi cevap verdiği bildirilmiştir. Bu kapsamda, AML-NK'lı hastalarda prognostik etkisi bilinen *NPM1*, *FLT3-ITD* ve *CEBPA* mutasyonlarının eş zamanlı analizleri önerilmektedir.

Birçok erişkin hastada yapılan çalışmada NK-AML hastalarda, *NPM1* mutasyonu olan ancak *FLT3*-ITD mutasyonu olmayan olguların (NPMc+/ITD-) CR görülme oranlarının, *NPM* mutasyonu taşımayan ancak *FLT3*-ITD mutasyonu olan hastalara (NPMc-/ITD+) göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Erişkin 1217 hastayla yürütülmüş olan bir araştırmada NPMc+/ITD- olan hastalar için CR görülme oranı %94 iken bu oran her iki mutasyonu da taşıyan hastalarda %78 ve her iki mutasyonu da taşımayanlarda ise %87 olarak bildirilmiştir. Ayrıca, NPMc+/ITD- erişkin hastalarda

EFS ve DFS oranlarının da öteki hasta gruplarına göre önemli ölçüde daha iyi olduğu belirtilmiştir. Aynı grupta nüks olmadan sağ kalım (RFS) oranının da diğer NK AML hastalarına kıyasla daha iyi olduğu gösterilmiştir (164, 169, 174, 178, 246).

Mutant *NPM1* bulunan AML olgularının kemoterapi indüklenmesine yüksek ölçüde cevap verdiği bildirilmiştir. Hastaların yaklaşık %80'i tedavinin başlamasından 16 gün kadar erken sürede lösemik hücrelerin tasfiyesiyle tam gerileme göstermeyi başarmıştır. Altında yatan mekanizma bilinmemekle birlikte *NPM1* mutasyonu olan AML olgularındaki kemoduyarlılığının muhtemelen nukleofosminin çekirdekçikten sitoplazmaya atipik dislokasyonuyla ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. *NPM1* mutasyonlarının prognostik önemi asıl olarak normal karyotipe sahip AML'lerde araştırılmıştır. 60 yaşından genç olan hastalar beraberinde eşlik eden bir *FLT3*-ITD mutasyonu olmadığı durumda, t(8;21) veya inv(16) taşıyan AML kategorilerine benzer şekilde 'iyi-risk' grubu olarak tanımlanmıştır(185).

Pediyatrik çalışmalarda, CR oranının *NPM1* mutasyonları olan veya olmayan hastalar için önemli farklılık göstermediği bildirilmiştir. Ancak, bu durum *NPM1* mutasyonlu hasta sayısının az olması ve AML'li yetişkinlere oranla çocuklardaki toplam CR oranının göreceli olarak yüksek olmasıyla açıklanmaktadır. Bununla birlikte pediyatrik hastalarla yapılan açalışmalarda, *NPM1* mutasyonu olanlarda (%50) yaban tip *NPM*'li çocuklar (%33) göre daha iyi beş yıllık EFS olduğu bildirilmektedir (175,180).

Hollink ve arkadaşları NK-AML'li olgulara odaklanarak çocukluk çağı AML'sinde *NPM1* mutasyonlarının sıklığı ve prognostik önemini araştırmışlardır. 297 pediyatrik AML hastasında yaptıkları çalışmada benzer şekilde 5 yıllık OS ve EFS sonuçlarının *NPM1* mutasyonu taşıyan hastalarda taşımayanlara göre belirgin şekilde iyi bulmuştur. Bu çalışmada *NPM1* mutasyonlarının özellikle NK-AML'nin bir kısmında ve çocukluk çağı AML'sinde olumlu prognostik etki sunduğu sonucuna varılmıştır. *NPM1* mutasyonlarının EFS üzerinde bağımsız prognostik etkiye sahip olduğu, OS üzerinde ise önemli daha iyi bir sonuç elde edilemediği tespit edilmiştir.

Yine bu çalışmada *FLT3*/ITD durumunun mutasyonlu hastaların sağ kalımında önemli bir etkisi olmadığını ve yaban tip *NPM1*'li hastalarda sadece hastalığın prognozu açısından önemli olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte yapılan bu çalışmada NPMc+AML'li hasta sayısı 25, hem *NPM1* mutasyonu hem de *FLT3*/ITD mutasyonu taşıyan hasta sayısı 10 ile sınırlı olduğu için bu bulguların dikkatli bir biçimde yorumlanması gerekmektedir (179, 180).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmaya Alınan Hasta örnekleri

Bu tez çalışması kapsamında; 2007-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (A.Ü.T.F.) Pediatrik Hematoloji ve Pediatrik Onkoloji kliniklerinden; sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik testlerin çalışılması için bölümümüze gönderilen AML tanısı almış hastalara ait kemik iliği veya periferik kan örneklerinden oluşan RNA/DNA'lar kullanıldı.

Arşivde bulunan hasta cDNA'ları, RNA'ları ve DNA'ları yeterli ise bu örnekler kullanıldı. cDNA yetersiz olan olgular için RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Kanı ya da kemik iliği olan olgularda kullanılacak hedefe göre RNA, cDNA ya da DNA sentezi yapıldı.

Çalışmaya A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (no:41-875) 28.12.2011 tarihli ve 29753 sayılı yazısı ile onay alınarak başlanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

➲*MagNA Pure LC 2.0 (Roche Applied Science)*
➲*Mastercycler Gradient (Eppendorf)*
➲*Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452 (Consort, Belgium)*
➲*Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.)*
➲*Gel Logic 200 Imaging System (Kodak)*
➲*Autovortex Mixer SA2 (Stuart Scientific)*
➲*3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

➲*FLT3-geni ITD mutasyonuna özgü bir çift primer*

➲*FLT3-geni TKD mutasyonuna özgü bir çift primer*

➲*NPM1 geni ekzon 12 mutasyonuna özgü bir çift primer*

➲dATP, dCTP, dGTP, dTTP

➲5x TBE

➲1x TBE

➲*Tris base*

➲*Borik asit*

➲*EDTA*

➲*NaOH tablet*

➲*Ethidium Bromide*

➲*6X yükleme tamponu*

➲*Bromfenol mavisi*

➲*Ksilen siyanol*

➲*Gliserol*

➲*Taq polimeraz (5 U /* µl *Fermantas)*

➲ *EcoRV restriksiyon enzimi*

➲*Transcriptor First Strand cDNA Syntethesis Kit (Roche)*

➲*High Pur RNA isolation kit (Roche)*

➲*pUC Mix Marker, 8 (Catalog No. SM0301, Fermentas)*

➲*Sephadex® G-50 medium* (*Sigma-Aldrich*)

➲ *HOT FIREPol® DNA Polymerase* (*Solis BioDyne*)

➲*Buffer B1/B2* (*Solis BioDyne*)

➲*MgCl2*

➲*DMSO*

➲*Agaroz*

➲*ExoSAP-IT* (*GML*)

➲*ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction mix* (*Applied Biosystems*)

3.2.3. Solüsyonların Hazırlanması

➲dNTP miks çalışma solüsyonu: 100mM'lık dATP, dCTP, dGTP, dTTP solüsyonlarının her birinden 50µL alınarak 25mM'lık bir karışım hazırlanmıştır. 25mM'lık karışımdan alınan 20µL, 80µL steril distile su ile karıştırılarak 5mM konsantrasyonda çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon -20°C'de saklanmıştır.

➲5x TBE (1 L): 54gr Tris base, 27,5gr Borik asit ve 20mL 0,5mM EDTA karıştırılarak dH2O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon + 4°C'de saklanmıştır.

➲1x TBE: 5x TBE solüsyonu 1:4 oranında dH2O sulandırılarak elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon + 4 °C'de saklanmıştır.

➲0,5 M EDTA (100 mL): 18,61gr EDTA ve 2gr NaOH tableti, 80mL distile su içinde çözülmüştür. pH:8,0 yapılarak dH2O ile hacim 100mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de saklanmıştır.

➲*Ethidium Bromide* (10mL): 100mgr *Ethidium Bromide*, 10mL distile su içinde vorteks ile karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de saklanmıştır.

➲6x yükleme tamponu: 0,025gr bromfenol mavisi, 0,025gr ksilen siyanol ve 0,3mL gliserol karıştırılarak dH2O ile 1mL'ye tamamlanmıştır.

➲Sefadeks: 14mL steril distile suya, 1gr *Sephadex® G-50 medium (Sigma-Aldrich)* eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sefadeks, ilk kullanımdan önce 30 dakika bekletilmiştir. + 4°C'de saklanmıştır.

3.2.4. DNA izolasyonu

Önceden hastalardan alınan kemik iliği ya da periferik kan örneklerinden, gDNA izolasyonu *MagNA Pure LC* 2.0 cihazı kullanılarak otomatik olarak yapılmıştır. Arşivlenen gDNA örnekleri de aynı yöntemle rutin olarak elde edilmiş ve -20°C'de saklanmış örneklerdir.

3.2.5. RNA izolasyonu

Arşivlenen cDNA'sı yeterli olmayan ve kanı ya da kemik iliği bulunan örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu *High Pure RNA Isolation kit* kullanılarak protokole uygun olarak yapıldı.

Arşivlenen RNA'lar da aynı protokolle rutin olarak elde edilen ve -80 C'de saklanan örneklerdir.

3.2.6. cDNA sentezi

cDNA sentezi, arşivlenen RNA'lardan ya da izole edilen RNA'lardan *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)* kullanılarak kullanıcı kitapçığında belirtildiği şekilde sentezlendi:

1-Her bir hasta için aşağıdaki karışım ayrı olarak hazırlandı.

Tablo 3.1 cDNA sentez içeriği

2µl Random Hexamer Primer	
1µl dH_2O	
4µl Transcriptase Buffer	
0.5µl Rnase inhibitör	10 µl karışım
2µl dNTP mix	
0.5µl reverse transkriptaz	

2-Hazırlanan 10µl karışıma 10µl RNA eklenerek belirtilen reaksiyon koşullarında (Tablo3.2.) PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.2 cDNA PZR koşulları

PZR Kondisyon Koşulları	
25ºC'de	10 dakika,
50ºC'de	1 saat
85ºC'de	5 dakika

3.2.7. Agaroz jel elektroforezi

%3'lük agaroz jel hazırlandı.

• 3gr toz agaroz hassas terazide tartıldı. 100ml 1X TBE solüsyonu içerisine eklenerek çözelti mikrodalga fırında orta (*medium*) ayarda 1,5 dakika ısıtılarak, çözünmesi sağlandı.

• Çeker ocak altında, üzerine 1,5µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Örnek sayısına uygun taraklar jel kabına yerleştirildi. Jel kabına hava kabarcığı bırakmayacak şekilde döküldü ve jelin katılaşması için beklendi. Taraklar yavaşça çıkartıldı. Katılaşan jel, içerisinde 1X TBE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

• Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi (2 µl/10 µl).

• *pUC Mix Marker* kullanıldı. Örnekler yüklendikten sonra 90 volt elektrik akımında 90dk- süre ile yürütüldü.

Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, *Kodak 1D Image Analysis Software* (*Rochester, New York*) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların boyları, *pUC Mix Marker, 8 (Catalog No. SM0301, Fermentas)* kullanılarak değerlendirildi.

3.2.8. *FLT3* geni ITD mutasyon bölgesinin PZR ile incelenmesi

FLT3 geni ITD mutasyonunu incelemek için Tablo3.3.'de verilen mazemelerden belirtilen miktarlarda alınıp 50µl olacak şekilde bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3.3 *FLT3* geni ITD mutasyonu PZR içeriği

	Miktar
dH2O	23,1µl
Buffer (10X)	5 µl
MgCl2 (25mM)	3 µl
dNTP (5mM)	2 µl
Primer (F) (10 pmol/ µl)	5 µl
Primer (R) 10 pmol/ µl	5 µl
Taq polimeraz (5 U/ µl)	1 µl
gDNA /cDNA	5 µl
DMSO	0,9 µl
Toplam	50 µl

PZR'de kullanılan primerlerin dizisi Tablo 3.4'de, gDNA'da bağlanma yerleri Şekil 3.1'de, cDNA'da bağlanma yerleri Şekil 3.2'de verilmiştir. Primerler cDNA için hazırlanmış olmakla birlikte, Forward primerinin tamamı ekzon 14, Reverse primerinin büyük kısmı ekzon 15 içinde kalması nedeniyle gDNA'dan da ürün alınabilmiştir.

Tablo 3.4 *FLT3* Geni ITD Mutasyonu İçin Kullanılan Primerler ve PZR ürün Boyutları

Forward: AGCAATTTAGGTATGAAAGCC
Reverse: TTTCTTTCAGCATTTTGACGGCA
cDNA için PZR ürün boyu: 244bç
gDNA için PZR ürün boyu: 328bç

66361 atcatttcat ctctgagca atttaggtat gaaagccagc tacagatggt acaggtgacc
66421 ggctcctcag ataatgagta cttctacgtt gatttcagag aatatgaata tgatctcaaa
66481 tgggagtttc caagagaaaa tttagagttt ggtaagaatg gaatgtgcca aatgtttctg
66541 cagcatttct tttccattgg aaaatcttta aaatgcacgt actcaccatt tgtctttgca
66601 ggaaggtac taggatcagg tgcttttgga aaagtgatga acgcaacagc ttatggaatt
66661 agcaaaacag gagtctcaat ccaggttgcc gtcaaaatgc tgaaaggtac agtatagtgg
66721 aaggacagca acaaagatgc acaaaaatgg gaggcacagt ttcccaccca tgccttcttc

Kırmızı: Primerlerin bağlanma yerleri

Sarı: Ekzon 14 bölgesi (66.379-66.511)

Mavi: Ekzon 15 bölgesi(66.602-66.706)

Şekil 3.1 *FLT3*-ITD gDNA ekzon14-15 ve Primerlerin bağlanma yerleri.

1681 ccccttccct ttcatccaag acaacatctc attctatgca acaattggtg tttgtctcct
1741 cttcattgtc gttttaaccc tgctaatttg tcacaagtac aaaaagcaat ttaggtatga
1801 aagccagcta cagatggtac aggtgaccgg ctcctcagat aatgagtact tctacgttga
1861 tttcagagaa tatgaatatg atctcaaatg ggagtttcca agagaaaatt tagagtttgg
1921 gaaggtacta ggatcaggtg cttttggaaa agtgatgaac gcaacagctt atggaattag
1981 caaaacagga gtctcaatcc aggttgccgt caaaatgctg aaagaaaaag cagacagctc

Kırmızı: Primerlerin bağlanma yerleri

Şekil 3.2 *FLT3*-ITD Mutasyonu İçin Kullanılan (cDNA) Primerler

FLT3-ITD mutasyonu için Tablo 3.5'de belirtilen koşullarda PZR uygulandı.

Tablo 3.5 *FLT3* geni ITD mutasyon bölgesi PZR koşulları

95 °C	12 dk	
94 °C	30 sn	35döngü
59 °C	1 dk	
72 °C	1dk	
72 °C	10 dk	
4 °C	∞	

3.2.9. *FLT3* Geni TKD (D835) Mutasyon Bölgesinin RFLP ile İncelenmesi

FLT3 geni TKD mutasyonu için toplam hacim 50µl olacak şekilde Tablo 3.6'da verilen malzemelerden belirtilen miktarlarda konarak PZR için karışım hazırlandı.

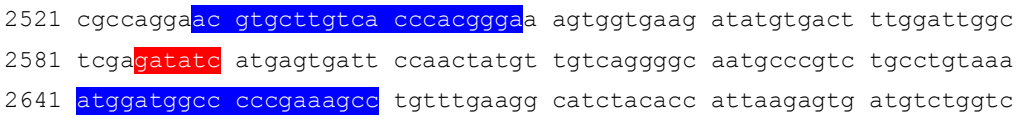
Tablo 3.6 *FLT3* geni D835 nokta mutasyonu PZR içeriği

	Miktar
dH2O	28,1 µl
Buffer (10X)	5 µl
MgCl2 (25mM)	3 µl
dNTP (5mM)	2µl
Primer (F) (10 pmol/ µl)	2.5 µl
Primer (R) (10 pmol / µl)	2.5 µl
Taq polimeraz (5 U/ µl)	1 µl
DMSO	0,9 µl
cDNA	5 µl
Toplam	50 µl

FLT3 D835 nokta mutasyonu için hazırlanan PZR'da kullanılan primerler Tablo 3.7'de ve cDNA'da bağlanma yerleri Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7 *FLT3* Geni TKD Primerleri

Forward: ACGTGCTTGTCACCCACGGGA
Reverse: GGCTTTCGGGGGCCATCCAT
PZR ürün boyu: 132 bç



Mavi: Primerlerin bağlanma yerleri

Kırmızı: EcoRV enziminin etki yeri

Şekil 3.3 FLT3-TKD mutasyonları için kullanılan (cDNA) Primerler

Hazırlanan reaksiyon karışımı ile Tablo 3.8'de belirtilen koşullarda PZR uygulandı.

Tablo 3.8 *FLT3*/TKD PZR koşulları

FLT3 geni PZR koşulları:		
95 °C	12 dk	
94 °C	30 sn	
59 °C	1 dk	35 döngü
72 °C	2dk	
72 °C	10 dk	
4 °C	∞	

Agaroz jelde 132 bç boyutunda ürün alınan örnekler ile Tablo 3.9'da belirtilen reaksiyon içeriği hazırlanarak, Eco RV rekstriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonuna konuldu. Bu amaçla reaksiyon karışımı 37 °C'de 16 saat inkübe edildi.

Tablo 3.9 *FLT3* geni TKD Mutasyonu İçin Yapılan Enzim Kesiminin İçeriği

DH2O	11 ML
10XBuffer	3 µl
EcoRV Rekstriksiyon enzimi	1 µl
PZR ürünü	15 µl
Toplam	30 µl

Kesim sonrası ürünler (*pUC Mix Marker* kullanılarak) %3'lük agoroz jel elektroferezi ile görüntülendi. EcoRV restriksiyon enzimi 'GATATC' tanıma bölgesinden kesim yapmaktadır (Şekil 3.4). Kesime uğrayan yaban tip örneklerde 56 ve 76 baz çiftlik iki bant elde edildi (Şekil 4.6).

3.2.10. *NPM1* geni 12. ekzon Mutasyonlarının Dizi Analizi ile İncelenmesi

NPM1 12. ekzon mutasyonlarının incelenebilmesi için ilk olarak uygun primerler kullanılarak Tablo 3.10'da belirtilen miktarlarda PZR karışımı hazırlandı.

Tablo 3.10 *NPM1* geni 12. ekzon PZR içeriği

gDNA	5µl
Primerler (10pmol/µl)	0,5µl
dNTP (5mM)	1,25µl
MgCl2 (25mM)	1.5µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	1 µl
Tampon (-MgCl2 ,10X)	2,5µl
dH2O	12,75 µl
Toplam Hacim	25 µl

PZR'de kullanılan primerlerin dizisi Tablo 3.11 ve gDNA'da bağlanma yerleri Şekil 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.11 *NPM* geni Ekzon 12 Mutasyonları İçin PZR Primerleri

Forward: 5' TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA3'
Reverse: 5' AACATTTATCAAACACGGTAGGGAA3'
PZR Ürün boyu: 285 bç

```
22621 tcacattttt atgactgatt aaagtgtttg gaattaaatt acatctgagt ataaattttc
22681 ttggagtcat atctttatct agagttaact ctctggtggt aatgaaagaa atagatgttg
22741 aactatgcaa agagacattt aatttattga tgtctatgaa gtgttgtggt tccttaacca
22801 catttctttt ttttttttc caggctattc aagatctctg gcagtggagg aagtctcttt
22861 aagaaaatag tttaaacaat ttgttaaaaa attttccgtc ttatttcatt tctgtaacag
22921 ttgatatctg gctgtccttt ttataatgca gagtgagaac tttccctacc gtgtttgata
22981 aatgttgtcc aggttctatt gccaagaatg tgttgtccaa aatgcctgtt tagtttttaa
23041 agatggaact ccacccttg cttggtttta agtatgtatg gaatgttatg ataggacata
23101 gtagtagcgg tggtcagaca tggaaatggt ggggagacaa aaatatacat gtgaaataaa
23161 actcagtatt ttaataaagt agcacggttt ctattgactt atttaactgc tttatacttt
```

Mavi: Primerlerin Bağlanma yerleri

Kırmızı: Mutasyonların en sık olduğu bölge

Ekzon 12(yeşil)bölgesi: 22824—23181

Şekil 3.4 *NPM1* geni ekzon 12 mutasyonları için kullanılan (gDNA) primerler

Hazırlanan reaksiyon karışımı ile Tablo 3.12'de belirtilen koşullarda PZR uygulandı.

Tablo 3.12 *NPM* Geni PZR Koşulları:

PZR KOŞULLARI:		
95 °C	5 dk	
94 °C	30 sn	
58 °C	1 dk	40 döngü
72 °C	1dk	
72 °C	10 dk	
4 °C	∞	

PZR'da istenilen ürün elde edilen örneklerin temizleme işlemi için *ExoSAP-IT* (GML) kullanılmıştır. Protokol doğrultusunda 5µL PZR ürünü, 2µl *ExoSAP-IT* reaktifiyle karıştırılmıştır. Karışım 37°C' de 15 dakika ve sonrasında 80°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

PZR ürünleri temizlendikten sonra sekans reaksiyonu için Tablo 3.13'te dizisi verilen primerler kullanılarak Tablo 3.14'te belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve sekans PZR reaksiyonu uygulanmıştır.

Tablo 3.13 Sekans Primerleri

M13 F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M13 R5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tablo 3.14 Sekans PZR İçeriği

ABI Prism ® Bigdye™ Terminator (Product P/N: 4336923, Applied Biosystems)	2 µl
ABI Prism ® Bigdye™ Terminator v1.1, v3.1 5 X Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	2 µl
Forward veya *reverse* primer (1 pmol/ l)	2 µl
Temizlenmiş PZR ürünü	2 µl
dH2O	2 µl
Toplam	10 µl

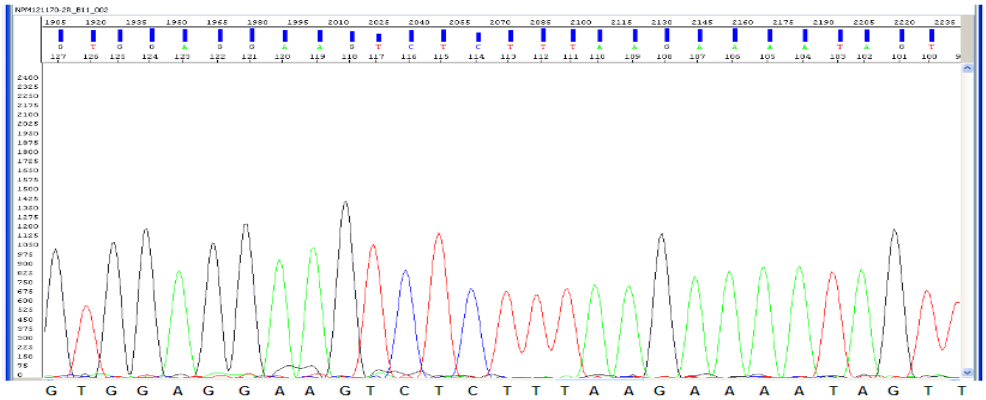
Hazırlanan reaksiyon içeriği ile Tablo 3.15'de belirtilen koşullarda dizi analizi için PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.15 *NPM1* geni 12. ekzon dizi analizi PZR koşulları

NPM Geni Sekans PZR Koşulları:		
96 °C	1 dk	
96 °C	30 sn	25 döngü
50 °C	5sn	
60 °C	4dk	
4 °C	∞	

Dizi analizi için yapılan PZR sonucu elde edilen ürün sefadeks kullanılarak temizlendi. Bu amaçla Spin kolonlara 700µL sefadeks aktarılarak 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştiridi. Bundan sonra sekans PZR sonrası elde edilen 10µL'lik PZR ürünleri, spin kolonlardaki sefadeksin orta kısmını bırakıldı. Spin kolonlar, 5200 rpm'de 2 dakika tekrar santrifüj edilerek ürün temizleme işlemi tamamlandı.

Dizi analizi, *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* cihazı kullanılarak yapıldı. Temizlenen 10µL'lik sekans PZR ürünleri ''*96-Well Plate''* üzerindeki kuyulara hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi. ''*Plate''* bileşenleri doğru bir şekilde bir araya getirilerek *autosampler* üzerinde B pozisyonuna yerleştirildi. *UltraSeq36_POP7 run module* ve *3130POP7-BDTv3-KB-Denovo-v5.2* analiz protokolü kullanılarak elektroforez gerçekleştirildi. Mutasyon değerlendirmesi için *SeqScape version 2.7* ve *Sequencing Analysis version 5.1* (*Windows® XP ve 2000*) (Şekil 3.5) yazılımları kullanıldı.



Şekil 3.5 Yaban tip *NPM1* dizi analizi görüntüsü

3.3 İstatistiksel Analiz

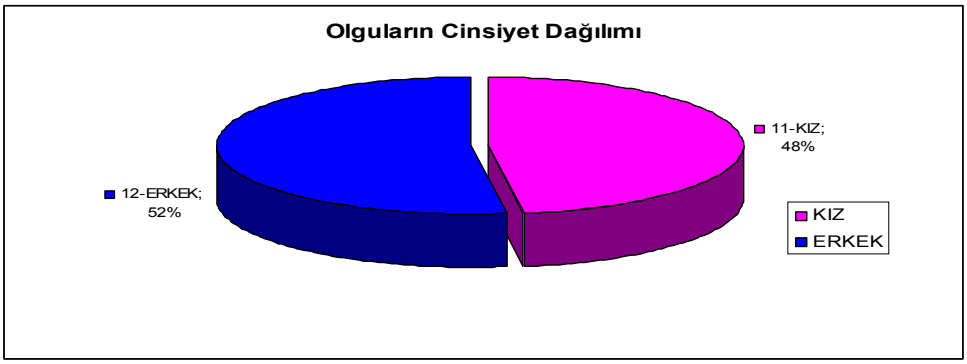
Hasta verileri cinsiyet, yaş, lökosit, hemoglobin, trombosit, FAB sınıflaması, *SPSS*, *PASW Statistics version 18.0* programı kullanılarak istatistiksel olarak incelendi. Elde edilen veriler ki-kare testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortalama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AML Tanılı Hastaların Genel Özellikleri

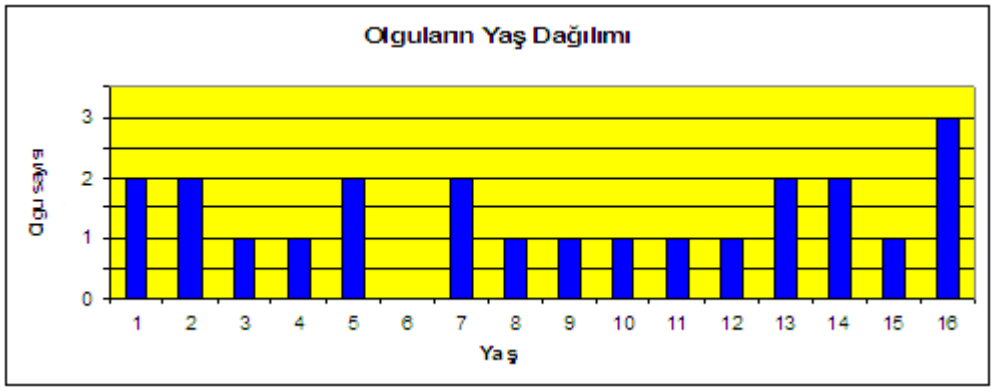
Bu çalışmada, çocukluk çağı AML hastalarında *FLT3* ve *NPM1* geni mutasyonlarını saptamak, bu mutasyonların sıklığını belirlemek ve diğer sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçlarıyla birlikte klinik önemini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Yeni tanı veya relaps akut myeloid lösemi tanılı 23 hastanın periferik kan/kemik iliği örneklerinde çalışma yapıldı. Çalışma grubundaki hastaların yaş aralığı 0-16'dır (ort.:8,869 ± 5,251), 12 erkek (%52,17) ve 11 kız (%42,83) hasta bulunmaktadır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Çalışma grubundaki hastaların cinsiyete göre dağılımları

Çalışmaya alınan hastaların yaşlarına göre dağılımları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Hastaların yaşlarına göre dağılımları

A.Ü.T.F. Pediyatrik Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı kliniğinde yatan hastaların tanı veya relaps anında elimize gelen periferik kan/kemik iliği örneklerinin incelenmesi ile eş zamanlı, rutin olarak yapılan Hb, lökosit ve trombosit sayıları Tablo 4.1'de belirtildi. Hastaların kan değeri karşılaştırıldığında istatiksel bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

AML kemoterapisi yoğun indüksiyon tedavisinde (ADE10, ADE8) konsolidasyon 3 kür daha uygulanıp riske göre tedavi yönlendirilir.

→Eğer hasta düşük risk grubunda ise KİT yapılmadan, 2 kür daha kemoterapi ile devam edilir.

→Hasta orta risk grubunda ise aile içi verici varsa nakil, yoksa 2 kür daha kematetapi uygulanır.

→Hasta yüksek risk grubunda ise aile içi veya akraba dışı verici varsa nakil uygulanmaktadır.

AML tanılı bu grupdaki hastalardan 10 tanesi (%43,47) izlem sırasında eksitus oldu (olgu1, olgu 3, olgu 4, olgu 5, olgu 12, olgu 13, olgu 15, olgu 19 ve olgu 20, olgu 21). Bu olguların hepsi tedavi protokolüne göre ilk önce KT almışlardır (Tablo 4.1).

Çalışma grubumuzda sadace kemoterapi alıp yaşayan 10 olgu (%52,17) mevcuttur (olgu 6, olgu 8, olgu 9, olgu 11, olgu 14, olgu 16, olgu 17, olgu 18, olgu 22 ve olgu 23).

Takipleri sırasında Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu (HKHT) uygulanmadan relaps sonrasında eksitus olan 6 olgu (%26,08) mevcuttur (olgu 4, olgu 5, olgu 13, olgu 15, olgu 19, olgu 20).

Üç olgu KT+HKHT uygulaması sonrasında yaşamaktadır (%13,04) (olgu 2, olgu 7, olgu 10).

Takipteki hastaların KT+HKHT uygulaması sonra relaps olan ve eksitus olan 3 olgu (%13,04) mevcuttur (olgu 3, olgu 12, olgu 21). Olgu 1 ise HKHT yapılmış ve

nakil sırasında eksitus olmuştur.

Çalışma grubundaki 7 hastanın (olgu 2, olgu 3, olgu 4, olgu 5, olgu15, olgu 21, olgu 22) saklanan arşiv materyallerinde ilk tanı örneklerinde yeterli cDNA kalmadığı için relaps tarihlerindeki örnekleri kullanıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 1

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB/WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı (mm3)	Takip Sırasındaki Durumu
1	13y	E	**17.03.2009-**	Yeni tanı	M6	COG AAML0531	6,6	7900	36000	**Hasta 5 kür KT sonnrası MDS'a döndü, rölaps oldu, akraba dışı HKHT yapıldı, nakil sırasında hastalık tekrarlamadan EKSİTUS oldu.**
2	14y	K	**13.09.2011**	Relaps	M4	Protokol 3 (farklı)	7,7	2900	73000	**Daha öncesinde AML, 5 kür KT sonrası MDS daha sonra AML, AML nedeniyle haploidentik nakil, nakil sonrası 8. ay, Tedavisi sürüyor.**
3	8y	E	**15.07.2010**	KİT sonrası relaps		Protokol 3 (farklı)	3,4	18500	19000	**KIT sonrası hastalığı tekrarladı ve EKSİTUS oldu.**
4	1y	K	**11.11.2009**	Yeni tanı	Bifenotipik Lösemi	COG AAML0531	5,3	3900	406000	**5 kür KT sonrası hastalığı tekrar etti. Daha sonra remisyona giremeden EKSİTUS oldu.**
5	16y	K	**05.10.2009**	Relaps		Protokol 3 (farklı)	11,2	24900	39000	**Relaps oldu. Ve hastalık remisyona giremeden EKSİTUS oldu.**

Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 2

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB /WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı (mm3)	Takip Sırasındaki Durumu
6	16y	E	**24.08.2009**	Yeni tanı	M3	COG AAML0531	5,7	700	16000	**5 kür KT aldı. Tedavi sonrası 3. yıl. Remisyonda.**
7	11y	K	**12.12.2007**	Yeni tanı	M2	COG AAML0531	11,1	49400	83000	**Aile içi vericisi olması ve standart AML olması nedeniyle 3. kür sonra nakile gitti. Nakil sonrası 4. yıl Remisyonda.**
8	3y	E	**8.10.2010**	Bifenotipik Lösemi	Bifenotipik Lösemi	Düşük doz ARA-C	6,8	10400	35000	**Tedavi tamamlanmak üzere Remisyonda.**
9	4y	E	**04.08.2011**	Bifenotipik Lösemi	Bifenotipik Lösemi	High Risk ALL	7,8	3900	32000	**Tedavi tamamlanmak üzere Remisyonda.**
10	2y	E	**14.01.2011**	Yeni tanı	M7	COG AAML0531	7,0	3900	254000	**5 kür KT sonrası relaps oldu, Antalya'da akraba dışı nakil oldu. Şimdi Remisyonda.**
11	14y	K	**15.01.2010**	Yeni tanı	M4	COG AAML0531	7,4	60500	7000	**5 kür KT sonrası Remisyonda.**

Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 3

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB/WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı (mm3)	Takip Sırasındaki Durumu
12	7y	E	**17.02.2010**	Yeni tanı	M0	CCG-29-61	9,1	3500	36000	**Hastaya refrakter AML tanısı ile 4 kür kemoterapi verildikten sonra Haziran 2010 tarihinde allojeneik KİT yapıldı. KİT sonrası 2. Ayında relaps gelişti (Ağustos 2010). Bu tarihten sonra hiç tam remisyon elde edilemedi ve hasta progresif hastalık ile Ekim 2012 tarihinde EKSİTUS oldu.**
13	13y	K	**18.02.2010**	AML(+FAA)	M0	CCG-29-61	9,1	3000	58000	**Fanconi anemisi zemininde gelişen AML tanısı ile 4 kür kemoterapi aldı. Tam remisyon sağlanamadı ve progresif hastalıkla Eylül 2010 tarihinde EKSİTUS oldu.**

Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 4

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB/WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı (mm3)	Takip Sırasındaki Durumu
14	10y	K	**27.09.2011**	Yeni tanı		CCG-29-61	10,3	65000	65000	**Haziran 2010 tarihinde AML tanısı ile KT başlandı. Toplam6 kür kemoterapi ardından tedavisi kesildi,. Tedavi kesiminin 3. Ayında bifenotipik lösemi olarak relaps gösterdi. (Ağustos 2011). 4 kür kemoterapi ile remisyonda iken tedavisi kesildi. Hasta KİT'i kabul etmedi. Tedavi kesiminin 5. Ayında 2. Relapsı gelişti ve halen hasta kemoterapi almakta.** **Tedavisi sürüyor.**
15	16y	K	**01.09.2010**	Sekonder AML	Bifenotipik Lösemi	Protokol 3 (farklı)	10,9	5800	77000	**T NHL tanısı ile kemoterapi almakta iken lösemiye transforme oldu. Kemoterapiye refrakter seyretti. Mayıs 2011'de progresif hastalıkla EKSİTUS oldu.**

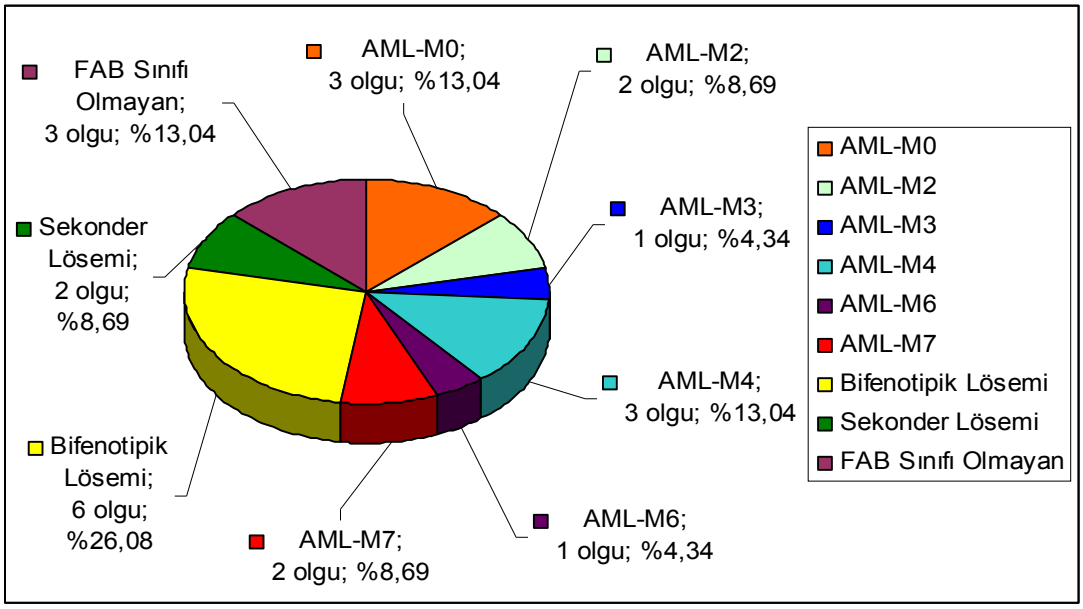
Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 5

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB/WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı(mm3	Takip Sırasındaki Durumu
16	5y	E	**14.03.2011**	Bifenotipik Lösemi	Bifenotipik Lösemi	CCG-19-61	13,1	3100	62000	**Yüksek risk ALL protokolü uygulandı. Halen idame fazında olup kemik iliği remisyondadır** **Remisyonda.**
17	1y	E	**23.06.2011**	Sekonder AML	Sekonder AML	CCG-29-61	9,0	2900	128000	**Osteosarkom sonrası gelişen sekonder AML tanısı ile 6 kür kemoterapi ve 6 ay idame tedavisi uygulandı. Halen remisyonda tedavisiz izlemdedir.** **Remisyonda.**
18	9y	K	**26.10.2011**	Bifenotipik Lösemi	Bifenotipik Lösemi	CCG-29-61	12,0	4100	418000	**AML protokolü ile remisyona sokulan hasta bifenotipik özelliği nedeniyle idame tedavisi almaktadır. Kemik iliği remisyondadır.** **Remisyonda.**
19	7y	K	**28.11.2011**	Yeni tanı	M7	CCG-29-61	9,3	1000	177000	**AML indüksiyon tedavisi sonrası akut gastrointestinal kanama ile Ocak 2012'de EKSİTUS oldu.**

Tablo 4.1 Hastaların yaş, cinsiyet ve kan değerleri – 6

Olgu No	Hasta Yaşı	Cinsiyeti	Çalışılan Örnek Tarihi	Çalışıldığı tarihte Yeni tanı / Rölaps olması	FAB/WHO Sınıflaması	Aldığı Tedavi Protokolü	Hgb Değeri (g/dL)	Bk Sayısı (mm3)	Trombosit Sayısı (mm3)	Takip Sirasindaki Durumu
20	15y	E	**15.11.2011**	Yeni tanı	M0	CCG-29-61	10,3	2300	196000	**AML tedavisi ile remisyon elde edilen hasta tedavinin 6. Ayında relaps geliştirdi ve daha sonra remisyon elde edilemedi. Progresif hastalıkla Temmuz 2012'de EKSİTUS oldu.**
21	5y	K	**02.10.2012**	Relaps Refrakter	M4	BFM2004	9,8	3200	390000	**Dış merkez tanılı hasta hematoloji kliniğine relaps anında geldi. Nakil yapıldı.Nakil sonrası relaps oldu. EKSİTUS oldu.**
22	2y	E	**23.10.2012**	Bifenotipik Lösemi	Bifenotipik Lösemi	COG AAML0531	6,2	7500	70000	**5 kür KT sonrası Remisyonda.**
23	12y	E	**30.10.2012**	Yeni tanı	M2	COG AAML0531	7,3	351720	52000	**5 kür KT sonrası Remisyonda.**

Çalışma grubunu oluşturan hastalar FAB/WHO sınıflamasına göre incelendiğinde M1 ve M5 alt grubuna ait hasta olmadığı, en fazla bifenotipik lösemi tanısı alan (%26,08) hasta grubunun olduğu gözlendi (Tablo 4.2). FAB/WHO sınıflamasına göre hastaların dağılımının şematize durumu Şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3 Olguların FAB/WHO'a göre sınıflandırılması

Değerlendirilmeye alınan hastalara rutin izlemi sırasında bölümümüzde yapılmış olan genetik incelemeler Tablo 4.2'de gösterilmiştir. AML ön tanılı hastalarda yalnız AML paneli çalışılırken bifenotipik tanısı olan hastalarda AML ve ALL panelleri çalışılmıştır.

Tablo 4.2 Pediatrik AML ve ALL'de rutin olarak çalışılan parametreler

	PEDİATRİK AML PANELİ	**PEDİATRİK ALL PANELİ**
Sitogenetik İnceleme	Kemik iliği ve/veya periferik kandan kromozomal inceleme	Kemik iliği ve/veya periferik kandan kromozomal inceleme
Moleküler Sitogenetik	Monozomi 7 Monozomi 5 5q31 delesyonu t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13;q22)	11q23 MLL mutasyonları Trizomi 4 Trizomi 17 Trizomi 10 t(11;14)(q13;q12) t(8;14)(q24;q32) 13q14.3 delesyonu t(12;21)(p13;q22) t(9;22)(q34;q11.2) t(4;11)(q12;q23)
Moleküler Genetik	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13;q22)	t(12;21)(p13;q22) t(9;22)(q34;q11.2) t(4;11)(q12;q23)

4.2. Sitogenetik Analiz Sonuçları (Tablo 4.3)

Çalışmamıza alınan toplam 23 olgunun sitogenetik analizi yapılmıştır. Ancak çalışmaya alınan tarihlere ait örnekler incelendiğinde olguların 7 tanesinde kemik iliğinden yapılan kültür sonucu metafaz elde edilemediği belirlenmiştir (Olgu 3, 4, 7, 15, 17, 22 ve 23). Hücre kültüründe üreme olan 16 olgunun 7 tanesinde sayısal ve yapısal olarak normal karyotip tespit edilmiştir (Olgu 1, 2, 8, 12, 16, 18, ve 20). Bir olguda (olgu 8) ilk tanı örneğinde yeterli sayıda metafaz elde edilememekle birlikte

spontan kırık oranı yüksek bulunmuştur. Altıncı olguda t(15;17) translokasyonu tespit edilmiştir. Başka bir olguda (olgu 9) değerlendirilen metafazların tümünde inv(9) saptanmıştır. Bu bulgunun yapısal olup olmadığını araştırmak için periferik kandan sitogenetik inceleme önerilmiştir. Başka bir olguda ise (olgu 11) tüm metafazlarda trizomi 22 saptanmıştır. Olgu 2'de ilk çalışılan sitogenetik örnekte değerlendirilen metafazlarda klonal olarak t(X;16) ve t(12;18) saptanmıştır. Olgu 2'nin çalışmaya alınan örneği yani relaps örneği ise sitogenetik olarak normal olarak değerlendirilmiştir. Olgu 5'de klonal olarak del(6)(q), der(12), add(16)(p) saptanmıştır. Başka bir olguda ise (olgu 10) hiperdiploid metafazlar saptanmış olup klonal olarak trizomi 8, del(11)(q) ve bir marker kromozom tespit edilmiştir. Bir olguda (olgu13) klonal monozomi 7 ve trizomi 21 görülmüştür. Olgu 14'de inv(5)(p11.22p13), t(10;11)(p12;q21) ve i(17)(q10) saptanmıştır. Olgu 21'de ise iki farklı patolojik klon saptanmış olup, birinde t(1;21), diğerinde ise t(6;22) bulunmuştur.

Araştırma kapsamındaki hastalardan onunda (olgu 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19, 20, 21) saptanan sitogenetik anomali farklı gelişlerinde de saptanmıştır.

İnversiyon 9; 9. olguda saptanmıştır. Ancak 3. olguda ise çalışmaya alınan örnekle eş zamanlı sitogenetik incelemede metafaz elde edilememiştir. Ancak olgunun bölümümüzde ilk çalışılan örneğinde inv(9) saptanmıştır. İlk örnekte saptanan bu değişiklik, sonraki beş örnekte saptanmamıştır.

Trizomi 8 farklı iki olguda (olgu 10 ve 12) saptanmıştır. Her iki olguda bu sayısal düzensizliğe eşlik eden farklı yapısal düzensizlikler de bulunmuştur.

İzokromozom 17q10 da olgu 13 ve olgu 14 olmak üzere iki farklı olguda saptanmıştır.

Sitogenetik olarak saptanan t(X;16)(p1?;q2?) ve t(12;18)(q24;q21) (olgu 2); t(1;2)(q21;p2?3) (olgu 10); t(3;17;16)(p13;q21;q22) (olgu 12); inv (5)(p11.2p13), t(10;11)(p12;q21),t(3;12)(q21;q13) ve der(6)t(1;6;5) (olgu 14); t(1;5)(p1?;q1?)

(olgu 15); t(7;12) (olgu 19); t(1;21)(q25;q22) ve t(6;22)(q24;q12) (olgu 21) yapısal değişiklikler litaratürde bulunmayıp ilk olarak bu hastalarda tanımlanmıştır.

4.3. Moleküler Sitogenetik Sonuçları (Tablo 4.3)

Moleküler sitogenetik olarak toplam 23 olgudan biri hariç diğerlerinin analizi yapılmıştır. Olgu 22'nin materyal eksikliği nedeniyle incelemesi yapılamamıştır. Dokuz olgunun moleküler sitogenetik sonucu normal olarak değerlendirilmiştir (olgu 1, 2, 3, 5, 7, 16, 18, 21 ve 23). Bu olguların çalışma kapsamına alınan örnekleri değerlendirildiğinde toplan 13 olguda (olgu 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 22) moleküler sitogenetik sonuçları normal olarak değerlendirilmiştir.

Olgu 4'ün sitogenetik incelemesinde metafaz elde edilememiştir. Moleküler sitogenetik olarak MLL bölgesiyle ile ilgili yeniden düzenlenme saptanmıştır. Daha önceki ve sonraki gelişlerinde ise normal karyotip bulunmuş olup, moleküler sitogenetik incelemesi de normaldir.

Sitogenetik olarak t(15;17) saptanan olgu 6'nın eş zamanlı moleküler sitogenetik incelemesinde (15;17) saptanmıştır (90/100). Olgu 8 sitogenetik olarak normal olarak değerlendirilirken eş zamanlı moleküler sitogenetik incelemesinde trizomi 5 ve trizomi 17 saptanmıştır. Ancak çalışılan bu örnekte sitogenetik analiz için yeterli sayıda metafaz elde edilmediği belirtilmiştir.

Sitogenetik olarak inv(9) saptanan olgunun (olgu 9) moleküler sitogenetik sonucunda trizomi 10, trizomi 17, trizomi 4, *IGH* ve *MLL* amplifikasyonu saptanmıştır.

Farklı zamanlardaki örneklerde sitogenetik olarak farklı değişiklikler içeren olgu 10'da moleküler sitogenetik olarak *MLL* yeniden düzenlenmesi ve farklı zamanda çalışılan örneğinde trizomi 8 saptanmıştır.

Sitogenetik olarak sadece ilk çalışılan örneğinde trizomi 22 saptanan olgu 11'de

eş zamanlı moleküler sitogenetik incelemesi normal olarak değerlendirilmiştir. Trizomi 22, moleküler sitogenetik olarak gösterilmemiştir. Ancak farklı zamanda çalışılan örneğinde moleküler sitogenetik olarak BCR amplifikasyonu saptanmıştır.

Olgu 12'nin çalışma dönemi dışında gelen örneklerinde sitogenetik olarak trizomi 8 saptanan örneğin eş zamanlı moleküler sitogenetik incelemesinde de trizomi 8 saptanmıştır.

Olgu 13'de hem ilk çalışılan hem de daha sonraki örneklerinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik olarak monozomi 7 saptanmıştır.

Olgu 14'de sitogenetik olarak i(17)(q10) saptanmıştır. Eş zamanlı moleküler sitogenetik incelemesinde sitogenetik sonucuyla uyumlu olarak 17p delesyonu saptanmıştır. Yine bu olgunun farklı zamandaki sitogenetik incelemesinde sitogenetik olarak şüphe edilen t(3;12) ve t(1;5;6) moleküler sitogenetik olarak doğrulanmıştır. Olgu 14'ün hücre kültür sonucu metafaz elde edilemeyen başka bir örneğinde moleküler sitogenetik olarak RARA amplifikasyonu saptanmış olup bu sonuç da hastanın önceki sitogenetik patolojik klonuyla uyumludur.

Olgu 15'de çalışmaya alınan örneğinde kültür sonucu metafaz elde edilememiş ancak moleküler sitogenetik olarak 5p15.2 bölgesinin kaybı saptanmıştır. Olgunun farklı moleküler sitogenetik incelemelerinde *AML1, IGH ve ABL* amplifikasyonu ve trizomi 10 saptanmıştır. Farklı zamanlarda yapılan sitogenetik incelemelerde değişik kromozomal yapısal yeni düzenlemeler tespit edilmiştir.

Olgu 17'de çalışmaya alınan örneğinde kültür sonucu metafaz elde edilememiş ancak, daha sonra gelişindeki bir örneğinde moleküler sitogenetik olarak 13q delesyonu saptanmıştır. Yine bu olgunun farklı zamanda çalışılan ve hücre kültüründe metafaz elde edilemeyen başka bir örneğinde moleküler sitogenetik olarak 7q delesyonu saptanmıştır.

Olgu 19'un moleküler sitogenetik incelemelerinde tetrazomi 5, tetrazomi 8 ve

monozomi 7 saptanmıştır. Bu değişikliklere ek olarak farklı örneklerde *IGH* amplifikasyonu da saptanmıştır.

Olgu 20'nin farklı zamanlarda çalışılan örneklerinde moleküler sitogenetik olarak *MLL* ve *CCND1* kaybı saptanmıştır. Bu bulgu monozomi 11 veya geniş 11q delesyonu olarak izlenmiştir. Sitogenetik olarak monozomi 11 saptanmasından sonra FISH ile monozomi 11 olarak izlenmiştir. Hastanın farklı zamanlarda çalışılan örneklerinde trizomi 7 saptanmıştır.

Olgu 21 moleküler sitogenetik olarak normal olarak değerlendirilmiştir. Olgunun KİT sonrası sitogenetik örneğinde 46,XX,t(6;22) yanısıra, 46,XY kuruluşu da saptanmıştır. Bu durum moleküler sitogenetik olarak (nuc ish (DXZ1x2)[3]//(DXZ1,DYZ3)x1[97]) doğrulanmıştır.

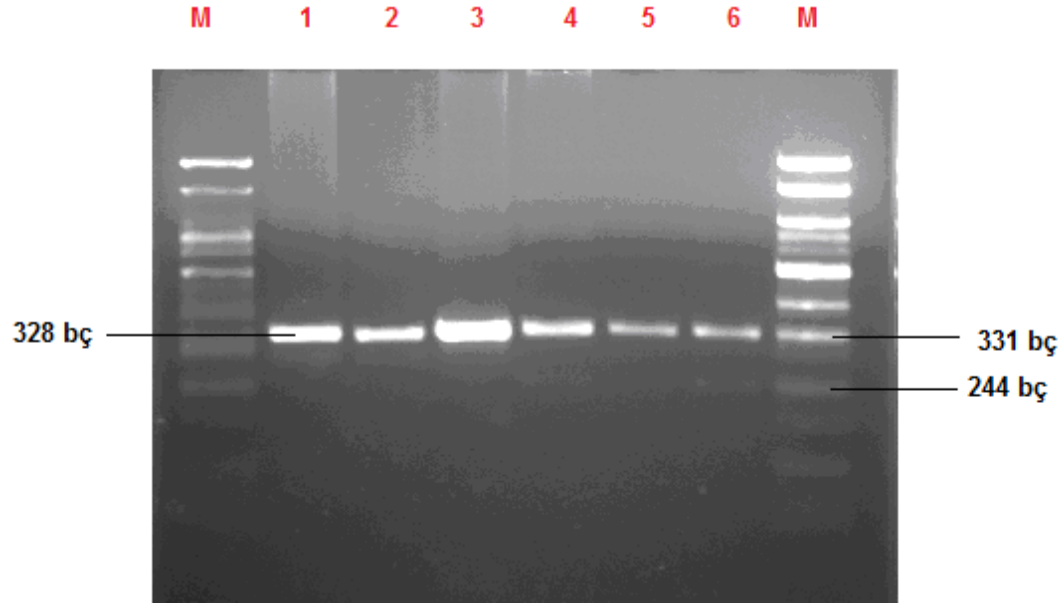
4.4. Moleküler Genetik Sonuçları (Tablo 4.3)

Toplam 23 olgu moleküler genetik ve moleküler sitogenetik olarak da analiz edildi. Moleküler genetik yöntemle incelenen 23 olgudan sadece bir olguda (olgu 3) t(8;21)(q22;q22) saptanmıştır. Bu olgunun araştırma kapsamında çalışılan örneğinin sitogenetik incelemesinde hücre kültürü sonucu metafaz elde edilememiş ve moleküler sitogenetik sonucu da normal olarak değerlendirilmiştir. Diğer olguların tümünde t(15;17)(q22;q21), t(8;21)(q22;q22) ve inv(16)(p13;q22) saptanmamıştır. Sitogenetik ve moleküler sitogenetik olarak t(15;17) translokasyonu saptanan olgu 6'da moleküler genetik incelemede bu değişiklik tespit edilmemiştir.

4.5. *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD ve *NPM1* ekzon 12 Mutasyonu Sonuçları

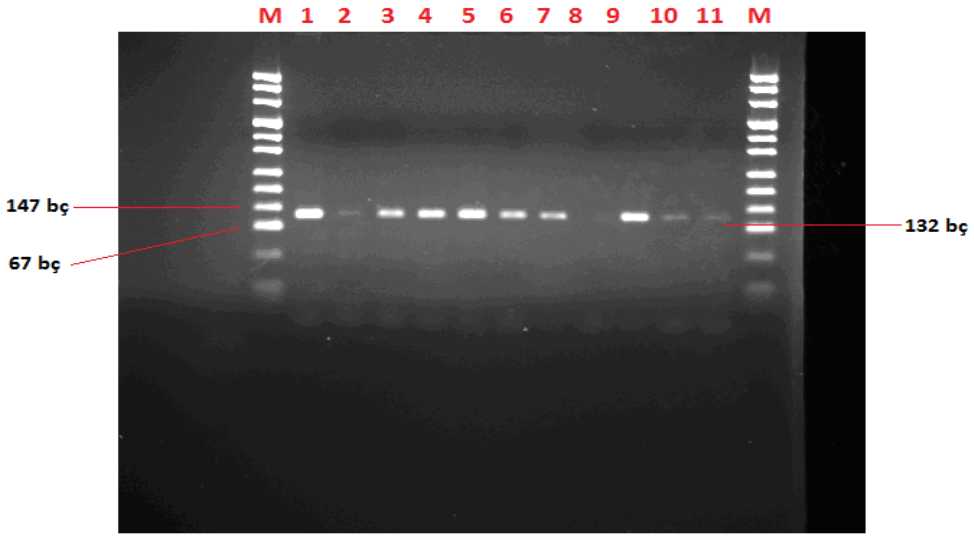
Bu çalışma kapsamında *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD ve *NPM1* genleri moleküler analiz çalışması yapıldı. 23 olgunun tümünde *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD ve *NPM1*'in en sık görülen ekzon 12 mutasyonuna bakıldı. *FLT3*-ITD mutasyonu için PZR ve *FLT3*-TKD mutasyonu için RFLP yöntemleri kullanıldı. *NPM1* mutasyonunun tespiti için önce PZR sonra dizi analizi uygulandı.

FLT3 geni ITD bölgesi PZR sonrası elde edilen ürün %3'lük agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.4).



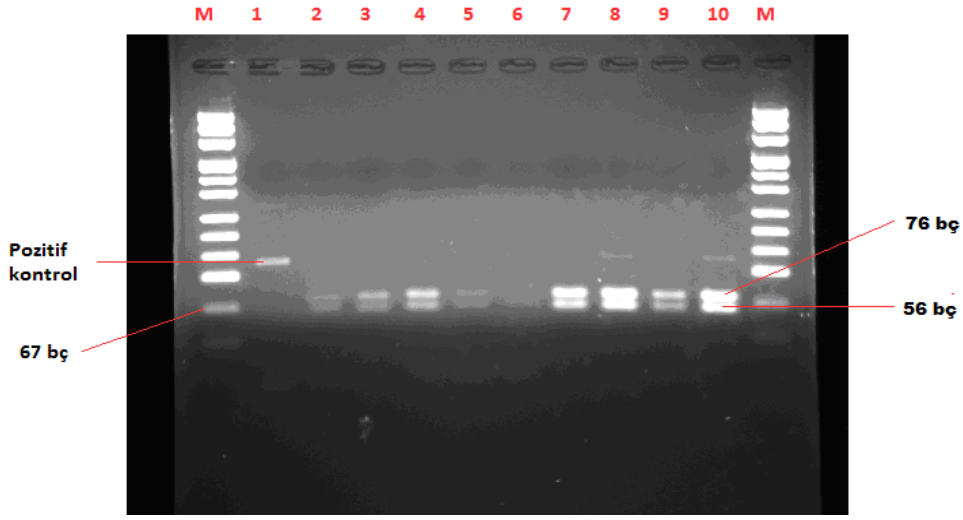
Şekil 4.4 *FLT3* geni ITD bölgesi PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü
M: Marker pUC

FLT3 geni TKD bölgesi PZR sonucu elde edilen ürün %3'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *FLT3* geni TKD bölgesi PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü.
M:Marker pUC

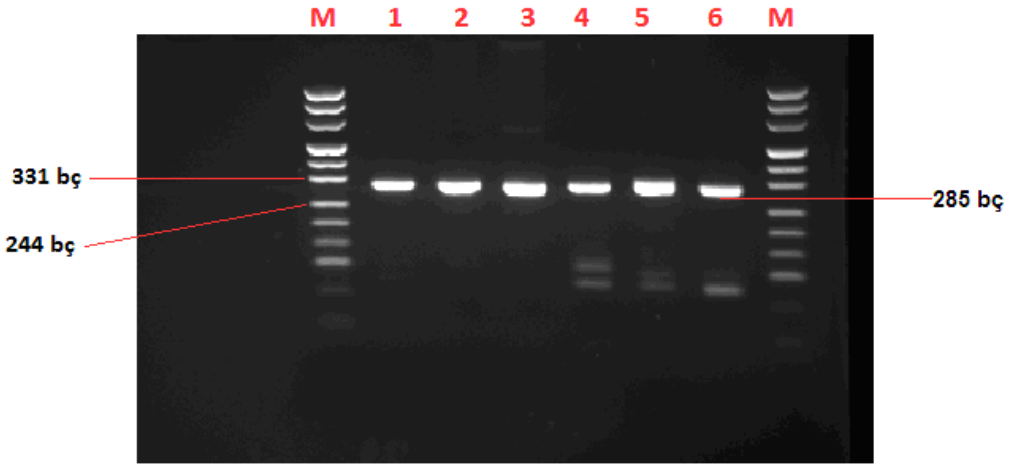
FLT3-TKD PZR ürününün EcoRV ile enzim kesimi sonrası elde edilen ürünler jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *FLT3*-TKD PZR ürününün EcoRV ile enzim kesimi sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü. M: Marker pUC, pozitif kontrol ve kesime uğramış hasta örnekleri

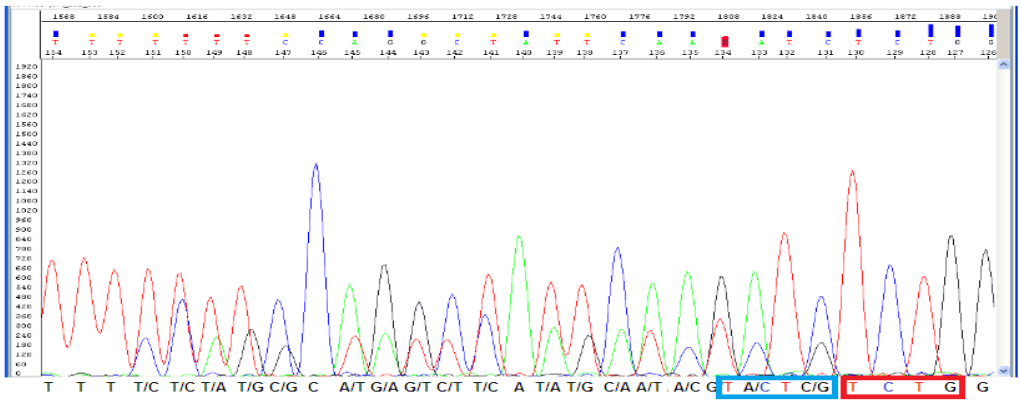
Araştırma kapsamındaki 23 olgunun hiçbirinde *FLT3*-ITD ve *FLT3*-TKD mutasyonu saptanmadı.

NPM1 geninin PZR sonrası elde edilen 285 baz çiftlik ürünü %3 'lük agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.7).



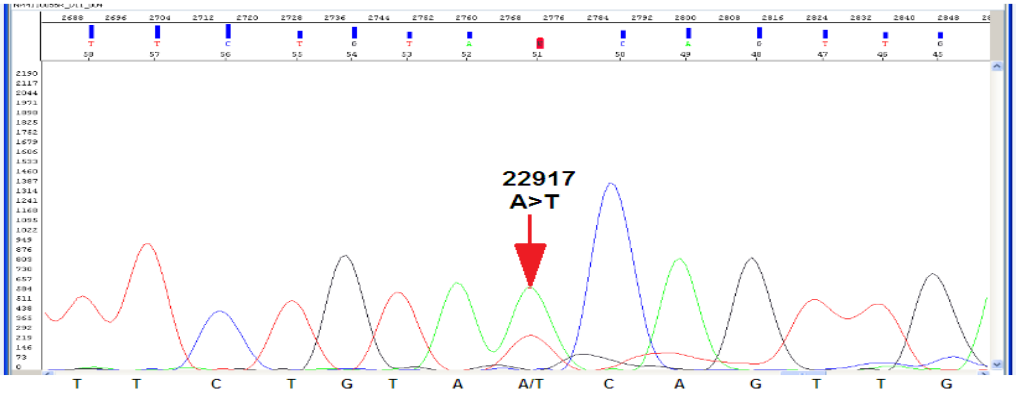
Şekil 4.7 *NPM1* geninin PZR sonrası %3'lük jel elektroforezi görüntüsü.
M: Marker pUC

NPM1 mutasyonu çalışılan 23 olgudan birinde Tip A *NPM1* mutasyonu saptandı (Şekil 4.8). Bu mutasyon saptanan olgu (olgu 5) 16 yaşında bir kız hasta olup relaps AML tanısı ile takip edilirken izlem sırasında eksitus olmuştur.

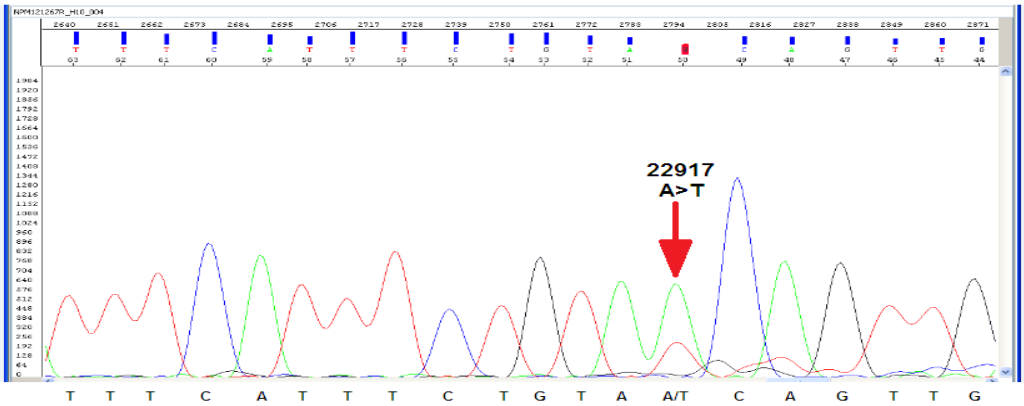


Şekil 4.8 Olgu 5, Tip A *NPM1* mutasyonu.

Ayrıca iki olguda (olgu 10 ve olgu 22) aynı nokta mutasyon saptandı. Bu olgularda 22917. lokalizasyondaki Adenin, Timin ile yer değiştirmiştir (Şekil 4.9,Şekil 4.10).



Şekil 4.9 Olgu 10, *NPM1* nokta mutasyonu.



Şekil 4.10 Olgu 22, *NPM1* nokta mutasyonu.

İki olguda saptanan aynı nokta mutasyonunun ekzon 12 içinde, stop kodondan sonra 3'UTR bölgesinde olduğu belirlendi (Şekil 4.11). Veri tabanına (209) bakıldığında bu noktada tanımlı bir SNP olmadığı görüldü.

```
22621 tcacattttt atgactgatt aaagtgtttg gaattaaatt acatctgagt ataaattttc
22681 ttggagtcat atctttatct agagttaact ctctggtggt aatgaaagaa atagatgttg
22741 aactatgcaa agagacattt aatttattga tgtctatgaa gtgttgtggt tccttaacca
22801 catttctttt ttttttttc caggctattc aagatctctg gcagtggagg aagtctcttt
22861 aagaaaatag tttaaacaat ttgttaaaaa attttccgtc ttatttcatt tctgtaacag
22921 ttgatatctg gctgtccttt ttataatgca gagtgagaac tttccctacc gtgtttgata
22981 aatgttgtcc aggttctatt gccaagaatg tgttgtccaa aatgcctgtt tagtttttaa
23041 agatggaact ccacccttg cttggtttta agtatgtatg gaatgttatg ataggacata
23101 gtagtagcgg tggtcagaca tggaaatggt ggggagacaa aaatatacat gtgaaataaa
23161 actcagtatt ttaataaagt agcacggttt ctattgactt atttaactgc tttatacttt
```

Primerler

Mutasyonların en sık olduğu bölge

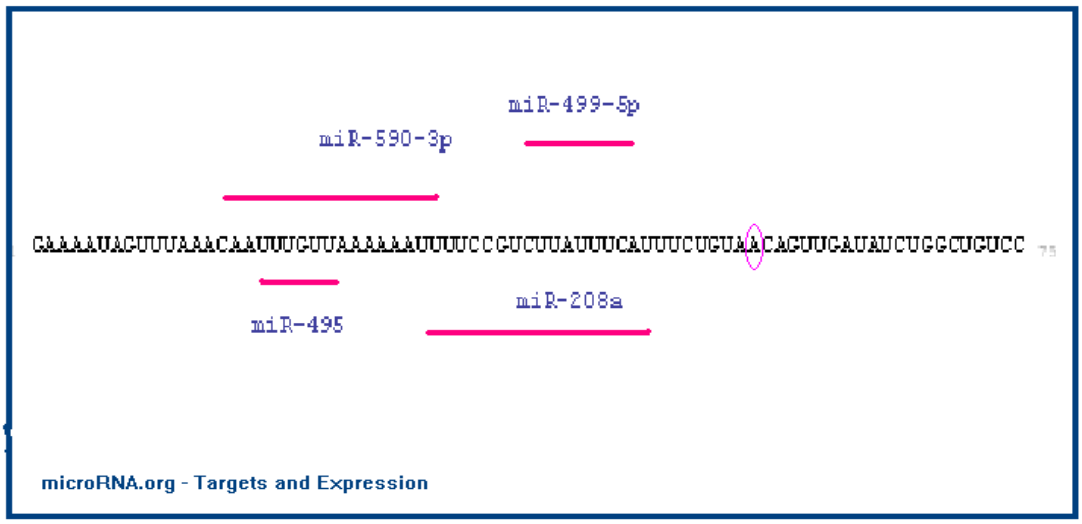
Ekzon 12: 22824—23181

TAA Stop kodon

A>T nokta mutasyon

Şekil 4.11 Nokta mutasyonunun *NPM1* ekzon 12'daki lokalizasyonu

Saptanan değişikliğin *NPM1* 3'UTR bölgesinde olması nedeniyle, gen ekspresyonunu etkileyecek tanımlı bir miRNA ile ilişki olup olmadığı araştırıldı. Bu genle ilişkili birçok miRNA tanımlanmıştır (210). Saptanan nokta mutasyonunun bu miRNA'ların bağlanmasını etkilemeyecek bir yerde olduğu belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 22917. lokalizasyondaki nokta mutasyonu ve bu bölgeye en yakın miRNA'lar

Tablo 4.3 Hastaların Tüm Genetik Sonuçları

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
1.	17.03.2009	17.03.2009	46,XY[2]	monozomi 7, monozomi 5, trizomi 8, t(15;17), 5q ve7q delesyonları saptanmamıştır.	N	–	–	–	
		13.04.2009-03.01.2012 10 farklı örnek.	46,XY	N	N				EX.
2.		13.04.2009	**46,XX,t(X;16)(p1?;q2?), t(12;18)(q24;q21)[9]/46,XX[13]**	N	N				
		12.05.2009-29.11.2011 10 farklı örnek.	46,XX	N	N				Tedavisi sürüyor.
	13.09.2011	13.09.2011	46,XX	monozomi 7, monozomi 5, trizomi 8, t(15;17), 5q ve7q delesyonları saptanmamıştır .	N	–	–	–	
3.		05.10.2009	**42-46,XY,inv(9)(p11q13)[20]**	N	N				
		15.12.2009	46,XY	-	**t(8;21)+**				
		30.03.2010-09.06.2010 2 farklı örnek.	46,XY	-	N				
	15.07.2010	15.07.2010	K.İ. Yapılan kültür sonucu metafaz elde edilemedi.	monozomi 7, monozomi 5 ve 5q delesyonu saptanmamıştır.	t(8,21) + t(8;21)+	–	–	–	EX
		02.09.2010	46,XY	N	N				
		01.02.2011	46,XY	N	N				

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
		29.01.2009- 02.11.2009 3 farklı örnek.	46,XX	N	N				
4.	**11.11.2009**	**11.11.2009**	**Metafaz elde edilemedi.**	**monozomi 7, monozomi 5, 5q ve 11q delesyonu saptanmamıştır. MLL bölgesi yeniden düzenlenmesi saptanmıştır (72/100).**	**N**	–	–	–	EX.
		23.12.2009	46,XX	N	N				
		28.04.2009- 06.08.2009 3 farklı örnek.	46,XX	N	N				
5.	**05.10.2009**	**05.10.2009**	**45-46,XX,del(6)(q),der(12), add(16)(p)[12]/ 46,XX[7]**	**monozomi 7, monozomi 5 ve 5q delesyonu saptanmamıştır.**	**N**	–	–	+	EX.
		21.08.2009	44-46,XY[4]	N	N				
	24.08.2009	**24.08.2009**	**46,XY,t(15;17)(q22;q21)[11]/ 46,XY[1]**	**t(15;17) saptanmıştır (90/100)**	**N**	–	–	–	
6.		29.09.2009	**46,XY,t(15;17)(q22;q21)[1]/ 46,XY[19]**	**t(15;17) saptanmıştır (55/100)**	N				Remisyonda
		06.11.2009- 14.12.2009 3 farklı örnek.	46,XY	N	N				
	12.12.2007	**12.12.2007**	**Metafaz elde edilemedi.**	**N**	**N**	–	–	–	
7.		09.01.2008- 21.03.2008 2 farklı örnek.	46,XX	N	N				Remisyonda

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
8.	**08.10.2010**	**08.10.2010** 15.10.2010-22.5.2012 3 farklı örnek.	**3 Metafaz normal.** 46,XY	**trizomi 17 saptanmıştır (21/100); trizomi 5 saptanmıştır (6/100).** N	**N** N	–	–	–	Remisyonda
9.	**04.08.2011**	**04.08.2011** 18.08.2011-31.05.2011 6 farklı örnek.	**46,XY,inv (9)(p12q13)[14]** **46,XY,inv (9)(p12q13)[20]**	**trizomi 10 ve trizomi 17 saptanmıştır (55/100). MLL amplifikasyonu saptanmıştır (74/100). IGH amplifikasyonu saptanmıştır (50/100). trizomi 4 saptanmıştır (61/100).** N	N N	–	–	–	Remisyonda
10.	**14.01.2011**	**14.01.2011** 16.02.2011 24.03.2011 02.12.2011 06.12.2011 10.01.2011-20.03.2012 3 farklı örnek.	**48,XY,+8,del(11)(q23), +mar[10]/ 46,XY[6]** 46,XY 46,XY **48,XY,t(1;2)(q21;p2?3), +8,der(11)(?), der(19), +der(19)[3]/ 46,XY[17]** **48,XY,der(2)t(1;2)(q21;p2?), +8,del(11)(q2?3), der(19), +der(19)[2]** 46,XY	**MLL yeniden düzenlenmesi (20/100)** N N **trizomi 8 saptanmıştır (11/100). MLL yeniden düzenlenmesi (9/100) saptanmıştır**. N N	**N** N N N N N	–	–	–	Remisyonda

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
11.	**14.01.2011**	**14.01.2011**	**47,XX,+22[11]**	**monozomi 5, monozomi 7, trizomi 4, trizomi 10, 5q, 11q ve 13q delesyonları saptanmamıştır. t(11;14),t(8;14) saptanmamıştır.**	**N**	_	_	_	
		19.02.2010	46,XX	N(Trizomi 22 saptanmamıştır.)	N				Remisyonda
		27.01.2010	-	BCR amplifikasyonu saptanmıştır (72/100).	-				
		17.03.2010-31.05.2010 2 farklı örnek.	46,XX	N	N				
12.	**17.02.2010**	**17.02.2010**	**46,XY[13]**	**monozomi 5, monozomi 7, 5q delesyonları saptanmamıştır.**	**N**	_	_	_	
		01.04.2010-11.10.2010 5 farklı örnek.	46,XY	N	N				
		11.10.2010	**47,XY,der(2)add(2)(q37), t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8.ish der(2)t(2;16)(q37;q?)(wcp16+)[9] /46,XY[10]**	N	N				
		27.10.2010	**47,XY,der(2)add(2q37), t(3;17;16)(p13q21;q22),+8[16]/46, XY[3]**	N	N				EX
		04.11.2010	**47,XY,der(2)add(2)(q37), t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[19] /46,XY[1]**	**29 nükleusda trizomi 8 saptanmış (29/100).**	N				
		06.12.2010-10.03.2011 5-farklı örnek.	46,XY	N	N				

12.		13.04.2011	46,XY,t(2;16)(q37;?),t(3;17;16)(p13;q21;q22)[1]/46,XY[19]	N	N				
		11.05.2011-13.12.2011 6-farklı örnek.	46,XY	N	N				
		12.01.2012	**46,XY,add(2)(q37),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[2]/46,XY[18**]	N	N				
		18.01.2012	**45-47,XY,add(2)(q37),t(3;17;16)(p13;q21,q22),+8[16]/46,XY[4]**	-	N				
		02.02.2012	**47,XY,add(2)(q37),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[17]/46,XY[2**]	-	N				
		13.03.2012	**47,XY,add(2)(q37),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[9]/46,XY[8]**	-	N				
		10.04.2012	**47,XY,add(2)(q37),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[18]/46,XY[1]**	-	N				
		17.04.2012	**46,XY,der(2),t(2;16)(q37;q?),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[4]/46,XY[1**]	-	N				
		24.04.2012-05.06.2012 3 farklı örnek	46,XY	-	N				
		09.08.2012	**47,XY,der(2)t(2;16)(q37;q?),t(3;17;16)(p13;q21;q22),+8[20]**	-	N				
		22.08.2012	**43 47,XY,der(2)t(2;16)(q37;q?),** t(**(3;17;16) (p13;q21;q22),+ 8[14]/ 49,sl,+marx2[2]/46,XY[1]**	-	N				

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
13.	**18.02.2010**	**18.02.2010**	**45-46,XX,-7[15]+21[3][cp15]**	**monozomi 7 saptanmıştır (80/100).**	N	_	_	_	EX
		23.03.2010	**45,XX,-7[18]**	**monozomi 7 saptanmıştır (90/100).**	N				
		24.05.2010	**44-45,XX,-7[11]/45,sl,i(17)(q10)[3] /46,XX[2]**	**monozomi 7 saptanmıştır (75/100).**	N				
		28.05.2010	**42-45,XX,-7[19]/45,sl,i(17)(q10)[4]**	**monozomi 7 saptanmıştır (96/100).**	N				
		29.06.2010	**-**	**monozomi 7 saptanmıştır (98/100).**	-				
		06.07.2010	**45,XY,-7[5]**	**monozomi 7 saptanmıştır (93/100).**	N				
		23.07.2010	**-**	**monozomi 7 saptanmıştır (99/100).**	-				
14.	**07.07.2010**	**07.07.2010**	**46,XX,inv(5)(p11.2p13), t(10;11)(p12 ;q21),i(17)(q10)[3].**	**N**	**N**	_	_	_	Tedavisi sürüyor.
		23.09.2010-07.08.2012 19 farklı örnek	46,XX	N	N				
		04.09.2012	**46 47,XX,i(17)(q10)[2]/46,XX[17]**	**17p delesyonu saptanmıştır (12/200).**	N				
		15.10.2012	Metafaz elde edilemedi	**RARA amplifikasyonu Saptanmıştır (154/200).**	-				
		06.11.2012	**46,XX,t(3;12)(q21;q13),der(6)t(1;6;5) (pter-->p13::p2? -->q?2::q13), t(10;11)(p12;q21),i(17)(q10)[9]/ 46,XX[9]**	**Sitogenetik incelemede şüphe edilen t(3;12) ve t(1;5;6) doğrulanmıştır.**	N				
		18.12.2012	**45,XX,t(3;12)(q21;13),der(6)t(1;6;5) (pterp13::p2? q?2::q13), t(10;11)(p12;q21), i(17)(q10)[1]/ 45,XX[4]/46,XX[14]**	N	N				
		29.01.2013	46,XX	N	N				

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
15.	**01.09.2010**	26.09.2007	46,XX[3]	**PML kaybı saptanmıştır (73/100)**	N				
		15.11.2007-27.04.2010 8 farklı örnek	N	**N**	-				
		05.07.2010	46,XX	**AML1 amplifikasyonu saptanmıştır (20/200) 15 nukleusta ABL amplifikasyonu saptanmıştır (15/100).**	N				
		13.07.2010	Metafaz elde edilmedi	**N**	-				
		21.07.2010	**47-49,-X,der(X),-1,+t(1;5)(p1?;q1?), -5, -15,der(17),der(19),+21,+mar1,mar2, mar3[19]/46,XX[12]**	**1 ve 5.kromozomlarda kısmi kayıplar olduğu belirlenmiştir. AML1 amplifikasyonu saptanmıştır (37/100).**	_				
		01.09.2010	**Kemik iliğinden yapılan kültür sonucu metafaz elde edilemedi**.	**5pI5.2 bölgesinin kaybı saptanmıştır (34/100).**	**N**	_	_	_	EX
		27.09.2010-04.11.2010 2 farklı örnek	46,XX	N	N				
		31.01.2011-	**46,XX,der(1)t(1;?)(q?;?),-4, der(7)add(7q32),-14-18der(22) add(22q),+mar1,+mar2, +mar3[1] /46,XX,der(1)add(1p36)[1]/46,XX[13]**	N	t (9;22) pozitif				
		22.03.2011	**45-46,-X,der(X),der(1), t(1;5)(p1?;q1?), -15, der(16), der(17),-19,+21,mar1,mar2, +mar3[cp4] /40-45,XX[4]/46,XX[11]**	**IGH amplifikasyonu saptanmıştır (7/200). Trizomi 10 saptanmış (3/200**).	t(9;22),t(4;11) ve t(12;21) negatif.				
		05.04.2011	**der(X),der(1)t(1,5)-15,der(16),der(17), -19,+21**	**IGH amplifikasyonu saptanmıştır (23/200). Trizomi 10 saptanmıştır (9 /100**).	_				

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Örnek Tarihleri	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik*	Moleküler Sonuçlar*	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
16.	**14.03.2011**	**14.03.2011** 31.03.2011-19.03.2013 12 farklı örnek	**46,XY,[20]** 46,XY	**N** N	**N** t(12;21),t(9;22) ve t(4;11) Negatif	–	–	–	Sağlıklı.
17.	**23.06.2011**	**23.06.2011** 11.07.2011 22.08.2011-28.09.2011 2 farklı örnek 15.11.20111 14.12.2011-08.05.2012 4 farklı örnek 17.07.2012- 13.11.2012-05.02.2013	**Kemik iliğinden yapılan kültür sonucu metafaz elde edilemedi**. 46,XY 46,XY Metafaz elde edilemedi. 46,XY **92,XXYY[4]/46,XY[8]** 46XY	**N** **13q delesyonu saptanmıştır (12/300)**. N 7q delesyonu saptanmıştır (6/200). N N N	**N** N N N N N N	–	–	–	Sağlıklı.
18.	**26.10.2011**	**26.10.2011** 27.10.2011-19.02.2013 17 farklı örnek	**46,XX[20]** 46,XX	**N** N	**N** N	–	–	–	Sağlıklı.
19.	**28.11.2011**	22.11.2011 **28.11.2011**	**35-45,XX[10]/46,XX[8]** **41-45,XX[2]/46,XX,[18]** 7.kromozomun klonal kaybı bulunmuştur.	N **tetrazomi 5 saptanmıştır (24/100).** **tetrazomi 8 saptanmıştır (22/100).** **monozomi 7 saptanmıştır (12/100).**	t(12;21),t(9;22) ve t(4;11) Negatif **N**	–	–	–	EX

19.		05.12.2011 14.12.2011 27.12.2011- 10.01.2012 2 farklı örnek	**44-45,XX,-7,t(7;12)(p1?;p1?)[8] /46,XX[5]** K.İ.'den yapılan kültür sonucu yeterli metafaz elde edilememiştir. 46,XX	**tetrazomi 5 saptanmıştır (27/300). tetrazomi 8 saptanmıştır (15/200). monozomi 7 saptanmıştır (12/200).** **D5S23,D5S721 ve EGR1 amplifikasyonu saptanmıştır. (7/100). monozomi 7 (5/100), IGH, MYC amplifikasyonu ve tetrazomi8 saptanmıştır (8/100).** N	N N N				
20.	**15.11.2011**	21.06.2011 08.07.2011 01.08.2011 05.08.2011 09.08.2011 22.09.2011 **15.11.2011** 24.11.2011 29.11.2011	46,XY 46,XY[2] Metafaz elde edilemedi. Metafaz elde edilemedi. 46,XY 46,XY **46,XY[14]** **42-45,XY[3]/46,XY[15]** **46,XY,der(1)add(1)(p),der(3),der(7),-7,del(8)(p),-11,del(12)(p),+mar1,+mar2[7]/46,XY[15]**	MLL kaybı saptanmıştır (21/150). CCND1 kaybı saptanmıştır (18/100). MLL kaybı saptanmıştır (52/200). CCND1 kaybı saptanmıştır (48/200). N **trizomi 7 saptanmıştır (9/200).** **trizomi 7 saptanmıştır (8/200**). N **N** - **MLL kaybı saptanmıştır (23/100). 12p delesyonu saptanmıştır (17/100).**	N N N N N N **N** N -	_	_	_	EX

20.		05.12.2011	Metafaz elde edilemedi.	**MLL kaybı saptanmıştır (25/100). CCND1 kaybı saptanmıştır (27/100). Trizomi 7 saptanmıştır (30/100).**	N				
		10.01.2012	2 metafaz sayısal ve yapısal olarak normal	**trizomi 7 saptanmıştır (150/200).**	N				
		14.12.2011-	Metafaz elde edilemedi.	**MLL kaybı saptanmıştır (82/100). CCND1 kaybı saptanmıştır (80/100).**	N				
		13.03.2012- 29.03.2012 3farklı örnek	46,XY	N	N				
		17.04.2012	**46,XY,der(1),der(2),der(3), der(7)add(7)(q3?2)x2,der(7),del(8)(p), -11,del(12)(p), der(19)[cp5]/46,XY[14**]	**MLL kaybı saptanmıştır (168 /200) CCND1 kaybı saptanmıştır (157/200). monozomi 11 saptanmıştır (164/200).**	N				
		24.04.2012	**46,XY,der(1),der(2),der(3),der(7), der(7),del(8)(p)[cp7]/46,XY[3**]	**trizomi 7 saptanmıştır (56/100). MLL kaybı saptanmıştır (168/200). CCND1 kaybı saptanmıştır (54/100). monozomi 11saptanmış (55/100).**	N				
		10.05.2012	**8 metafazda → der(1),der(2),der(3), 6tanesinde → der(7)add(7)(q)x2, ve 4 tanesinde → del(8)(q) ve (12)(p) saptanmıştır**.	**trizomi 7 saptanmıştır (185/200). CCND1 kaybı saptanmıştır (54/100) MLL kaybı saptanmıştır (174/200). monozomi 11saptanmış (185/200).**	N				

Olgu No	Çalışılan Örnek Tarihi	Geldiği Tarihler	Sitogenetik Sonuçlar	Moleküler Sitogenetik	Moleküler Sonuçlar	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1 Mutasyonu	Klinik Durum
21.	**02.10.2012**	28.08.2012 **02.10.2012** (08.12.2012' de KİT yapılmış) 04.04.2012	**46,XX,t(1;21)(q31;q22)[2]/37-45,XX[5] /46,XX[7]** **46,XX,t(1;21)(q25;q22)[6]/46,XX,t(6;22) (q24;q12)[6]/46,XX(8)** **46,XX,t(6;22)(q24;q12)[2]/46,XY[20]**	**N** N **XY saptanmıştır (97/100).**	**N** **N** N	–	–	–	EX
22.	**23.10.2012**	**23.10.2012** 22.11.2012	**Metafaz elde edilemedi.** Üç metafaz sayısal ve yapısal olarak normaldir.	Materyal yetersizliği nedeniyle inceleme yapılamamıştır. N	N N	–	–	–	Remisyonda
23.	**30.10.2012**	**30.10.2012** 06.11.2012-02.01.2013 3 farklı örnek	**Metafaz elde edilemedi.** 46,XY	**t(11;14),t(8;14) trizomi 4,trizomi 10, trizomi1 7, 11q ve 13q delesyonları saptanmamıştır**. N	N N	–	–	–	Remisyonda

* Pediatrik AML paneli çalışılmıştır. Panel dışındaki çalışmalar ilgili hastada belirtilmiştir.
N:Normal

5. TARTIŞMA

Akut Miyeloid lösemi (AML) çocukluk lösemisinin %15-20'si ve yetişkin lösemisinin yaklaşık %35'ini oluşturan klinik, sitogenetik ve moleküler yönden heterojen bir hastalıktır (156).

Klonal kromozomal anomaliler yetişkin olguların %55'inde tespit edilmiştir. Tanımlı sitogenetik değişiklikler hayatta kalma ve komplet remisyon başarısı için güçlü prognostik faktörler olarak kabul edilmiştir. AML'de 200'den fazla sayısal ve yapısal tekrarlayan kromozomal değişiklik tanımlanmış olup, sitogenetik olarak AML yüksek, orta ve düşük risk şeklinde sınıflandırılmıştır (186).

Olguların %60-%70'ini içeren orta risk kategorisindeki AML hastaları için prognostik öneme sahip olan orjinal belirteçler belirlenmiştir. Bu olguların yaklaşık %30'unda farklı klinik ve prognostik özelliklere sahip lösemi bileşenlerini tanımlayan rekürren kromozomal anomaliler bulunmaktadır. Sitogenetik analizde, AML'lerin %40- %50 oranında normal karyotip saptanmaktadır. NK-AML biyolojik ve klinik olarak en az anlaşılan gruptur. Gen mikroçiplerini kullanılarak NK-AML'yi sınıflandırma çabaları, tedaviye yanıtta farklılıklar gösteren gen ekspresyon paternlerinin ilişkilendirilmesinde başarılı olmuştur. Fakat hiçbir spesifik genetik alt grup oluşmamıştır (129).

NK-AML'nin moleküler analizlerinde, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genleri hedef alan çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. *MLL* geninin parsiyel tandem duplikasyonu *(MLL-PTD*: %5-%10), *AML1* ve *CEBPA* (sırasıyla olguların %2-%3'ünde ve %15-%20'sinde), reseptör tirozin kinazlar (*FLT3* ve *KIT*; sırasıyla %25-%30 ve %1) ve *RAS* genleri (%10), *Nükleofosmin (NPM1*) gen mutasyonları yetişkin NK-AML'nin %50-60'ında saptanmaktadır (129).

AML tanısında günümüzdeki yaklaşım, standart klinik özellikler ve rutin laboratuar tetkiklerinin yanı sıra, tanıyı destekleyici patoloji, immünfenotipleme, sitogenetik tetkikler ve moleküler tanı yöntemlerini kapsamaktadır. Tedavi protokolleri genel sağ kalım süresini artırmakla beraber iyileştirmeyi hızlandırmak ve

tedaviden kaynaklanan yan etkileri azaltmak için düzenlenmektedir. Bu nedenle hastalarda yeni tedaviler için farklı arayışların doğmasına ve yeni ilaçların geliştirilebilmesi için yoğun çaba sarf edilmesine neden olmuştur. Akut lösemilerde mevcut anlamlı tüm ilerlemelere rağmen konvansiyonel kemoterapi rejimlerinde mortalite ve morbidite problemleri sürmektedir. Her yıl eklenen yeni hasta sayısı tedaviyi ve sağ kalım oranlarını etkilemektedir. *FLT3* ve *NPM1* genleri; AML'nin tedavisi için cazip aday genler olarak tanımlanmaktadır.

2012 yılında yayınlanan bir çalışmada *FLT3*-ITD mutasyonlarının yetişkin AML vakalarında görülme sıklığı %20-40 (normal karyotipli olgularda ~%50) pediatrik AML'li olgularda ise %10 (normal karyotipli olgularda %18) olarak bulunmuştur (43). *FLT3*-TKD mutasyonları ise yetişkin AML olgularında %7 oranında tespit edilmiştir (93, 94, 95). Pediatrik AML'de ise bu oran %3,3-6,7 olarak belirtilmiştir (54, 96, 97).

NPM1 geninin 12. ekzonundaki somatik mutasyonlar en sık rastlanan genetik anormalliklerden biridir. Bu mutasyonlar, yetişkin AML vakalarının yaklaşık %35'inde ve NK-AML'si olan hastaların ise yaklaşık olarak %60'ında bulunmaktadır. Çocuklarda, *NPM1* mutasyonları çok daha az rastlanır ve tüm AML vakalarının %8-10'unda, normal karyotip taşıyan hastaların yaklaşık %25'inde görülür (156).

Bu çalışmada, yeni tanı almış veya relapstaki, çocukluk çağı AML hastalarında saptanan tanımlı diagnostik ve prognostik genetik değişikliklerle *FLT3* ve *NPM1* geni mutasyonlarının birlikte değerlendirildiğinde hastalığın takip ve tedavisindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışma grubuna, 0-16 yaş (ort.: 8,869 ± 5,251) aralığında 12 erkek (%52,17) ve 11 kız (%42,83) olmak üzere toplam 23 AML tanılı hasta alındı. AML tanılı bu gruptaki hastalardan 10 tanesi (%43,47) izlem sırasında eksitus oldu.

Çalışmamızda toplam 23 olgu sitogenetik olarak analiz edildi. Olguların 7 tanesinde kemik iliğinden yapılan kültür sonucu yeterli metafaz elde edilememiştir. Çalışılan hasta grubunda kemik iliği hücre kültüründe metafaz elde etme oranı

yaklaşık %70 olup genel standartlarla uyumludur.

Olguların 6 tanesinde sayısal ve yapısal olarak normal karyotip tespit edilmiştir. Sitogenetik analiz sonucu sayısal ve yapısal anomali saptanmayan hastalar, hücre kültürü sonucu metafaz elde edilen hasta grubunun yaklaşık %38'ini oluşturmaktadır. Erişkin AML ilk tanı hastalarında normal karyotip oranı %40-50'dir (95, 187, 188, 189, 190). Pediatrik hasta grubunda %15-30 olarak verilmektedir (191, 192, 193).

Bizim çalışmamızdaki NK oranı %37,05 olarak tespit edilmiştir. Litaratürde çocukluk çağı AML'li olgulardaki normal karyotip oranı ile uyumlu olmakla birlikte çalışmamızdaki hasta grubunda ilk tanı ve relaps hasta örneklerinin bir arada bulunması ve hücre kültürü üreme oranı ile ilişkili olarak NK saptanan olgu oranındaki değişiklik açıklanabilir.

Olgu 2'nin ilk çalışılan örneğinde sitogenetik olarak değerlendirilen metafazlarda klonal olarak t(X;16) ve t(12;18) saptanmıştır. Yapılan sitogenetik incelemede; t(X;16) için kırık noktaları tam olarak belirtilmemiştir. İkinci sitogenetik anomali t(12;18)(q24;q21) olup, kırık noktaları incelendiğinde her iki kromozomda da bu noktalarda gelişen yapısal anomalilere rastlanmamıştır. Sadece foliküler lenfoma olan iki olguda t(12;14;18)(q24;q32;q21) tanımlanmıştır (194,195). Bu translokasyonda da kırık noktaları aynı olmamakla birlikte üç kromozomu kapsamaktadır. 18q21'de lokalize *MALT1, BCL2* genleri tanımlanmış olup ilgili proteinler malignitelerle ilişkilendirilmiştir. Özellikle difüz B hücreli lenfomalarda ve ekstranodal marginal B hücreli lenfomalarla birlikteliği saptanmıştır (196, 197,198, 199). 12q24 bölgesi lösemilerle ilişkilendirilmiş olmakla birlikte ancak henüz bir gen henüz tanımlanmamıştır.

Olgu 5'in bizim çalıştığımız örneğinde 12 metafazda klonal olarak del(6)(q), der(12), add(16)(p) saptanmıştır. Saptanan del(6)(q) değişikliği lenfoid malignitelerle birlikte görülüp litaratürde AML ile ilişkili bir olgu tanımlanmamıştır. Olguda tanımlanan diğer değişiklikler olan der(12), add(16)(p) için de AML ilişkili bir sonuca rastlanılmamıştır. Olgu 5'in *FLT3* ve *NPM1* genleri için yapılan moleküler

çalışmasında Tip A *NPM1* mutasyonu saptadık. Bu mutasyon saptanan olgumuz 16 yaşında ve relaps AML tanısı ile izlenmekteydi. Olgunun çalışılan örnek tarihindeki hemoglobin ve trombosit sayısı düşük, beyaz küre sayısı ise yüksek olarak tespit edilmiştir. Tedavisi protokol 3 olarak uygulanmakta olan olguda relaps gelişti ve remisyona girmeden izlem sırasında eksitus oldu. En sık rastlanan *NPM1* mutasyonu 956.-959. pozisyonda bulunan TCTG tetranükleotidin duplikasyonudur. Vakaların yaklaşık %75-80'inde görülür ve mutasyon A olarak adlandırılır (117, 155). Bizim çalışmamızda da litaratürle uyumlu olarak Tip A mutasyonu saptadık.

NPM1 mutasyonları olan olgularda daha yüksek beyaz kan hücresi sayımı ve tanıda daha yüksek blast yüzdesi gözlenmektedir. AML-NK olgularda NPMc+ hastalardaki trombosit miktarının NPMc- hastalara göre belirgin oranda fazla olduğu gösterilmiştir (164, 169, 171, 173, 174, 178). Bizim olgumuzda da litaratürle uyumlu olarak beyaz küre sayımı yüksek olarak saptanmıştır. Olgumuzda saptanan *NPM1* mutasyonunun iyi prognostik belirteç olarak kabul edilmesine karşın hastada üç farklı yapısal kromozomal yeniden düzenlenmesi olması klinik gidişi açıklayabilir.

Olgu 6'da ise sitogenetik analizde t(15;17) translokasyonu tespit edilmiştir. Birçok pediatrik çalışma serisinde t(15;17) %2-10 oranında tespit edilmekle birlikte daha yüksek oranda görüldüğü çalışmalar da mevcuttur. Yapılan çalışmalarda prognoz üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir. t(15;17) 15. kromozomdaki *promiyelositik lösemi geni (PML)* ile 17. kromozomdaki *retinoik asit reseptör-α (RARα)* geninin füzyonuna yol açar. Bunun sonucunda *PML-RARα* transkriptinin formasyonu oluşur ve bu durum promyelositik safhada matürasyonun durmasına neden olur. ATRA tedavisi ile çocuk ve yetişkinlerde %70-90 kür oranları ile mükemmel sonuçlar elde edilmektedir. t(15;17) kadınlarda biraz daha yaygındır. Daha sık olarak *PML-RARα*'nın bcr2 ve bcr3 izoformu ile birlikte oluşur. Varyant translokasyonlar bildirilmiştir. Bu translokasyonla birlikte ilave genetik anomali olarak trizomi 8 ve daha az sıklıkla i(17)q bulunabilir (192).

t(15;17)'nin çoğunlukla Akut Promiyelositik Lösemi (APL) ile birlikteliği görülmektedir ve daha büyük çocuklarda görülme eğilimindedir. Hastanın

bölümümüzde çalışılan ilk tanı örneği normal sitogenetik kuruluş olarak raporlanmıştır. Olgunun çalışmaya alınan ve daha sonra gelen örneklerinde hem sitogenetik olarak hem de moleküler sitogenetik (90/100) olarak t(15;17) tespit edilmiştir. Son üç örnekte ise sitogenetik ve moleküler sitogenetik sonuçlar normal olarak raporlanmıştır. Moleküler olarak gelen farklı zamanlardaki tüm örneklerde t(15;17) tespit edilmemiştir. Bu durum kırık noktalarının farklılığı ile açıklanabilir. Bu translokasyon klinik olarak daha büyük çocuklarda görülme eğilimindedir. Bizim olgumuz da FAB sınıflamasına göre M3 tanısı almıştı ve 16 yaşında erkek hastadır. FAB sınıflamasına ve yaşa göre litaratürle uyumlu bulunmuştur. COG AAML0531 protokolü tedavisi başlanan olguya 5 kür KT tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrası takiplerinin 3. yılında olan olgu sağlıklı olarak izlenmektedir**.**

Bir olguda (olgu 9) değerlendirilen ilk ve sonraki örneklerinde metafazların tümünde inv(9)(p12q13) saptanmıştır. Perisentrik inv(9) sentromeri içine alan kırılma ve yeniden birleşmeyle ortaya çıkmakta ve Mendeliyen olarak kalıtılmaktadır. Kromozom 9'un perisentrik inversiyon sıklığı genel populasyonda %1-3 (1-1,6) arasında değişmekte olup farklı etnik gruplarda değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda fenotip olarak belirgin özellik göstermemekle birlikte küçük bir kromozomal düzenlenme olarak sınıflandırılmasına rağmen literatürde subfertilite, tekrarlayan düşükler ve anormal klinik bulgularla beraberlik gösterdiğine dair pek çok çalışma gösterilmiştir. Nadir de olsa Adenokarsinom (2 olguda) (200), Bifenotipik Lösemi (2 olguda) (201, 202), KLL (2 olguda) (203, 204) olgularında bildirilmiştir. Olgumuzda saptanan inv(9)'un yapısal olup olmadığının uyarılmış periferik kan kültürü ile gösterilmesi gereklidir. Hasta Bifenotipik Lösemi olarak takip edilmekte olup litaratürde verilen hasta örnekleriyle uyumludur. Litaratürde Bifenotipik Lösemi tanılı inv(9) olan hastalar biri 10 yaşında, diğeri 13 yaşında çocuk hastalardır (201, 202). Ayrıca Olgu 9'da moleküler sitogenetik olarak trizomi 4, trizomi 10, trizomi 17, *MLL* ve *IGH* amplifikasyonu saptanmıştır. Trizomi 4, trizomi 10, trizomi 11 ALL hastalarında iyi prognostik, *MLL* değişikliği ise kötü prognostik belirteçler olarak kabul edilmektedir. Bifenotipik lösemi olarak izlenen hastalarda bu değişikliklerin nasıl bir prognostik etkisinin olduğu ve hastamızda bulunan inv(9)'un buna etkisinin nasıl olacağı

öngörülememektedir. Olgunun çalışılan örnek tarihindeki hemoglobin, beyaz küre ve trombosit sayısı düşük olarak tespit edilmiştir. Yüksek risk ALL protokolü tedavisi başlanan olgunun tedavisi tamamlanmak üzere ve sağlıklı olarak izlenmektedir.

Başka bir olguda ise (olgu 10) farklı zamanlardaki çalışılan kan örneğinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik olarak trizomi 8 ve *MLL* yeniden düzenlenmesi klonal olarak saptanmıştır. Bu olgunun moleküler genetik incelemesi tüm örneklerde normal olarak değerlendirilmiştir. Trizomi 8 pediatrik AML olgularında %5-10 oranında görülmekte olup, ancak DS'lu olgularda daha yüksek oranda görülmektedir (~%27). AML'de trizomi 8 ve monozomi 7 en sık gözlenen kromozomal sayı anomalileridir. Trizomi 8 tüm FAB gruplarında tek sitogenetik anomali olarak veya genellikle tekrarlayan kromozomal anomalilerle birlikte tanımlanmıştır (192).

Trizomi 8'in prognostik önemi tartışmalıdır. Prognoz üzerindeki etkisi orta ve kötü risk grubundadır. Yapılan bir çalışmada agresif durumlarda ikincil bir kromozom değişikliği gibi görülmesinin dışında çocuklarda prognostik önem taşımadığı bildirilmiştir (205). Ancak son yıllarda İsveç Pediatrik Onkoloji Grubunun yaptığı bir çalışmada 84 hastanın 9 tanesinde trizomi 8 tespit edilmiştir. Bu çalışmada trizomi 8'in primer veya sekonder olarak ortaya çıkmasından bağımsız olarak, kötü bir prognostik belirteç olduğu belirtilmiştir (206).

11q23 lokusuna ait yapısal düzensizlikler bu bölgenin başka kromozomlar ile translokasyonları tarzında kendini gösterir, bu yapısal düzensizlikler çocukluk çağı lösemilerinde yaklaşık %14-22 oranında görülür ve kötü prognoz ile ilişkilidir.

Hastanın sitogenetik incelemesinde ek olarak t(1;2)(q21;p2?), der(19) saptanmıştır. 1q21 bölgesi çeşitli malignitelerde tanımlanmıştır. del(2)(q12), AML ve NOS olgularında bildirimiştir (207,208). Ancak t(1;2) şeklinde görüldüğü bir olgu bulunmamaktadır. Ayrıca bu olguda NPM1 22917. lokalizasyondaki nokta mutasyon da saptanmıştır. Hastaya 5 kür KT uygulanmıştır. Daha sonrasında relaps gelişmiş, Antalya'da akraba dışı nakil uygulanmıştır. Şimdi sağlıklı olarak izlenmektedir.

Olgu 11'in sadece ilk örneğindeki sitogenetik incelemede tüm metafazlarda trizomi 22 saptanmıştır. Moleküler genetik ve moleküler sitogenetik sonucu normal olarak değerlendirilmiştir. Sitogenetik incelemenin yapılamadığı örnekte BCR amplifikasyonu saptanmıştır.. Trizomi 22; başta ALL olmak üzere (355 olguda) (211, 212), AML M4 (151 olguda) (213, 214), AML M6 (31 olguda) (215, 216), M7 (28 olguda) (217, 218), M5 alt gruplarında (22 olguda) (219, 220), M2 (76olguda) (217, 221), M1 (36 olguda) (222, 223), M0 (13 olguda) (224, 225), M3 (5 olguda) (226, 227) ve NOS (113 olguda) olgularında tanımlanmıştır (228, 229, 230). Ayrıca trizomi 22, inv(16)'sı olan AML'li olgularda meydana gelen ikincil bir kromozomal değişiklik olarak da tanımlanmıştır. Olgu 11'de moleküler sitogenetik ve moleküler genetik olarak herhangi bir patoloji saptanmamıştır. Bu olgunun tanısı yeni tanı AML ve FAB sınıflamasına göre M4 olarak tanımlanmıştır (231). Literatürle uyumlu olarak trizomi 22 ve M4 AML ilişkisi bu olguda görülmüştür. COG AAML0531 protokolü tedavisi başlanan olgunun 5 kür KT sonrası sağlıklıdır ve takipleri sürmektedir.

Olgu 12 en fazla materyali çalışılan hastalardan biridir. Bu çalışmadaki materyal dahil farklı zamanlardaki 6 kan örneği sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik panellerde normal olarak değerlendirilmiştir. Daha sonraki örneklerde sitogenetik olarak add(2)t(2;16)(q37;q?), t(3;17;16)(p13;q21;q22) ve trizomi 8 gibi değişiklikler saptanmıştır. 2q37'de tanımlanan *SEPT 2* ile ilişkili farklı bir translokasyon (t(2;11)) iki AML M4 hastada bildirilmiştir (232, 233). Aynı bölgeyle ilişkili t(2;22)(q37;q11)'de iki KLL hastasında tanımlanmıştır (234, 235, 236).

AML M6 (2 olgu), M2 (4 olgu), M1(3 olgu), NOS (10 olgu) ve ALL (3 olgu) olgularında add(2)(q37) yapısal sitogenetik patoloji bulunmuştur (220, 229, 237, 238, 239).

3p13 bölgesiyle ilişkili dengeli ve dengesiz çok az sayıda yapısal değişiklik lösemilerde tanımlanmıştır. Ancak 17q21 bölgesinde *RARα* bulunmaktadır. t(15;17)

ile aynı kırık bölgeyi içermektedir. Hastamızda olan üçlü translokasyonda yer alan 16q22 kırık bölgesinde AML'de sık görülen inv(16)/t(16;16) için tipiktir ve *CBFβ* yer almaktadır. Bilinen iki bölgesiyle bu üçlü translokasyon AML gelişmesi ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Moleküler sitogenetik olarak da bir örnekte trizomi 8 (29/100) saptanmıştır. Trizomi 8 AML'li olgularda sık rastlanılan bir anomali olmakla birlikte prognostik etkisi tartışmalıdır (205,206).

Yeni tanı AML ve FAB sınıflamasına göre M0 tanılı hastaya CCG-29-61 protokolü başlanmıştır. Hastaya refrakter AML tanısı ile 4 kür kemoterapi verildikten sonra Haziran 2010 tarihinde allojenik KİT yapılmıştır. KİT sonrası 2. ayında relaps gelişmiştir (Ağustos 2010). Bu tarihten sonra hiç tam remisyon elde edilememiş ve hasta progresif hastalık ile Ekim 2012 tarihinde eksitus olmuştur.

Başka bir olguda (olgu13) klonal monozomi 7 ve trizomi 21 görülmüştür. Olgu 13'ün farklı zamanlarda bölümümüzde çalışılan tüm örneklerinde monozomi 7 saptanmıştır. Moleküler sitogenetik olarak da tüm örneklerde monozomi 7 saptanmıştır (75-99/100). Ayrıca sitogenetik olarak çalışılan iki örnekte i(17) değişikliği de saptanmıştır. Monozomi 7 veya del(7q) pediatrik AML'de %2-7 oranında görülür. Tüm FAB tipleri ile birlikte görülebilmektedir ve genellikle kötü prognoza sahip bir sitogenetik özellik olarak kabul edilmektedir (192).

Son yapılan çalışmalarda del(7q) pediatrik AML'de ara risk grubunda değerlendirilirken monozomi 7 kötü risk grubu olarak değerlendirilmiştir. AML tanısı almış 258 yetişkin ve çocuk hasta üzerinde yapılan çalışmada sitogenetik anomali olarak -7 veya del(7q) sahip hastalarda olumlu prognoz tespit edilmiş ve 5 yıllık hayatta kalma oranı yüksek olarak bulunmuştur. (240).

Monozomi 7 radyoterapi ve alkilleyici ajanlarla tedavi sonrası özellikle t-AML (tedaviyle ilişkili AML)'de daha sık görülür. Bir çalışmada monozomi 7 değişikliğine sahip çocuklarda 5 yıllık hayatta kalma oranı %39 olarak saptanmıştır (240).

Monozomi 7 ile birlikte inv(3)/t(3;3), t(9;22), i(17q) ve +21 gibi ek kazanılmış anomaliler seyrek görülmektedir. Monozomi 7 ve inv(3), -5/del(5q) veya +21 kromozomal değişikliklerle birlikte 5-yıllık hayatta sağ kalım oranı yalnızca % 5 olarak belirlenmiştir. (192, 240, 241).

Trizomi 21'in tek sitogenetik bozukluk olarak görülme sıklığı %1,5-4,6 arasındadır. Fakat genellikle diğer tekrarlayan kromozomal anomalilerle birlikte görülür. Sitogenetik olarak prognoz üzerindeki etkisi ara risk grubu olarak değerlendirilmiş ve lökomogenez ile güçlü ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Trizomi 21 çocukluk çağı AML'lerinde kazanılmış yaygın bir kromozomal kazançtır. DS olmayan AML'lilerde %23-43 oranında rapor edilmiştir. Ayrıca bu çocuklarda öncesinde MDS olduğu belirtilmiştir (242).

İzokromozom 17q başta ALL olmak üzere AML'nin birçok alt grubunda M2 (25 olgu), M4 (18 olgu), M3 (12 olgu), M1 (11 olgu), M7 (4 olgu), M5 (3 olgu), M2 (25 olgu), M0 (10 olgu), M1 (11 olgu), NOS (66 olgu) toplam 160 olguda tanımlanmıştır (229).

Monozomi 7, Fanconi anemisi (FAA) nedeniyle AML veya MDS'ye yatkınlığı olan çocuklarda en yaygın kazanılmış anomalilerden biridir.

Ayrıca monozomi 7, çok nadir görülen familyal pediatrik AML'de karakteristik kazanılmış anomalidir. Bizim olgumuz da FAA zemininde gelişen AML tanısı olarak izlenmiştir.

FAB sınıflamasına göre M0 tanısı almıştır. Hasta CCG-29-61 tedavi protokolü takip edilmiştir. Hasta takipleri sırasında 4 kür kemoterapi almıştır. Tam remisyon sağlanamamış ve progresif hastalıkla Eylül 2010 tarihinde eksitus olmuştur. Monozomi 7 taşıyan AML'li olguların prognozu yapılan birçok çalışmada kötü olarak değerlendirilmiştir. Bizim olgumuzun FAA tanısı ile birlikte görülmesi ve prognozunun kötü olması literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Sitogenetik olarak inv(5)(p11.22p13), t(10;11)(p12;q21) ve i(17)(q10) saptanan

olgu 14'ün moleküler genetik incelemesinde herhangi bir patoloji saptanmamıştır. Litaratürde inv(5)(p11.22p13) değişikliği ile ilgili tanımlanmış bir olgu yoktur. Ancak t(10;11)(p12;q21) ile ilişkili ALL'de 4 olgu, AML M5'de 2 olgu tanımlanmıştır (229, 243, 244, 245, 246) Moleküler sitogenetik incelemesinde çalışmamız kapsamındaki örnek normal olarak değerlendirilmiştir. Fakat daha sonra farklı zamanlarda gelen örneklerde moleküler sitogenetik olarak 17p delesyonu (12/200) ve *RARA* amplifikasyonu (154/200) saptanmıştır. Moleküler sitogenetik analiz sonuçları i(17)(q10) sitogenetik bulgusu ile uyumludur. Bir önceki olguda da belirtildiği gibi i(17)(q10) birçok lösemi tipinde görülmektedir. Hastanın tanısı Bifenotip lösemi olup protokol 3 ile tedavisi başlanılmıştır. Haziran 2010 tarihinde AML tanısı ile KT başlanılmıştır. Toplam 6 kür kemoterapi ardından tedavisi kesilmiştir. Tedavi kesiminin 3. ayında bifenotipik lösemi olarak relaps göstermiştir (Ağustos 2011). Dört kür kemoterapi ile remisyonda iken tedavisi kesilmiştir. Hasta KİT'i kabul etmemiştir Olgunun tedavinin kesilmesinin beşinci ayında 2. relapsı gelişmiştir. Hasta halen kemoterapi almakta ve izlemi devam etmektedir.

Olgu 15'in çalışmaya alınan örneğinde kemik iliğinden yapılan kültür sonucu mtafaz elde edilememiştir. Daha sonra çalışmaya alınan farklı zamandaki örneklerinde sitogenetik olarak kırık noktaları tam belirlenememiş birçok yapısal değişiklik tanımlanmıştır. Kırık noktaları tanımlanamadığı için litaratürle karşılaştırma yapılamamıştır. Olgunun farklı zamanlardaki moleküler sitogenetik incelemesinde *AML1* amplifikasyonu (20/200), *ABL* amplifikasyonu (15/100), *PML* kaybı (73/100), 5p15 bölgesinin kaybı (34/100), trizomi10 (3/200) ve *IGH* amplifikasyonu saptanmıştır. *AML1(RUNX1)* geni 21. kromozomda bulunur ve t(12;21) ve t(8;21) sonucu oluşan füzyon geninde yer alır. Tek başına *AML1* amplifikasyonu prognostik değeri bilinmekle beraber DS'da artmış AML riskleri ile ilişkilendirilebilir. Bu olguda klonal olmakla birlikte kırık noktaları tam tanımlanmayan birçok yapısal yeni düzenlenme saptanmıştır. Ancak tam tanımlanmadıkları için literatürdeki olgularla karşılaştırılamamıştır. Olgu sekonder AML tanısı ile takip edilmiştir. T NHL tanısı ile kemoterapi almakta iken lösemiye transforme olmuştur. İzlemlerinde kemoterapiye refrakter seyretmiş ve mayıs

2011'de progresif hastalıkla eksitus olmuştur.

Olgu 19'un hipodiploid bir klon görülmüş olup, iki metafazda FISH ile teyit edilerek, 7. kromozomun klonal kaybı bildirilmiştir. Moleküler sitogenetik olarak tetrazomi 5 (24/100), tetrazomi 8 (22/100), monozomi 7 (12/100) ve *IGH* amplifikasyonu (8/100) saptanmıştır. Monozomi 7 sonrası ek olarak klonal t(7;12) gelişmiştir. Bu translokasyon da kırık noktalar tam olarak tanımlanmamıştır. Bu olgu yeni tanı AML ve FAB sınıflamasına göre M7 olarak tanımlanmıştır. Hasta takipleri sırasında AML indüksiyon tedavisi sonrası akut gastrointestinal kanama ile Ocak 2012'de eksitus olmuştur. Sitogenetik ve moleküler sitogenetik olarak tespit edilen monozomi 7 AML'li olgularda kötü prognoz kriteri olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Hastanın prognozunun iyi yönde ilerleyememesinin bu sitogenetik bozukluklara bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Olgu 20'de çalışmaya alınan örneğinde sitogenetik olarak normal değerlendirilmiştir. Olgunun farklı zamanlarda çalışılan örneklerinde kompleks karyotip değişiklikler saptanmıştır. Olgunun moleküler sitogenetik olarak *MLL* ve *CCDN1* kaybı ve trizomi 7 saptanmıştır. Sitogenetik olarak normal olarak değerlendirilen ilk örnekleri sonrasında çoklu yapısal değişiklikle birlikte monozomi 7 ve monozomi 11 saptanmıştır. Aynı zamanlı örneğinde FISH ve sitogenetik olarak 12p delesyonu da bulunmuştur. Yeni tanı AML tanısıyla izlenen hastaya CCG-29-61 protokolü başlanmış ve remisyona girmiştir. Hastada 6. ayda relaps gelişmiş ve Temmuz 2012'de eksitus olmuştur.

Olgu 21'de t(1;21)(q31;q22) ve t(6;22)(q24;q12) olmak üzere iki farklı klonal değişiklik saptanmıştır. 1q31 bölgesi nadir olmakla birlikte malignitelerde tanımlanmıştır. 21q22 ise *RUNX1*'in bulunduğu ve lösemilerde birçok translokasyonun tanımlandığı bir bölgedir. Delesyon 6q24 ALL'de, AML'de ve lenfomalarda tanımlanmıştır. 22q12 bölgesinde ise *EWSR1* bulunmaktadır. AML M2 ve bifenotipik lösemide bu bölgenin bulunduğu farklı translokasyonlar tanımlanmıştır.

Olgu 21'in moleküler sitogenetik ve moleküler genetik olarak herhangi bir patoloji saptanmamıştır. Bu olgunun tanısı relaps refrakter AML ve FAB sınıflamasına göre M4 olarak tanımlanmıştır. Dış merkez tanılı hasta hematoloji kliniğine relaps anında başvurmuştur. Nakil yapılan ve nakil sonrası relaps gelişen hasta izlem sırasında eksitus olmuştur.

Olgu 22'nin çalışmamız kapsamındaki örneğinden yapılan sitogenetik incelemede metafaz elde edilememiştir. Moleküler sitogenetik incelemesi de materyal eksikliği nedeniyle yapılamamıştır. Olgunun daha sonraki örneğinde sitogenetik incelemede üç metafaz normal olarak değerlendirilmiştir. Moleküler sitogenetik olarak eş zamanlı incelemesi normal olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu olguda, olgu 10'da tanımlanan *NPM1* 22917. lokalizasyondaki nokta mutasyon saptanmıştır. Bifenotipik Lösemi tanısıyla izlenen olguya 5 kür KT uygulanmış ve sağlıklı olarak takip edilmektedir.

Toplam 23 olgu moleküler genetik ve moleküler sitogenetik olarak da analiz edildi. Moleküler genetik olarak sadece bir olguda (olgu 3) t(8;21) saptandı. Pediatrik AML hastalarında t(8;21) saptanma sıklığı %7-16 olarak verilmektedir. Bu translokasyon sık olarak M2 grubu ile daha nadir olarakta M1 veya M4 grubu AML ile birliktelik göstermektedir. Çalışılan hasta sayısında t(8;21)'in daha fazla saptanması beklenebilirdi. Ancak hastalar arasındaki bifenotipik lösemi tanılı hastaların oranının fazla olması (%26,08) ve t(8;21) değişikliğinin bu grupta nadir görülmesi nedeniyle, bu oranın beklenenden düşük görülmesi açıklanabilir.

Dizi analizi için tasarladığımız primerlerle elde edilen PZR ürünü ekzon 12'nin bir bölümünü ve mutasyonların en sık görüldüğü bölgeyi kapsamaktadır. Dizi analizi yaptığımız 23 olgunun sadece birinde (olgu 5) *NPM1* geninin 12. ekzonunda mutasyon tespit edildi. Ayrıca iki olguda (olgu 10 ve olgu 22) 22917. lokalizasyondaki Adenin'in, Timin ile yerdeğiştirdiği saptandı. Bu noktanın stop kodonundan sonra olması nedeniyle NPM1 protein yapısında ve tanımlı bölgelerinde bir değişiklik yapmayacağı açıktır. Ancak 3'UTR bölgesinde olması nedeniyle gen ekspresyonun kontrolü ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Saptanan noktada

tanımlı bir SNP bulunmamaktadır (209). Ancak bu değişikliğin çalışmamız kapsamındaki 23 olgudan ikisinde saptanmış olması toplumlar arası farkların olabileceğini düşündürmektedir. Bu noktada bir SNP olup olmadığının net olarak söylenebilmesi için popülasyon çalışması yapılması gereklidir. Bulunan bu değişiklik tanımlı miRNA'larla da ilişkilendirilememiştir (210). Bu nedenle hücre düzeyindeki fenotipik etkilerinin nasıl olacağı öngörülememektedir. Immünohistokimyasal olarak analiz edildiğinde NPM1 lokalizasyonuna bakılarak bu değerlendirme yapılabilir.

NPM1 mutasyonlarını taşıyan hastalar genellikle normal karyotipe sahiptir ve tekrarlayan kromozomal anomalilerle birliktelik göstermez (170,188). Bu bulgu yapılan birçok araştırma sonucunda da doğrulanmıştır (169, 188, 167, 168, 177, 165). Bizim olgumuzda bölümümüze farklı zamanlarda toplam 4 kez kemik iliğinden sitogenetik incelemesi yapılmıştır. Sitogenetik inceleme sonrası üç farklı örnekte normal (46,XX) olarak değerlendirilmiştir. Mutasyon çalışması yaptığımız dönemdeki örnekte ise 7 metafaz normal, 12 metafazda ise 46,XX,del(6)(q),der(12), add(16)(p) değişikliği tespit edilmiştir. Olgunun moleküler genetik ve moleküler sitogenetik incelemelerinde herhangi bir patolojiye rastlanmamıştır.

Çalışmalar *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığının artan yaşla yükseldiğini göstermişlerdir. *NPM1* mutasyonlarının AML'deki bu sıklığı yetişkin AML'sinde pediyatrik AML'ye kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir. 4300'den fazla hastayı içeren yetişkin çalışmalarında *NPM1* mutasyonları sıklığının toplamı %31.4 bulunmuştur (%25.4 ile %41 arasında dağılımla). 900'den fazla pediyatrik AML hastasını içeren çalışmalarda ise *NPM1* mutasyonları sıklığının %0-%12 arasında olduğu tespit edilmiştir. Pediatrik grupta NK-AML'de ise %9-26,9 oranında bu mutasyonun bulunduğu gösterilmiştir (156).

Pediyatrik araştırmalardan birinde NPMc+AML'nin sıklığındaki artışın yaş ile paralel olarak arttığı gösterilmiştir. İki büyük pediyatrik araştırmada ise 3 yaş ve üzeri çocuklarda yaklaşık %10 gibi istikrarlı bir görülme sıklığı gösterilmiş olmakla birlikte 3 yaşın altındaki çocuklarda (0/126) *NPM1* mutasyonları bariz bir şekilde tespit edilememiştir (173,174).

NPM1 mutasyonlarının 21 yaşından sonra görülme sıklığının yaşa bağlı olarak arttığı görülmektedir. 21-35 yaşındaki hastaların yaklaşık %15'inde, 35-60 yaşındaki hastaların % 40'ında ve 60 ve daha yukarı yaşlardaki hastaların %50'sinde *NPM1* mutasyonları bulunmuştur. Bu veriler miyeloid kök/progenitör hücre içinde *NPM1* mutasyonu edinme riskinin eklenerek arttığını düşündürmektedir. Küçük çocuklarda *NPM1* mutasyonunun çarpıcı bir şekilde bulunmaması *NPM1* mutasyonu edinimi ve lösemiye ait transformasyon için gereken işbirlikçi mutasyonların edinimi arasındaki gecikmenin seneler içerisinde olduğunu akla getirmektedir. Alternatif olarak küçük çocuklardaki kök/progenitor hücrelerin *NPM1* mutasyonlarına karşı nispeten daha dayanıklı olabileceği ileri sürülmektedir (247).

Yapılan çalışmalarda tüm AML vakalarının yaklaşık %35'inde *NPM1* gen mutasyonlarının söz konusu olduğu ve bu mutasyonları taşıyan AML vakalarının %60'ından fazlasının normal karyotipe sahip olduğu rapor edilmiştir (165, 167, 169, 168, 170, 177, 188). Çin ve Japon AML hastalarının dahil edildiği çalışmalarda mutasyon sıklıklarının %14.3-28.2 aralığında değişim gösterdiği ve Batı toplumlarına oranla daha düşük olduğu bildirilmiştir (155, 167, 209).

Asya toplumunda yapılan çalışmada *NPM1* mutasyonunun düşük görülme sıklığı nedeniyle bu mutasyonda etnik ya da coğrafik farklılıkların etkili olabileceği ileri sürülmüştür. Bir araştırmada NK-AML'li 33 Japon pediyatrik hastada hiçbir *NPM1* mutasyonu saptanmamıştır (172). Tayvanlı çocuklarda yürütülmüş olan diğer bir araştırmada *NPM1* mutasyonlarının görülme sıklığı sadece %2.1 olarak bulunmuştur (173).

NPM1 mutasyonu edinme riskinin yaşla birlikte eklenerek arttığı düşünülürse pediatrik grupta insidansının daha düşük olduğu yapılan diğer çalışmalarda da gösterilmiştir. Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, etnik köken ve coğrafik dağılıma bağlı olarak *NPM1* mutasyon sıklıklarının değişim gösterebileceği ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda bölgesel ve ülkesel farklılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır (156).

NPM1 mutasyonlarının AML'nin tüm FAB morfolojik alt grupları ile ilişkili olduğu gösterilmekle beraber yetişkinlerle yapılan çalışmalarda *NPM1* mutasyonları büyük sıklıkla M4 ve M5 AML gruplarıyla birliktedir (164, 169, 171, 173, 174).

Çocuklarda bu dağılım bir dereceye kadar farklıdır. AML'li 107 çocukla yapılmış bir araştırmada *NPM1* mutasyonları M1'li hastaların 1/21'inde, M2'lilerin 2/19'unda, M5'lilerin 0/18'inde ve M6'lıların 1/3'ünde bulunmuştur (175). Diğer pediyatrik çalışmalar M5 AML'sinde *NPM1* mutasyonlarının bulunmadığını da bulmuşlardır (169, 180). Yapılan çalışmalarda M3 AML'li yalnızca bir hastanın *NPM1* mutasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (171).

Bizim çalışmamızda da M5 grubunda hastamızın olmaması ve M4 grubunda 3 hastamızın olması nedeniyle mutasyon sıklığı düşük olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda pediatrik çalışmalarda yapılan *NPM1* mutasyonu FAB grubu dağılımı çalışmamızda aynı alt grubta sayısının az olması ve WHO sınıflamasına göre bifenotipik hasta grubunun fazla olması nedeniyle sağlıklı olarak değerlendirilmemiştir.

NPM1 mutasyonu için yapılan çalışmalarda kadınlarda erkeklere göre önemli derecede daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu kadın üstünlüğü pediyatrik populasyonlarda da bulunmuştur (165, 169, 173, 188).

Bizim yaptığımız çalışmada da mutasyon tespit ettiğimiz olgu 16 yaşında ve bir kız çocuğudur. Mutasyon saptanan olgunun cinsiyet ve yaş olarak analiz edildiğinde litaratürle uyumlu olduğu tespit edildi.

NPM1 mutasyonları olan olgularda daha yüksek beyaz kan hücresi sayımı ve tanıda daha yüksek blast yüzdesi gözlenmektedir. Bizim mutasyon saptadığımız olguda da litarütürle uyumlu olarak beyaz küre sayısı yüksek olarak tespit edilmiştir. AML-NK olgularda NPMc+ hastalardaki trombosit miktarının NPMc- hastalara göre belirgin oranda fazla olduğu gösterilmiştir (164, 169, 171, 173, 174, 178). Bu klinik gözlemi destekler biçimde; K562 hücrelerinin *NPM1* mutant transfeksiyonundan

sonra megakaryositik diferansiasyon yeteneğinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca NPMc+ AML-NK olguların, *NPM1* mutasyonları olmayan AML-NK olgularına kıyasla daha fazla ekstramedüller (gingival hiperplazi ve lenfadenopati) tutulumla ilişkili olduğu gösterilmiştir (178). Ekstramedüller tutulum AML hastaları içinde en sık M4 ve M5 alt grublarında görülmektedir. NPMc+ AML-NK olgularında ekstramedüller tutulumun fazla olması zaten bu alt gruplarda bu mutasyonun fazla görülmesi ile ilişkilendirilmiştir (182,184).

NPM1 gen mutasyonları genellikle ekzon 12 ile sınırlıdır. %95 'ten fazlası 960. nükleotit pozisyonunda olmakla birlikte, AML hastalarında bugüne kadar *NPM1* mutasyonlarının yaklaşık 55 moleküler varyantı tanımlanmıştır. En sık rastlanan *NPM1* mutasyonu 956.-959. pozisyonda bulunan TCTG tetranükleotidin duplikasyonudur (TipA) ve yetişkin NPMc+ AML olgularının %75-80'ine karşılık gelmektedir. Bizim tespit ettiğimiz mutasyon da Tip A mutasyonu olup, yapılan çalışmalarda bu tipin NPM1 mutasyonlarındaki görülme sıklığı göz önünde bulundurulduğunda litaratürle uyumlu olarak yorumlanmıştır (117, 155, 182).

Bizim yaptığımız çalışmada pediatrik AML tanısı almış 23 olgudan bir tanesinde *NPM1* mutasyonu tespit ettik. Mutasyon sıklığı çalışmamıza göre %4,35 olarak tespit edildi. Çalışmamızda iki olguda (olgu 10 ve olgu 22) saptanan aynı missense mutasyon tanımlı olmadığı için bu değerlendirmeye alınmamıştır. Yapılan çalışmalarda pediatrik hastalarda *NPM1* mutasyon sıklığı %0-12 arasında görülmekte olup sonucumuz litaratürle uyumlu olarak bulunmuştur. Ülkemizde pediatrik AML tanılı hastalarda NPM1 mutasyon sıklığının araştırıldığı başka bir çalışma olmadığı için litaratüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Hasta sayımızın yeterli olmadığı düşünülerek ülkemizde bu mutasyonun pediatrik AML olgularında sıklığını ve prognoz üzerindeki etkisini araştırmak için daha çok sayıda hasta grubları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Aktive edici FMS benzeri tirozin kinaz 3 (*FLT3*) mutasyonları yeni tanı AML vakalarının yaklaşık %25-30'unda saptanmaktadır. Bu mutasyonlar AML'de prognozu belirleyici en önemli moleküler belirteçlerden biridir. Bu mutasyonların en

yaygın olanı reseptörün jukstamembran bölgesinde yerleşik olan ve yaklaşık %20-25 sıklıkla görülen internal tandem duplikasyon *(FLT3*/ITD) mutasyonlarıdır. Bundan başka, daha az sıklıkla görülen tirozin kinaz domainde görülen (yaklaşık %5-7) nokta mutasyonları (*FLT3*-TKD) da vardır. *FLT3*/ITD mutasyonu bulunan AML'lerin klinik özellikleri arasında, normal sitogenetik, lökositoz ve monositik farklılaşma sayılabilir. *FLT3*/ITD mutasyonları artmış relaps oranı ve genel sağ kalım süresinde azalma ile ilişkilidir. Pediatrik vakalarda, ITD mutasyonu negatif ve bağımsız prognoz belirtecidir.

2012 yılında yayınlanan çalışmada *FLT3*-ITD mutasyonlarının yetişkin AML vakalarında görülme sıklığı %20-40 (normal karyotipli olgularda ~%50) pediatrik AML'li olgularda ise %10 (normal karyotipli olgularda %18) olarak bulunmuştur (43). *FLT3*-TKD mutasyonları ise yetişkin AML olgularında %7 oranında görülürken pediyatrik AML'de bu oran %3,3-6,7 olarak belirtilmiştir (54, 93, 94, 95, 97, 98).

FLT3-ITD malign hücre bazlı morfolojik sınıflama olan FAB sınıflamasında en sık M3 (promyelositik) alt tipi ile birlikteliği saptanmıştır. Ancak yapılan çalışmaların genelinde, *FLT3*-ITD mutasyonlarının tüm diğer FAB alt tipleri boyunca dengeli bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir. İki grup M5 alt tipinde *FLT3* geni mutasyonlarının artmış insidansını not etmiştir. Çalışmalardan birinde özellikle M5b alt grubu için önemli derecede yüksek bir insidans (%28,8) verilmiştir. *FLT3* geni mutasyonlarının özellikle M3 grubuyla ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda bizim çalışmamızda M3 grubunda bir hastanın olması, M5 grubunda ise hastamızın olmaması ve bifenotipik lösemi hastalarının çoğunluğu oluşturduğu göz önüne alındığında mutasyon saptanamaması bununla açıklanabilir. Daha fazla sayıda ve uygun ön tanılı hasta ile çalışıldığında mutasyon saptama olasılığının artacağını düşünmekteyiz (82, 95).

Yaptığımız çalışmada *FLT3*-ITD ve TKD mutasyonu saptanmamıştır. Bu sonuç litaratürlerle uyumlu olmamakla birlikte yapılan diğer çalışmalarda Türk toplumunda bu mutasyonların daha düşük bir insidansla seyrettiği görülmektedir.

Ayrıca mutasyonların sıklığında bölgesel farklılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır. Çoşkunpınar ve arkadaşlarının çalışmasında 50 kişilik pediatrik AML tanılı hastada *FLT*3-ITD mutasyonu taşıyan 2 olgu (%4 oranında), *FLT3*-TKD mutasyonu taşıyan 1 olgu (%2 oranında) tespit edilmiştir. Bu çalışmada bir hastanın hem *FLT3*-ITD hem de *FLT3*-TKD mutasyonunu taşımaktadır (248).

Bu olguda FAB sınıflamasına göre M3 tanısı almıştı ve yine bu olguda t(15;17) translokasyonu mevcuttu. Karabacak ve arkadaşları ise 40 tane pediatrik AML tanılı hastanın 9 tanesinde *FLT3*-ITD mutasyonu (%22,5) tespit etmişlerdir (249).

FLT3-TKD mutasyonu taşıyan olgu bulunmamıştır (%0). Çalışmamızda AML vaka sayısının sınırlı olması bu durumu açıklamaktadır.

Bu çalışmamızda 2007-2012 yılları arasında pediatrik hematoloji ve onkoloji kliniklerinden polikliniğimize yönlendirilen yeni tanı veya relapsda 23 kişilik pediatrik AML hastasında *FLT3* ve *NPM1* genlerinin mutasyonlarını araştırdık. *NPM1* mutasyonunun tespiti için dizi analizi, *FLT3* mutasyonları için PCR ve RFLP yöntemleri kullanıldı. *FLT3* (ITD ve TKD) geni mutasyonları hiçbir hastamızda tespit edilemedi. Çıkan sonuçlar bu hastaların rutin olarak yapılmış olan sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçları ve hastaların klinik özellikleri ile birlikte değerlendirildi.

NPM1 mutasyonları ağırlıklı olarak NK-AML grubunda gözlenmektedir. Ayrıca *FLT3* gen mutasyonları da normal karyotipli AML vakalarında oldukça sık rastlanan değişimlerdendir. Bizim çalışmamızda AML tanılı 23 olgunun sadece 6 tanesinde sayısal ve yapısal olarak normal karyotip tespit edilmiştir. Bu mutasyonların görülme sıklığının NK-AML 'li olgularda sık olduğu göz önüne alınırsa çalışmamızdaki FLT3 mutasyonunun tespit edilmemesini açıklayacak bir sebep olarak gözükmektedir. NK-AML tanılı hasta sayısının yeterli olmaması nedeniyle daha fazla sayıda normal karyotipe sahip AML tanılı olgularla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

FLT3 ve *NPM1* genlerinin mutasyonlarının prognostik önemi bilinmekle beraber bu mutasyonlarla birlikte sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçların hepsinin birlikte değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma aynı zamanda ülkemizde çocukluk çağı AML'li olgularda *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının birlikte araştırıldığı bir çalışma olmuştur. Ayrıca 2 olguda saptanan nokta mutasyonu ilk defa tanımlanmıştır. Hasta sayımızın planladığımız şekilde olmaması nedeniyle daha büyük hasta gruplarıyla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Pediatrik AML tanılı olgularda *FLT3* ve *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını Türk toplumunda belirlemeyi hedefleyen çalışma olması nedeniyle önemlidir ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Yeni tanı almış veya relapstaki çocukluk çağı AML hastalarında saptanan tanımlı diagnostik veya prognostik genetik değişikliklerle *FLT3* ve *NPM1* geni mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesinin amaçlandığı araştırmamızda; 2007-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (A.Ü.T.F.) Pediatrik Hematoloji ve Pediatrik Onkoloji kliniklerinden; sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik testlerin çalışılması için bölümümüze gönderilen AML tanısı almış hastalara ait kemik iliği veya periferik kan örneklerinde yapılan *FLT3* ve *NPM1* genlerinin mutasyonları çalışması sonucunda;

1-Yeni tanı veya relaps akut myeloid lösemi tanılı 23 hastanın kan/kemik iliği örneklerinden çalışma yapıldı. Çalışma grubundaki hastaların yaş aralığı 0-16'dır (ort.:8,869 ± 5,251), 12 erkek (%52,17) ve 11 kız (%42,83) hasta bulunmaktadır.

2- Çalışmamıza alınan toplam 23 olgunun sitogenetik analizi yapılmıştır. Hücre kültüründe üreme olan 16 olgunun 6 tanesinde sayısal ve yapısal olarak normal karyotip tespit edilmiştir. Çalışma yaptığımız 23 pediatrik AML hasta grubunda metafaz elde edilen olgular dikkate alındığında, normal karyotip (NK) oranı %37,05 olarak tespit edildi.

3-Çalışmaya alınan hastalar FAB/WHO sınıflamasına göre grublandırılmıştır. AML M0 %13,04 oranında; AML M2 %8,69; AML M3 %4,34; AML M4 %13,04; AML M6 %4,34; AML M7 %8,69; Bifenotipik lösemi %26,08, sekonder lösemi %8,69 ve sınıflaması olmayan grup %13,04 olarak tespit edilmiştir. Buna göre en fazla bifenotipik lösemi tanısı alan hasta grubu olduğu gözlendi.

4- Araştırma kapsamındaki 23 olgunun hiçbirinde *FLT3*-ITD ve *FLT3*-TKD mutasyonu saptanmadı.

5- Çalışma kapsamında 23 olgudan birinde Tip A *NPM1* mutasyonu saptandı. Çalıştığımız pediatrik AML grubuda *NPM1* mutasyon sıklığını %4,34 olarak tespit edildi.

6- 23 olgudan iki tanesinde *NPM1* 22917. lokalizasyonda aynı nokta mutasyonu saptandı. Bu değişiklik protein yapısı içinde bulunmamakla birlikte 3'UTR bölgesinde olması nedeniyle incelendi ancak *NPM1* geni için tanımlı SNP ve miRNAlar ile ilişkilendirilemedi.

7- Çalışmamızda mutasyon oranınının düşük olarak saptanması; toplam hasta sayısının ve aynı yaş grubundaki ve AML alt grubundaki olguların az olması ile açıklanabilir.

Çalışmamız pediyatrik AML tanılı olgularda *FLT3* ve *NPM1* gen mutasyon sıklıklarını Türk toplumunda belirlemeyi hedefleyen bir çalışma olması nedeniyle önemlidir ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Pediyatrik AML Hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase 3 (*FLT3*) ve Nücleophosmin1 (*NPM1*) Mutasyonları

Akut lösemiler çocukluk çağı kanserleri içinde ölümcül etkisi bilinen en yaygın hastalıklardandır. Akut Myeloid Lösemi (AML) miyeloid, eritroid, megakaryositik ve monositik hücre dizi öncülerinin çoklu gen mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmelerinden kaynaklanan bir heterojen lösemi grubudur. AML çocukluk çağı lösemilerinin %15-20'sini oluşturur. Tedavi üzerindeki yoğun çalışmalara rağmen 5 yıl hastalıksız sağ kalım oranı %50'ler civarındadır. Lösemi tedavisinde daha iyi sonuçlar elde etmek için öncelikle hastalığın patogenezinin üzerinde çalışılması gerektiği belirtilmektedir. Bu araştırmalarda saptanan belli mutasyonlar hem hastalığın nedenlerinin anlaşılması hem de asıl amaç olan tedavi için yeni fırsatlar sunmaktadır.

Pediatrik AML'de Fms-benzeri tirozin kinaz 3 (*FLT3)* ve nükleofosmin *(NPM1)* genlerinin mutasyonlarının çocukluk çağı AML'sinde tek başına sağ kalım ve tedavi düzenlenmesindeki etkisi belirlenmiştir. *FLT3* gen mutasyonu pediatrik AML'de en sık görülen mutasyonlardan biri olup sıklığı %25-30 arasındadır. FLT3 hematopetik öncü hücrelerde eksprese olur ve hematopoezde önemli rol oynar. *FLT3* gen mutasyonuna sahip hastalar daha yüksek tekrarlama riski ve daha düşük sağ kalım oranına sahiptirler. Nükleofosmin (*NPM1*) geni mutasyonu yetişkin AML'li olgularda %50-60 oranında görülürken pediatrik AML'de bu oran %0-12 arasındadır. NPM1 multifonksiyonel, nükleositoplazmik mekik dokuyan bir protein olup, genomik yapının sürdürülmesinde önemli görevleri vardır. NPM1 mutasyonuna sahip hastalar daha düşük tekrarlama riski ve daha yüksek sağ kalım oranına sahiptir.

Bu çalışmadaki amacımız; 2007-2012 yılları arasında pediyatrik hematoloji ve onkoloji kliniklerinden polikliniğimize yönlendirilen yeni tanı veya relaps tanısı almış 23 kişilik pediatrik AML hastasında *FLT3* ve *NPM1* genlerinin

mutasyonlarının sıklığını araştırmaktır. Elde edilen sonuçlar tez kapsamında rutin olarak yapılmış olan sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçları ile birlikte değerlendirilerek hastaların klinik özellikleri ile ilişkilendirildi. *FLT3* ve *NPM1* genlerinin mutasyonlarının prognostik önemi bilinmekle beraber bu mutasyonlarla birlikte sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik sonuçların hepsinin birlikte değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada yeni tanı veya relaps AML tanısı almış 23 çocuk hastasına ait kan veya kemik iliği örneğinde *NPM1* mutasyonunun tespiti için dizi analizi, *FLT3*-ITD için PZR ve *FLT3* –TKD mutasyonu için RFLP yöntemleri kullanıldı.

Çalışmamızda *FLT3*-ITD ve *FLT3*-TKD mutasyonu hiçbir olguda tespit edilmedi. *NPM1* mutasyonu ise bir olguda tespit edilmiş olup mutasyon sıklığı %4,35 oranında bulunmuştur. Ayrıca iki olguda aynı *NPM1* 22917. lokalizasyonda aynı nokta mutasyon saptandı. Genin 3'UTR bölgesindeki bu değişiklik, tanımlı SNP ve miRNA'larla ilişkilendirilemediğinden hücre düzeyindeki fenotipik etkisi öngörülememiştir. Bu çalışma aynı zamanda ülkemizde çocukluk çağı AML'li olgularda *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının birlikte araştırıldığı bir çalışmadır. Bu çalışmanın ülkemizde AML hastalarının izleminde *FLT3* ve *NPM1* mutasyonlarının varlığının araştırılması ve sonuç olarak hastaların tedavilerinin belirlenmesine yol gösterici olarak önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NPM1*, Pediyatrik Akut Myeloid Lösemi,

ABSTRACT

Fms-Like Thyrosine Kinase 3 (*FLT3*) And Nucleophosmin 1 (*NPM1*) Mutations In Pediatric AML

Acute leukemias are one of the most common diseases among the childhood cancers of which mortal effects are known. Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous leukemia group that can stem from multiple gene mutations and chromosomal rearrangements of myeloid, erythroid, megakaryocytic and monocytic cell line precursors. AML constitute 15-20% of childhood leukemias. Despite the intensive efforts on treatment, 5-year disease-free survival rate is around 50%. To acquire better results on leukemia treatment, first of all the disease pathogenesis must be studied on. Therefore certain mutations assigned on leukemia pathogenesis offer new opportunities for both understanding the causes of disease and also for the treatment which is the main aim.

The effect of Fms-like thyrosine kinase 3 (*FLT3*) and nucleophosmin (*NPM1*) gene mutations in pediatric AML in terms of survival and treatment arrangement was determined. FLT3 is the most frequent mutation in pediatric AML and its frequency is between 25-30%. *FLT3* is expressed in hematopoietic precursor cells and plays important role in hematopoiesis. Patients that have *FLT3* gene mutations have higher recurrence risks and lower survival rates. While nucleophosmin (*NPM1*) gene mutation is observed at 50-60% in adult AML cases, in pediatric AML cases this rate is between 0-12%. This is a multifunctional nucleocytoplasmic shuttling protein which has important roles at maintaining genomic structure. Patients that have *NPM1* mutations have lower recurrence rates and higher survival rates.

Our aim in this study is the investigation of the frequencies of *FLT3* and *NPM1* gene mutations at 23 newly diagnosed or relaps diagnosed pediatric AML patients oriented from pediatric hematology and oncology clinics between the years 2007-2012. Routinely made cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics results of these patients have been assessed together with the determined mutations

and have been associated with the clinical features of patients. Though the prognostic significances of *FLT3* and *NPM1* gene mutations are known, there is yet no study in which cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics results were all together evaluated with these mutations. In this study for the purpose of determination of *NPM1* gene mutations at 23 newly diagnosed or relaps diagnosed pediatric AML patients sequence analysis, PZR method for *FLT*-3 ITD and RFLP method for *FLT3* –TKD mutation have been used.

In this study, in no case *FLT3*-ITD and *FLT3*-TKD mutation have been determined. In one case NPM1 mutation has been determined and its frequency has been found as 4,35%. In addition in two cases, same spot mutation has been determined in the same NPM1 22917 localisation. Since the difference in the 3'UTR region of the gene has not been correlated with the defined SNP and miRNAs, phenotypically affect at cell level could not been proposed. This is study of searching *FLT3* and *NPM1* mutations together in cases with pediatric AML. This study is considered to provide important contributions and guidance for observation of the patients for investigating the existence of *FLT3* and *NPM1* mutations and consequently for determining the treatments of patients.

Key Words: Childhood acute myeloid leukemia; *FTL3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NPM1*

KAYNAKLAR

1. Turgeon M. L. 1999 Clinical Hematology, Theory and procedures, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, third edition, page: 213-4.

2. Beutler E ve arkadaşları 1995.

3. Sigerist HE. The historical development of the pathology and therapy of cancer. In: Marti-Ibanez F, editor. On the history of medicine. New York: MD Publications Inc; 1960. p. 59-65.

4. Elif Atıcı, Tıp tarihinde kanser ve lösemi, Türk Onkoloji Dergisi 2007;22(4):197-204.

5. Ulutin ON. Hematoloji. In: Unat EK, editor. Dünya'da ve Türkiye'de 1850 yılından sonra tıp dallarındaki ilerlemelerin tarihi. İstanbul: Cerrahpafla Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları No: 4; 1988. p. 191-7.

6. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol 2000;110(1):2-11.

7. Hamblin T. Historical aspects of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2000; 111(4): 1023-34.

8. Piller G. Leukaemia- a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol 2001;112(2):282-92.

9. Holyoake DT. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. Br J Haematol 2001;113(1):11-13.

10. Ulutin ON. Cumhuriyetin 50. yılında Türk hematolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fak Derg.1973;4(4):375-7.

11. Akıncı S. Dünyaya ün salan bir hekimimiz. Hayat Tarih Mecmuası 1967;12: 26-30.

12. Robert J. Arceci, Ian M. Hann, Owen P. Smith, *Pediatric Hematology, Third Edition*, Blackwell Publishing Ltd;2006.pp360-375.

13. C.Yakıcıer, Lösemilerin Moleküler Genetiği, TEMEL MOLEKÜLER HEMATOLOJİ KURSU, 2005.

14. Shinichiro Takahashi, Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia, BioMed Central, 2011.

15. Çocuk ve Ergenlerde AML tanı ve tedavi Kılavuzu, 2011, Türk Hematoloji Derneği.

16. Liesveld JL, Litchman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J, editor. Williams Hematolog, 7th ed. USA: Mac Graw Hill;2006. pp.1183-1210.

17. Dash A, Gilland D.G. Molecular genetics of acute myeloid leukemia. Best pract Res Clin Heamatology. 2001, p. 49-64.

18. Cherie H. Dunphy, MD Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology Arch Pathol Lab Med—Vol 128, September 2004.

19. Rogelio Paredes-Aguilera, Lina Romero-Guzman, Norma Lopez-Santiago et al: Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in the Diagnosis of Acute Leukemia American Journal of Hematology 68:69–74 (2001).

20. Immunophenotypes in Patients With Acute Myeloid Leukemia Between Diagnosis and Relapse: Comparison With Cytomorphologic, Cytogenetic, and Molecular Genetic Findings Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 62B:25–38 (2004).

21. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004, pp:2063-76.

22. Özkalemkaş F. Akut lösemiler, İç Hastalıkları Kitabı, Ed. Dolar E, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul, 2005,s: 576.

23. Redner A. Leukemias. In: Lanzkowsky P, ed. Manual of pediatric hematology and oncology.4th edition. San Diego: Elseiver Academic pres; 2005; p: 415.

24. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, Septembert 15-17, 1986.

25. Second MIC Cooperative Study Group. Cancer Genet Cytogenet 1988; 30: 1-15.

26. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals fort he immunological classification of acute leukemias. European Group fort he Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995; 9: 1783-6.

27. Legnad O, Perrot JY, Baudard M, et al. The immunophenotype of 117 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. Blood 2000;98: 870-7.

28. Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. Leuk Res 1998;22: 567-79.

29. Consensual Europen Immunophenotyping Panels for Leukemia, 2005,European Leukemia,2005.

30. James W. Vardiman, Nancy Lee Harris and Richard D. Brunning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms 2002.

31. National Cancer Institute. Adult acute myeloid Leukemia. Mednews (internette) 2007. Erisim 07.17.2007, http:/www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/.

32. Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG, 1997: Molecular Biyology of acute myeloid leukemia. Semin Oncol. 24(1): 32-44.

33. Brunning RD,Matutes E, Haris NL, et al.:Acute myeloid leukemia: introductionIn: Jaffe ES, Haris NL;Stein H, et al.eds:Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues,Lyon ,France:IARC pres, 2001, World Health,Organization classificationof tumours ,3, pp 89-91.

34. Bloomfield C.D., Lawrence D, Byrd J.C,et al, 1998: Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification of acute myeloid leukemiavaries by cytogenetic subtype. Canser Res. 58(18) :4173-9.

35. Byrd JC, Mrozek K,Dodge RK, et al, 2002: Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of indüktion success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de nova acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B(CALGB 8461). Blood 100 (13): 4325-36.

36. Dr. Elif Akdoğan, Dr. Serdar Bedii Omay, Akut Promyelositik Lösemi Tedavisi, Türk Hematoloji Derneği Klavuzu.

37. Jansen JH, Löwenberg B: Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RAR-αfusion protein. Semin Hematol. 38(1) :37-41, 2001.

38. Rıdvan Ali. Classification and differential diagnosis of the acute leukemias. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007, 3(2).

39. Sırma, S. Akut Myeloid Lösemi Etiyolojisinde MN1 Geninin Rolü. İstanbul Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD., İstanbul. 2007.

40. Leone G,Voso MT, Sica S,et al, 2001: Therapy related leukemias: susceptiblty

prevention and treatment. Leuk. Lymphoma 41 (3-4):255-76.

41. Pizzo, Philip A.; Poplack, David G. ,Principles & Practice of Pediatric Oncology, 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins Copyright Â©2006.

42. James M. Foran, New Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Perspective from the Clinic, American Society of Hematology,2010.

43. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel,2012 Blood, Ursula Creutzig Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Brenda Gibson, Michael N. Dworzak, Souichi,2012.

44. Rosmarin AG, Yang Z ve Resendes KK. Transcriptional regulation of myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differantion and leukemogenesis. *Exp Hematol* 2005.

45. Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics. *PNAS* 2003;100:11842-11849.

46. Aleksandra Wodnar-Filipowicz, *Flt3* Ligand: Role in Control of Hematopoietic and Immune Functions of the Bone Marrow, Department of Research, University Hospital Basel, CH-4031 Basel, Switzerland 2003.

47. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT-3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood. Jan 1 2002; 99(1):310-318.

48. Strout MP, Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Core-binding factor (CBF) and MLLassociated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications. Ann Hematol. Jun 1999; 78(6):251-264.

49. Perry M. Chan, Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model, Protein & Cell 2011, 2(2): 108–115.

50. Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT-3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. Blood. Mar 1 2004; 103(5):1883-1890.

51. Schwable J, Choudhary C, Thiede C, Tickenbrock L, Sargin B, Steur C, Rehage M, Rudat A, Brandts C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. RGS2 is an

important target gene of FLT-3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation. Blood. Mar 1 2005; 105(5):2107-2114.

52. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, Kastelein R, Hudak S, Wagner J, Mattson J. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. Nature. Apr 14 1994; 368(6472):643-648.

53. Chklovskaia E, Jansen W, Nissen C, Lyman SD, Rahner C, Landmann L, Wodnar-Filipowicz A. Mechanism of FLT3 ligand expression in bone marrow failure: translocation from intracellular stores to the surface of T lymphocytes after chemotherapy-induced suppression of hematopoiesis. Blood. Apr 15 1999; 93(8):2595-2604.

54. Soheil Meshinchi, Todd A. Alonzo, Derek L. Stirewalt, Michel Zwaan, Martin Zimmerman, Dirk Reinhardt, Gertjan J. L. Kaspers, Nyla A. Heerema, Robert Gerbing, Beverly J. Lange, and Jerald P. Radich Clinical implications of *FLT3* mutations in pediatric AML; 2006 by The American Society of Hematology.

55. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell 1993; 75: 1157–1167.

56. Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS et al. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. Blood 1994.

57. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. Mice lacking FLT-3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood. Jun 1 2000; 95(11):3489-3497.

58. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in FLT-3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. J Exp Med. Nov 1 1996; 184(5):1953-1962.

59. Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of

granulocyte/macrophage colonystimulating factor. J Exp Med. Dec 1 1996; 184(6):2185-2196.

60. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ. In vivo generation of human dendritic cell subsets by FLT-3 ligand. Blood. Aug 1 2000; 96(3):878-884.

61. Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. Stem Cells. 2006; 24(5):1174-84.

62. Ebihara Y, Tsuji K, Lyman SD, Sui X, Yoshida M, Muraoka K, Yamada K, Tanaka R, Nakahata T. Synergistic action of FLT-3 and gp130 signalings in human hematopoiesis. Blood. 1997; 90(11):4363-4368.

63. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P et al. STK-1, the human homolog of Flk2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. 1994

64. Gotze KS, Ramirez M, Tabor K, Small D, Matthews W, Civin CI. Flt3high and Flt3low CD34+ progenitor cells isolated from human bone marrow are functionally distinct. Blood1999.

65. A. Lale Doğan, Dicle Güç, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:34-42.

66. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature 2001; 411:355-64.

67. M Levis and D Small1, FLT3: ITDoes matter in leukemia, Leukemia (2003) 17, 1738–1752 & 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/03

68. Shinichiro Takahashi, Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications, Journal of Hematology & Oncology 2011, 4:13

69. Perry M. Chan, Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model , Protein& Cell 2011, 2(2): 108–115

70. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT-3 by the juxtamembrane domain. Mol Cell. Jan 30 2004;13(2):169-178.

71. R Swords, C Freeman, and F Giles, Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in

acute myeloid leukemia, Leukemia (2012) 26, 2176–2185

72. Dosil M, Wang S, Lemischka IR. Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/FLT-3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. Mol Cell Biol. Oct 1993; 13(10):6572-6585.

73. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, Leonard WJ, Broxmeyer HE. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for FLT-3- dependent signaling. J Exp Med.Sep 4 2000; 192(5):719-728.

74. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of FLT-3+ lymphomyeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell. Apr 22 2005; 121(2):295-306.

75. Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SE. Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. Blood 2003.

76. Adolfsson, J., R. Mansson, et al. (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell **121**(2): 295-306.

77. Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC et al. FLT3 ligand (FL) causes autocrine signaling in AML cells. 2003.

78. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. Blood 1996.

79. Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. Leukemia 1996.

80. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996.

81. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT.

Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. Br J Haematol 2001.

82. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT-3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood. Jul 1 2002; 100(1):59-66.

83. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT. FLT-3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. Br J Haematol. Oct 2000; 111(1):190-195.

84. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. Oncogene 2002; 21: 2555-2563.

85. Hubbard SR. Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. Mol Cell 2001.

86. Till JH, Ablooglu AJ, Frankel M, Bishop SM, Kohanski RA, Hubbard SR. Crystallographic and solution studies of an activationloop mutant of the insulin receptor tyrosine kinase: insightsinto kinase mechanism. J Biol Chem 2001; 276: 10049–10055.

87. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by Germline Mutations of MEN2A and MEN2B. Science 1995; 267: 381–383.

88. Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, Larizza L, Cairoli R, Morra E et al. C-kit mutations in core binding factor leukemias. Blood 2000; 95: 726–727.

89. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. Proc Natl Acad Sci USA.

90. Jiang J, Paez JG, Lee JC et al. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. Blood 2004; 104:1855–1858.

91. Hubbard SR. Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. Mol Cell 2001.

92. Till JH, Ablooglu AJ, Frankel M, Bishop SM, Kohanski RA, Hubbard SR. Crystallographic and solution studies of an activationloop mutant of the insulin receptor tyrosine kinase: insightsinto kinase mechanism. J Biol Chem 2001; 276: 10049–10055.

93. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001; 97: 2434–2439.

94. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2001; 113: 983–988.

95. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002.

96. D-C Liang, L-Y Shih, I-J Hung, C-P Yang, S-H Chen1, T-H Jaing3, H-C Liu1, L-Y Wang1 and W-H Chang.,FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia,Blood,2003.

97. Ekchol Mukda, Katsarin Pintaraks, Rachchadol Sawangpanich, Surapon Wiangnon, Samart Pakakasama, FLT3 and NPM1 Gene Mutations in Childhood Acute Myeloblastic Leukemia, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 12, 2011

98. Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood 2002.

99. Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. Haematologica 2003.

100. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines Fumihiko

Hayakawa1, Masayuki Towatari*,1, Hitoshi Kiyoi2, Mitsune Tanimoto1, Toshio Kitamura3, Hidehiko Saito1 and Tomoki Naoe2 Oncogene (2000) 19, 624 ± 631.

101. Mizuki M, Fenski R, Halfter H et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 2000.

102. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT-3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. Leukemia. Aug 2005; 19(8):1345-1349.

103. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT-3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. Sep 15 2001; 98(6):1752- 1759.

104. Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, Thomas X, Grardel N, Fund X, Tigaud I, Raffoux E, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H. Prognostic significance of FLT-3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. Leukemia. Sep 2002; 16(9):1699-1704.

105. Olesen LH, Aggerholm A, Andersen BL, Nyvold CG, Guldberg P, Norgaard JM, Hokland P. Molecular typing of adult acute myeloid leukaemia: significance of translocations, tandem duplications, methylation, and selective gene expression profiling. Br J Haematol. Nov 2005; 131(4):457-467.

106. Y,Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT-3 in human hematologic malignancies. Blood. Apr 15 2001; 97(8):2434-2439.

107. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of

FLT3: a cancer and leukemia group B study. Cancer Res 2001.

108. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP. Prevalence and prognostic significance of FLT-3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. Blood. Jan 1 2001; 97(1):89-94.

109. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, Cherrington JM, O'Farrell AM, Yuen HA, Louie SG, Hong W, Cortes JE, Verstovsek S, Albitar M, O'Brien SM, Kantarjian HM, Karp JE. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. Blood. Aug 1 2003;102(3):795-801.)

110. Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U, Flasshove M, Ottmann OG, Jung W, Cavalli F, Kuse R, Thomalla J, Serve H, O'Farrell AM, Jacobs M, Brega NM, Scigalla P, Hossfeld DK, Berdel WE. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. Blood. Oct 15 2003; 102(8):2763-2767.

111. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and plateletderived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. Clin Cancer Res. Jan 2003; 9(1):327-337.

112. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, Gilliland DG, Griffin JD. Inhibition of mutant FLT-3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. Cancer Cell. Jun 2002; 1(5):433-443.

113. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dauses T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT-3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood. May 15 2004; 103(10):3669.

114. O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yuen HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M,

Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT-3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. Clin Cancer Res. Nov 15 2003; 9(15):5465-5476.

115. Zheng R, Friedman AD, Small D. Targeted inhibition of FLT-3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT-3/ITD mutations. Blood. Dec 1 2002; 100(12):4154-4161.

116. George DJ, Dionne CA, Jani J, Angeles T, Murakata C, Lamb J, Isaacs JT. Sustained in vivo regression of Dunning H rat prostate cancers treated with combinations of androgen ablation and Trk tyrosine kinase inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555). Cancer Res. May 15 1999; 59(10):2395-2401.

117. Translocations and mutations involving the nucleophosmin(*NPM1*) gene in lymphomas and leukemias Brunangelo Falini, Ildo Nicoletti, Niccolò Bolli, Maria Paola Martelli, Arcangelo Liso, Paolo Gorello, Franco Mandelli, Cristina Mecucci, Massimo Fabrizio Martelli. Haematologica 2007; 92:519-532.

118. Okuwaki 2007.

119. Chan PK, Chan FY. Nucleophosmin/ B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. Biochim Biophys Acta 1995; 1262: 37-42.

120. Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. Protein Sci 1999;8: 905-12.

121. Namboodiri VM, Akey IV, Schmidt- Zachmann MS, Head JF, Akey CW. The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. Structure 2004;12: 2149-60.

122. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. Mol Cell Biol. 2005; 25:7534–7545. [PubMed: 16107701].

123. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. J Biol Chem 2000;275:24451-7.

124. Szebeni A, Hingorani K, Negi S, Olson MO. Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein B23. J Biol Chem 2003;278: 9107-15.

125. Wang W, Budhu A, Forgues M,Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. Nat Cell Biol

2005;7: 823-30.

126. Yu Y, Maggi LB, Jr., Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, et al. Nucleophosmin is essential for ribosomalprotein L5 nuclear export. Mol Cell Biol 2006;26:3798-809.

127. Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, Guo Q, Wonsey DR, Dang CV. Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. J Biol Chem 2001.

128. MacArthur, C. A., Shackleford, G. M.Npm3: A novel, widely expressed gene encoding a protein related to the molecular chaperones nucleoplasmin and nucleophosmin.Genomics 42: 137-140, 1997.

129. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin(NPMc + AML): biologic and clinical features Brunangelo Falini, Ildo Nicoletti, Massimo F. Martelli and Cristina Mecucci BLOOD, 1 FEBRUARY 2007 VOLUME 109, NUMBER 3.

130. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. Nucleic Acids Research, 23, 3974-3979. Herrera, J.E.,Savkur, R. and Olson, M.O. 1995.

131. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. Nucleic Acids Research, Savkur, R.S. and Olson, M.O. 1998.

132. Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPMbinding protein required for normal cell proliferation. The Journal of biological chemistry, 283(23), 15568-15576, Lindström, M.S. and Zhang, Y. 2008.

133. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells. The Journal of biological chemistry, 259, 4501–4513, Welch, W.J. and Feramisco, J.R. 1984.

134. Loading and unloading: Orchestrating centrosome duplication and spindle assembly by Ran/Crm. Cell cycle, 4(11), 1510- 1514. Budhu, A.S. and Wang, X.W. 2005.

135. Nucleophosmin and human cancer. Cancer Detection and Prevention, 30(6), 481-490. Lim, M.J. and Wang, X.W. 2006.

136. Colombo E, Bonetti P, Lazerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine JC, et al. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. Mol Cell Biol 2005.

137. Lee SY, Park JH, Kim S, Park EJ, Yun Y, Kwon J. A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. Biochem J 2005;388:7.

138. Wu MH, Chang JH, Yung BY. Resistance to UV-induced cellkilling in nucleophosmin/B23 overexpressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 overexpression. Carcinogenesis 2002;23.

139. Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. Oncogene 2002;21.

140. Cooper, G.M. ve Hausman, R.E. 2006. Hücre: Moleküler Yaklaşım (çeviri: M. Sakızlı ve N. Atabey), 3. Baskı., İzmir Tıp Kitabevi, 714 s.

141. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. Moleculer and Celluler Biology, 25, 7534–7545 Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K., and Kundu, T.K. 2005.

142. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. Nat Rev Cancer. 2006.

143. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. Nat Cell Biol. 2002.

144. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protectstumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. Cancer Cell. 2004; 5: 465–475.[PubMed: 15144954].

145. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. ProcNatl Acad Sci U S A.1999; 96:3706–3711. [PubMed: 10097101].

146. Gao H, Jin S, Song Y, et al. B23 regulates GADD45a nuclear translocation and contributes t GADD45a-induced cell cycle G2-M arrest. J Biol Chem. 2005; 280:10988–10996. [PubMed: 15644315].

147. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 andactivates p53. Nat Cell Biol. 1999; 1:20–26. [PubMed: 10559859].

148. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated bythe alternative reading frame product p19ARF. Cell. 1997; 91:

649–659. [PubMed: 9393858].

149. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nat Rev Cancer 2006;6:663-73.

150. Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF tumour suppressor. Int J Biochem Cell Biol 2006;38: 1637-41.

151. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature 2003; 426:895-9.

152. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. Mol Cell 2003.

153. Gjerset RA, Bandyopadhyay K. Regulation of p14ARF through subnuclear compartmentalization. Cell Cycle 2006;5: 686-90.

154. Ruth A.Gjerset, DNA damage, p14ARF, Nucleophosmin (NPM/B23), and cancer, 2006,Springer)

155. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. Leuk Res. 2007;31:109–111. [PubMed: 16678898].

156. Rachel Rau, MD and Patrick Brown, MD, Nucleophosmin (NPM1) Mutations in Adult and Childhood Acute Myeloid Leukemia: Towards Definition of a New Leukemia Entity, Hematol Oncol. 2009 December; 27(4): 171–181

157. Kerr LE, Birse-Archbold JL, Short DM, McGregor AL, Heron I, Macdonald DC, et al. Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. Oncogene 2006; [Epub ahead of print].

158. Burns, K. H., Viveiros, M. M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F. J., Frail, D. E., Eppig, J. J., Matzuk, M. M.Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos.Science 300: 633-636, 2003.

159. Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies. Japanese CancerAssociation, 97(10), 963-969. Naoe, T., Suzuki, T., Kiyoi, H. and Urano T. 2006.

160. Mitsuru Okuwaki, The Structure and Functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein, 2007 The Japanese Biochemical Society J. Biochem. 143, 441–448 (2008)

161. Shackleford, G. M., Ganguly, A., MacArthur, C. A.Cloning, expression and nuclear localization of human NPM3, a member of the nucleophosmin/ nucleoplasmin family of nuclear chaperones.BMC Genomics 2: 8, 2001.

162. Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers. APMIS. 2007; 115:341–346. [PubMed: 17504301].

163. Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, et al. Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. Leuk Lymphoma. 2007; 48:2141–2144. [PubMed: 17990177].

164. Liso A, Bogliolo A, Freschi V, et al. In human genome, generation of a nuclear export signal through duplication appears unique to nucleophosmin (NPM1) mutations and is restricted to AML. Leukemia. 2007.

165. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood. 2006; 107:4011–4020. [PubMed: 16455956].

166. Rachel Rau, MD and Patrick Brown, MD, Nucleophosmin (NPM1) Mutations in Adult and Childhood Acute Myeloid Leukemia: Towards Definition of a New Leukemia Entity, Hematol Oncol. Author manuscript, 2011.

167. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. Blood 2005.

168. Verhaak S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF,et al. Nucleoph Gale RE osmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood 2005;106:3733-9.

169. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood 2005.

170. Brunangelo Falini, M.D., Cristina Mecucci, M.D., Ph.D., Enrico Tiacci, M.D., Myriam Alcalay, M.D., Ph.D., Roberto Rosati, Ph.D., Laura Pasqualucci, M.D. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal

Karyotype, N Engl J Med 2005;352:254-66. *Copyright © 2005 Massachusetts Medical Society*

171. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. Blood. 2005; 106:1419–1422. [PubMed: 15870172].

172. Shimada A, Taki T, Kubota C, et al. No nucleophosmin mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Leukemia. 2007; 21:1307. [PubMed: 17315018].

173. Brown P, McIntyre E, Rau R, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. Blood. 2007; 110:979–985. [PubMed: 17440048].

174. Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. Leukemia. 2008.

175. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype Brunangelo Falini, M.D., Cristina Mecucci, M.D., Ph.D., Enrico Tiacci, M.D., Myriam Alcalay, M.D., Ph.D., Roberto Rosati, Ph.D., Laura Pasqualucci, M.D. 2010.

176. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, et al. Nucleophosminmutations in de novo acute myeloid leukemia: the agedependent incidences and the stabilityduring disease evolution. Cancer Res 2006.

177. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, et al. clinical Prevalence, profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. Blood2005.

178. Schlenk vd. 2008.

179. Bolli N, Nicoletti I, De Marco MF, et al. Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. Cancer Res. 2007; 67: 6230–6237.

180. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. Blood. 2006.

181. Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, et al. Pediatric acute myeloid leukemia

with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. Leukemia. 2007; 21:2000–2009. [PubMed: 17597811].

182. Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY, Tefferi A, Lasho TL, Steensma DP. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. Br J Haematol. 2006; 133:638–641. [PubMed: 16704439].

183. 155. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. Leuk Res. 2007;31:109–111. [PubMed: 16678898].

184. Falini B, Lenze D, Hasserjian R, et al. Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM) defines the molecular status of a significant fraction of myeloid sarcomas. Leukemia. 2007; 21:1566–1570. [PubMed: 17443224].

185. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (*NPM1*): is it a distinct entity? Brunangelo Falini, Maria Paola Martelli, Niccolo` Bolli., The American Society of Hematology, Blood, 2011.

186. Richard F. Schlenk, MD, Arnold Ganser, MD, and Konstanze Döhner, MD, Prognostic and Predictive Effect of Molecular and Cytogenetic Aberrations in Acute Myeloid Leukemia, , American Society of Clinical Oncology,1092-9118/10/1-10. 2010.

187. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Martin Dugas, Wolfgang Kern, Peter Staib, Christian Wuchter, Helmut Löffler, Cristina Maria Sauerland, Hubert Serve, Thomas Bu¨chner, Torsten Haferlach, and Wolfgang Hiddemann, Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in theAMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease, Blood, The American Society of Hematology, 2002

188. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Wolfgang Kern, Cristina Mecucci, Claudia Tschulik, Massimo F. Martelli, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, and Brunangelo Falini, Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype,Blood, The American Society of Hematology ,2005.

189. Christian Thiede, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schakel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, Martin Bornhauser, Markus Ritter, Andreas Neubauer, Gerhard Ehninger, and Thomas Illmer, Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis, Blood, The American Society of Hematology,2002.

190. Wen-Chien Chou, Jih-Luh Tang, Liang-In Lin, Ming Yao, Woei Tsay, Chien-Yuan Chen, Shang-Ju Wu, Chi-Fei Huang, Rong-Jing Chiou, Nucleophosmin Mutations in De novo Acute Myeloid Leukemia: The Age-Dependent Incidences and the Stability during Disease Evolution, American Association for Cancer ,2006

191. Leblanc T, Berger R. Molecular cytogenetics of childhood acute myelogenous leukaemias., European Journal Of Haematology,1997.

192. Kalliopi N. Manola, Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia, European Journal of Haematology, John Wiley & Sons, 2009.

193. Giovanni Cazzaniga, Maria Grazia Dell'Oro, Cristina Mecucci, Emanuela Giarin, Riccardo Masetti, Vincenzo Rossi, Franco Locatelli,Massimo F. Martelli, Giuseppe Basso, Andrea Pession, Andrea Biondi, and Brunangelo Falini , Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype, Blood,The American Society of Hematology, 2005.

194. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD, Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18),Genes Chromosomes Cancer,2001.

195. Fan YS, Rizkalla K,Comprehensive cytogenetic analysis including multicolor spectral karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization in lymphoma diagnosis. a summary of 154 cases, Cancer Genet Cytogenet. 2003.

196. Akagi T, Motegi M, Tamura A, Suzuki R, Hosokawa Y, Suzuki H, Ota H, Nakamura S, Morishima Y, Taniwaki M, Seto M,A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, Oncogene. 1999.

197. Hosaka S, Akamatsu T, Nakamura S, Kaneko T, Kitano K, Kiyosawa K, Ota H, Hosaka N, Miyabayashi H, Katsuyama ,Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma of the rectum with chromosomal translocation of the t(11;18)(q21;q21)

and an additional aberration of trisomy 3, Am J Gastroenterol, 1999.

198. Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Skinnider BF, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE,Concurrent chromosomal alterations at 3q27, 8q24 and 18q21 in B-cell lymphomas, Br J Haematoloji,1999.

199. Yamamoto K, Okamura A, Minagawa K, Yakushijin K, Urahama N, Gomyo H, Shimoyama M, Itoh M, Matsui T,A novel t(2;6)(p12;q23) appearing during transformation of follicular lymphoma with t(18;22)(q21;q11) to diffuse large cell lymphoma, Cancer Genet Cytogenet, 2003.

200. Tan PH, Lui WO, Ong P, Lau LC, Tao M, Chong Y., Cytogenetic analysis of invasive breast cancer: a study of 27 Asian patients, Cancer Genet Cytogenet. 2000.

201. Park JA, Ghim TT, Bae Kw, Im HJ, Jang SS, Park CJ, Chi HS, Seo JJ, Stem cell transplant in the treatment of childhood biphenotypic acute leukemia, Haematologica,2009.

202. Amal S. Al-Seraihy, Tarek M. Owaidah, Mouhab Ayas, Hassan El-Solh, Mohammed Al-Mahr, Ali Al-Ahmari, and Asim F. Belgaumi, Clinical characteristics and outcome of children with biphenotypic acute leukemia, Haematologica,2009.

203. Bhagavathi S, Borromeo V, Desai H, Crisan D., Case report and literature review: a rare patient with chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia, Ann Clin Lab Sci,2008.

204. Karakosta M, Tsakiridou A, Korantzis I, Manola KN., Deletion of 5q as a rare abnormality in chronic lymphocytic leukemia, Cancer Genet Cytogenet,2010.

205. Martinez-Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. Leukemia 1997;11:1999–2021.

206. Betts DR, Ammann RA, Hirt A, Hengartner H, Beck-Popovic M, Kuhne T, Nobile L, Caflisch U, Wacker P, Niggli FK. The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). European J Haematology 2007;78: 468–76.

207. Zuelzer WW, Inoue S, Thompson RI, Ottenbreit MJ. Long-term cytogenetic studies in acute leukemia of children; the nature of relapse, Am J Hematol,1976.

208. Heller A, Loncarevic IF, Glaser M, Gebhart E, Trautmann U, Claussen U., Breakpoint differentiation in chromosomal aberrations of hematological malignancies: Identification of 33 previously unrecorded breakpoints, Int J

Oncol,2004.

209. http://www.genecards.org/

210. http://www.microrna.org/microrna/home.do

211. Chapiro E, Russell LJ, Struski S, Cavé H, Radford-Weiss I, Valle VD, Lachenaud J, Brousset P, Bernard OA, Harrison CJ, Nguyen-Khac F. A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia, Epub 2010 May 20 SERİ. Leukemia

212. Campioni D, Bardi MA, Cavazzini F, Tammiso E, Pezzolo E, Pregnolato E, Volta E, Cuneo A, Lanza F, Cytogenetic and molecular cytogenetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in chronic and acute lymphoproliferative disorders, Ann Hematol. 2012, Epub 2012 Jun 14.

213. Chantrain CF, Jijon P, De Raedt T, Vermylen C, Poirel HA, Legius E, Brichard B, Therapy-related acute myeloid leukemia in a child with Noonan syndrome and clonal duplication of the germline PTPN11 mutation,2007.

214. Xu W, Zhou HF, Fan L, Qian SX, Chen LJ, Qiu HR, Zhang SJ, Li JY. Trisomy 22 as the sole abnormality is an important marker for the diagnosis of acute myeloid leukemia with inversion 16., Onkologie. 2008 Sep;31(8-9):440-4. doi: 10.1159/000141917. Epub 2008 Jul 31.SERİ

215. Sárová I, Brezinová J, Zemanová Z, Izáková S, Lizcová L, Malinová E, Berková A, Cermák J, Maaloufová J, Nováková L, Michalová K, Cytogenetic manifestation of chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia, Cancer Genet Cytogenet. 2010 Jun;199(2):121-7. doi: 10.1016/ j.cancergencyto. 2010.02.012.

216. Xu M, Finn LS, Tsuchiya KD, Thomson B, Pollard J, Rutledge J., Pure erythroid leukemia following precursor B-cell lymphoblastic leukemia, Pediatr Dev Pathol. 2012 Jan-Feb;15(1):76-8. doi: 10.2350/11-04-1029-CR.1. Epub 2011.

217. Luquet I, Laï JL, Barin C, Baranger L, Bilhou-Nabera C, Lippert E, Gervais C, Talmant P, Cornillet-Lefebvre P, Perot C, Nadal N., Hyperdiploid karyotypes in acute myeloid leukemia define a novel entity: a study of 38 patients from the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique (GFCH), Leukemia. 2008 Jan;22(1):132-7. Epub 2007 Oct 11.

218. Lundin C, Hjorth L, Behrendtz M, Nordgren A, Palmqvist L, Andersen MK,

Biloglav A, Forestier E, Paulsson K, High frequency of BTG1 deletions in acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome, Genes Chromosomes Cancer. 2012 Feb;51(2):196-206. doi: 10.1002/gcc.20944. Epub 2011 Nov 10.

219. Brown T, Swansbury J, Taj MM., Prognosis of patients with t(8;16)(p11;p13) acute myeloid leukemia, Leuk Lymphoma. 2012 Feb;53(2):338-41. doi: 10.3109/10428194.2011.614703. Epub 2011 Sep 23

220. Gmidène A, Sennana H, Wahchi I, Youssef YB, Jeddi R, Elloumi M, Saad A., Cytogenetic profile of a large cohort of Tunisian de novo acute myeloid leukemia, Hematology. 2012 Jan;17(1):9-14. doi: 10.1179/ 102453312X 13221316477417.

221. Hung D, St Heaps L, Benson W, Mirochnik O, Sharma P, Smith A, Deletion of 3'CBFbeta in an inv(16)(p13.lq22) ascertained by fluorescence in situ hybridization and reverse-transcriptase polymerase chain reaction, Cancer Genet Cytogenet. 2007 Jan 1;172(1):92-4.

222. Radtke I, Mullighan CG, Ishii M, Su X, Cheng J, Ma J, Ganti R, Cai Z, Goorha S, Pounds SB, Cao X, Obert C, Armstrong J, Zhang J, Song G, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12944-9. doi: 10.1073/pnas.0903142106. Epub 2009 Jul 27.

223. Cheng Y, Wang H, Wang H, Chen Z, Jin J., Trisomy 21 in patients with acute leukemia, J Hematol. 2009 Mar;84(3):193-4. doi: 10.1002/ajh.21339.

224. Babicka L, Ransdorfova S, Brezinova J, Zemanova Z, Sindelarova L, Siskova M, Maaloufova J, Cermak J, Michalova K., Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH, Leuk Res. 2007 Jan;31(1):39-47. Epub 2006 May 9.

225. Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia,Blood. 2007 Aug 15;110(4):1308-16. Epub 2007 May 7.

226. Catalano A, Dawson MA, Somana K, Opat S, Schwarer A, Campbell LJ, Iland H, The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia, Blood. 2007 Dec 1;110(12):4073-6. Epub 2007 Aug 21.

227. Sanjmyatav J, Schubert J, Junker K., Comparative study of renal cell carcinoma by CGH, multicolor-FISH and conventional cytogenic banding analysis, Oncol Rep.

2005 Nov;14(5):1183-7

228. Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrózek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 16;101(11):3915-20. Epub 2004 Mar 8.

229.https://www.google.com.tr/#output=search&sclient=psy-ab&q=Mitelman+Database+of+Chromosome+Aberrations+in+Cancer&oq=Mitelman+Database+of+Chromosome+Aberrations+in+Cancer&gs_l=hp.12..0i19.2896.2896

230. Wuicik L, Cavalli LR, Cornélio DA, Schmid Braz AT, Barbosa ML, Lima RS, Urban CA, Bleggi Torres LF, Ribeiro EM, Cavalli IJ., Chromosome alterations associated with positive and negative lymph node involvement in breast cancer, Cancer Genet Cytogenet. 2007 Mar;173(2):114-21.SERİ

231. Grois N, Nowotny H, Tyl E, Krieger O, Kier P, Haas OA,Is trisomy 22 in acute myeloid leukemia a primary abnormality or only a secondary change associated with inversion 16?, Cancer Genet Cytogenet. 1989 Nov;43(1):119-29.

232. Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR, SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23), Oncogene. 2006 Oct 5;25(45):6147-52. Epub 2006 May 8.

233. Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR, Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide, J Clin Oncol,1993.

234. Hayata I, Sakurai M, Kakati S, Sandberg AA., Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XVI. Banding studies of chronic myelocytic leukemia, including five unusual Ph11 translocations, Cancer. 1975 Oct;36(4):1177-91.

235. Hild F, Fonatsch C., Cytogenetic peculiarities in chronic myelogenous leukemia, Cancer Genet Cytogenet. 1990 Jul 15;47(2):197-217.

236. Puchkova GP, Prigogina EL, Fleischmann EW, Drosdova TS, Mayakova SA, Peterson IS., Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia in children, Hum Genet. 1983;64(3):257-62.

237. Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML):

frequency of favorable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML, Preiss BS, Bergmann OJ, Friis LS, Sørensen AG, Frederiksen M, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Oestergaard B, Kerndrup GB; AML Study Group of Southern Denmark, Cancer Genet Cytogenet. 2010 Oct 15;202(2):108-22. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.06.013

238. Schoch C, Haase D, Haferlach T, Gudat H, Büchner T, Freund M, Link H, Lengfelder E, Wandt H, Sauerland MC, Löffler H, Fonatsch C., Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor, Leukemia. 1996 Aug;10(8):1288-95.

239. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies, Blood. 2000 Aug 15;96(4):1297-308.

240. Hasle H, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Monosomy 7and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. Blood 2007;109:4641–7.

241. Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A,Michalova´ K, Stark B, Harrison CJ, Teigler-Schlegel A,Johansson B. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an IBFM-SG study. Blood 2008;111:1575–83.

242. Stark B, Jeison M, Glazer Gabay L, et al. Classical andmolecular cytogenetic abnormalities and outcome ofchildhood acute myeloid leukemia: report from a referral centre in Israel. Br J Haematol 2004;126:320–37.

243. Carlson KM, Vignon C, Bohlander S, Martinez-Climent JA, Le Beau MM, Rowley JD, Carlson KM, Identification and molecular characterization of CALM/AF10fusion products in T cell acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia, Leukemia. 2000 Jan;14(1):100-4.

244. Dreyling MH, Schrader K, Fonatsch C, Schlegelberger B, Haase D, Schoch C, Ludwig W, Löffler H, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Bohlander SK.,MLL

and CALM are fused to AF10 in morphologically distinct subsets of acute leukemia with translocation t(10;11): both rearrangements are associated with a poor prognosis, Blood. 1998 Jun 15;91(12):4662-7.

245. Mulaw MA, Krause A, Deshpande AJ, Krause LF, Rouhi A, La Starza R, Borkhardt A, Buske C, Mecucci C, Ludwig WD, Lottaz C, CALM/AF10-positive leukemias show upregulation of genes involved in chromatin assembly and DNA repair processes and of genes adjacent to the breakpoint at 10p12, Leukemia. 2012 May;26(5):1012-9. doi: 10.1038/leu.2011.307. Epub 2011 Nov 8.

246. Calabrese G, Taraborelli T, Fantasia D, Guanciali Franchi P, Spadano A, Karyotype refinement by multicolor fluorescence in situ hybridization analysis in 18 patients with acute lymphoblastic leukemia, Haematologica. 2002 Aug;87(8):888-9.

247. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood. 2005; 106:3747– 3754. [PubMed: 16109776]

248. Ender Coşkunpınar, Sema Anak, Leyla Ağaoğlu, Uğur Özbek,Analysis of Chromosomal Aberrations and FLT3 gene Mutations in Childhood Acute Myelogenous Leukemia Patients, Turk J Hematol 2012; 29: 225-232

249. Bircan Hızlı Karabacak, Fatih Erbey, Ibrahim Bayram, Atila Tanyeli, Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Mutations in Childhood Acute Leukemias and their Association with Prognosis, 2010 *Asian Pacific J Cancer Prev,* **11**, 923-9

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : B.30.2.ANK.0.20.05.04

Konu : Çalışma dosyası hakkında

29753 28.12.2011

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına

Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY'ın sorumluluğunda yürütülecek olan "Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) ve nucleophosmin 1 mutasyonları" başlıklı çalışma dosyası, klinik araştırmalar etik kurulunun 12 Aralık 2011 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, alınan karar örneği ilişikte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye tebliğini saygı ile rica ederim.

Prof.Dr.T.Murat ÖZSAN
Dekanca.
Dekan Yardımcısı

Yrd.Doç.Dr. Nüket Yürür Kutlay'a iletelim

Eki: 2 karar örneği

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe Özet ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:17-560-12	Tarih: 22 Ekim 2012
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyasına ait: *Yeterli hasta sayısına ulaşılamadığından Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalından Uz.Dr.Hasan Fatih Çakmaklı ile Prof.Dr.Mehmet Erdem'in, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji Bilim Dalından Prof.Dr.Gülsan Yavuz'un ve Doç.Dr.Handan Dinçaslan'ın çalışmaya dahil edilmeleri okunarak uygun bulundu.	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Toplantıda
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Toplantıda
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	Sorumlu araş oyla Katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İzinli
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Rahatsız

* :Toplantıda Bulunma

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:41-875	Tarih: 12 Aralık 2011
	Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI: İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

DEĞERLENDİRME KURULU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cihan Yurdaydın	Gastroenteroloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	YURTDIŞINDA
Prof.Dr.Tanju Özçelikay	Eczacı-Farmakolog	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cem Atbaşoğlu	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLİ
Prof.Dr.Hakan Uncu	Genel Cerrahi	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.H.Serap Sivrı	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	TOPLANTIDA
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket Yürür Kutlay	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☒	H ☐	E ☒	H ☐	SOR.ARAŞ.OLD OYLAMAYA KATILMADI
Yrd.Doç.Dr.Derya Öztuna	Biyoistatistik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	----------	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) nucleophosmin 1 mutasyonları
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	
	EUDRACT NUMARASI	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ BE/BY ☐ DİĞER ☐ Diğer ise belirtiniz İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA ☐ Belirtiniz
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☐ ULUSLARARASI

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	



15.10.2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Araştırma görevlisi Dr.Sevgi Başer'in uzmanlık tez çalışması olarak; pediatrik ilk tanı AML hastalarında 'Fms Like Tyrosine Kinase(FLT3) ve Nucleophosmine 1 (NPM1) mutasyonlarının araştırılması' başlıklı çalışmanın yapılması planlanmış ve bu amaçla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'dan 28.11.2011 tarihinde onay alınmıştır. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'ndan hasta örneklerinin toplanması planlanmıştır. Ancak bu klinikle yapılan ortak hasta takiplerinde yeterli sayıda hastaya ulaşılamamıştır. Bu nedenle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'nın yanı sıra Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'ndan da hasta örneklerinin toplanmasına gerek duyulmuştur. Ayrıca Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Hasan Fatih Çakmaklı hasta seçiminde yoğun olarak çalışarak projeye aktif olarak katılmıştır. Bu değişiklik sonucunda proje kapsamında yer alan araştırmacılar;

Tıbbi Genetik A.D.: Yrd. Doç. Dr. Nüket Y.Kutlay
Dr.Sevgi Başer
Pediatrik Hematoloji B.D.: Prof.Dr.Mehmet Ertem
Uzm.Dr.Hasan Fatih Çakmaklı
Pediatrik Onkoloji B.D.: Prof.Dr.Gülsan Yavuz
Doç.Dr.Handan Dinçaslan

olarak değişmiştir. Bilgilerinize arz ederim.

Yrd.Doç.Dr.Nüket Y.Kutlay
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURUL DÜZELTME/DEĞİŞİKLİK FORMU ÜST YAZISI

[Bu üst yazı, etik kurul tarafından koordinatör/sorumlu araştırıcıdan istenen her türlü düzeltmeler ve destekleyici tarafından etik kurula yapılan her türlü değişiklik (protokol değişikliği, merkez değişikliği, araştırıcı değişikliği, sigorta poliçesi güncellenmesi vb.) önerileri için kullanılacaktır]

AÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na,

Düzeltilerek ekte gönderilen ve aşağıda özellikleri tanımlanmış olan belgelerin tarafınızdan değerlendirilmesi için gereğini bilgilerinize arz ederim.

Dr.Nüket Y.Kutlay

Sayı:	
Tarih:	15 / 10 /2012

TANIMLAYICI BİLGİLER		
Sorumlu/Koordinatör Araştırıcı Unvanı/ Adı Soyadı		Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY
Kurumu/ Anabilim/ Bilim Dalı		A.Ü.T.F TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
İletişim Bilgileri	Tel	0312 5958055
	E-Posta	Nüket.Kutlay @ medicine.ankara.edu.tr
Araştırma (Protokol) Kodu		
Araştırma Adı		Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) ve Nucleophosmin 1 Mutasyonları
İade Edilen Başvurunun Karar Numarası		

No	Düzeltme/Değişiklik istenen belge (Protokol, BGOF, Bütçe vb	Düzeltme/Değişiklik Versiyon Tarihi	Düzeltme/Değişiklik Versiyon No.su
1	Merkez ve araştırmacı değişikliği Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi TıbbiGenetik A.D. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı Yrd. Doç. Dr. Nüket Y.Kutlay Dr.Sevgi Başer Prof.Dr.Mehmet Ertem	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi TıbbiGenetik A.D. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı **Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı** Yrd. Doç. Dr. Nüket Y.Kutlay Dr.Sevgi Başer Prof.Dr.Mehmet Ertem **Prof.Dr.Gülsan Yavuz** **Doç.Dr.Handan Dinçaslan** **Uzm.Dr.Hasan Fatih Çakmaklı** 15.10.2012	2
2			

*Düzeltme/Değişiklik yapılan belgelerin eski ve değiştirilmiş şeklinin bir tablo şeklinde verilmesi gerekmektedir.

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : B.30.2.ANK.0.20.05.04
Konu : Çalışma dosyası hakkında

26848 26.11.2012

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Anabilim Dalınız öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY'ın sorumluluğunda yürütülmekte olan "Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) ve nucleophosmin 1 mutasyonları" başlıklı çalışma dosyasına ait: *Yeterli hasta sayısına ulaşılamadığından Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Hematoloji Bilim Dalından Uz.Dr.Hasan Fatih Çakmaklı ile Prof.Dr.Mehmet Erdem'in, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji Bilim Dalından Prof.Dr.Gülsan Yavuz'un ve Doç.Dr.Handan Dinçaslan'ın çalışmaya dahil edilmeleri, klinik araştırmalar etik kurulunun 22 Ekim 2012 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, alınan karar örneği ilişikte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye tebliğini saygı ile rica ederim.

Prof.Dr.Gülfem Elif ÇELİK
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

Yrd. Doç. Dr. Nüket Yürür Kutlay'a
iletelim

Eki: 2 karar örneği

Araş. Görev. Dr Sevgi Başer

ARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) ve nucleophosmin 1 mutasyonları			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ :	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi
ASLI GİBİDİR
13 Ocak 2012

ARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pediatrik AML hastalarında Fms Like Tyrosin Kinase (FLT3) ve nucleophosmin 1 mutasyonları			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Nüket YÜRÜR KUTLAY			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐