

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL) VE  
KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML) ÖN TANILI  
OLGULARDA FÜZYON GEN  
EKSPRESYONLARININ ANALİZİ**

Yüksek Lisans Öğr. Volkan ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

MERSİN – 2011

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ (ALL) VE  
KRONİK MYELOİD LÖSEMİ (KML) ÖN TANILI  
OLGULARDA FÜZYON GEN  
EKSPRESYONLARININ ANALİZİ**

Yüksek Lisans Öğr. Volkan ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TBG (VÖ) 2009-3 YL kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

Tez No: .....178.....

MERSİN – 2011

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) Ve Kronik Myeloid Lösemi (KML) Ön Tanılı Olgularda Füzyon Gen Ekspresyonlarının Analizi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 25.01/2011

  
Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. E. Naci TİFTİK  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez , Enstitü Yönetim Kurulunun 10./02./2011 tarih ve 2011-51. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ülku ÇOMELEKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca; zamanını, bilgisini ve emeğini esirgmeden yardımcı olan, Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a,

Yüksek lisans öğrenimi boyunca bilgisini ve desteğini, hiçbir şekilde esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve sonuçlanmasında yardımcı olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a,

Çalışma grubunu oluşturma konusunda sağladıkları destekten dolayı Üniversitemizin İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Doç. Dr. E. Naci TİFTİK'e, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selma ÜNAL'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. A. Bülent ANTMEN'e,

Kontrol amaçlı kullandığımız tüm hücre hatlarının teminini sağlayan, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. H. Ogün Sercan'a,

KML hastalarının sitogenetik olarak değerlendirilmesinde Kanser Sitogenetiği rutin sorumlusu Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a,

Tez çalışması süresince, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen bölüm asistanları Arş. Gör. Fatma SÖYLEMEZ ve Arş. Gör. Sevinç SÜRER ile bölümümüz teknisyeni Hatice ÖZTÜRK'e,

Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında görev yapan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma, manevi desteğini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım ve ev arkadaşlarım Mustafa BAY ve Anıl BAŞAR'a,

Varlıklarından minnet duyduğum ve bana her zaman destek olan A i l e m e ;

TEŞEKKÜR EDERİM ...

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÖZET</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Lösemi .....	3
2.1.1.Kronik Myeloid Lösemi .....	4
2.1.1.1.BCR-ABL'in fonksiyonel özellikleri .....	11
2.1.1.2.KML Biyolojisi .....	13
i. Moleküler Biyoloji .....	13
ii. BCR-ABL Sinyal Yolakları .....	15
2.1.2.Akut Lenfoblastik Lösemi .....	19
2.1.2.1.Morfolojik Sınıflandırma .....	20
2.1.2.2.İmmunolojik Sınıflandırma .....	21
2.1.2.3.ALL'de Gözlenen Yapısal Kromozom Anomalileri .....	22
a) t(9;22)(q34;q11) translokasyonu (p190 <sup>BCR-ABL</sup> ) .....	22
b) t(4;11)(q21;q23) translokasyonu (MLL-AF4 füzyon geni) .....	24
c) t(12;21)(p13;q22) tranlokasyonu (TEL-AML1 füzyon geni) .....	28
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	35
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Toplanması .....	35
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	36
3.2.1. Kullanılan Cihazlar .....	36
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	37
3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	38

3.3. Yöntemler .....	39
3.3.1. Sitogenetik Analiz .....	39
3.3.2. Moleküler Analiz .....	39
3.3.2.1. RNA İzolasyonu (RNA Kit ile) .....	39
3.3.2.2. RNA İzolasyonu (GITC Yöntemi ile) .....	40
3.3.2.3. cDNA Reaksiyonu .....	41
3.4. Real Time PCR Var-Yok Analizi.....	42
3.4.1. Kullanılan Primer ve Proplar .....	42
3.4.2. Var-Yok Analiz Tayini .....	44
3.4.2.1. Real-Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı .....	44
3.4.2.2. Real-Time PCR Reaksiyon Şartları .....	44
3.5. İstatistiksel Analiz .....	45
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>46</b>
4.1. KML Ön Tanılı Hastalarda BCR-ABL p210 Füzyon Geni Bulguları .....	46
4.2. ALL Ön Tanılı Hastalarda BCR-ABL p190, MLL-AF4 ve TEL-AML1 Füzyon Geni Bulguları .....	50
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>52</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b> .....	<b>56</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>57</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>63</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoetik farklılaşma .....	3
Şekil 2.2. 9 nolu kromozom ile 22 nolu kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve philedelphia kromozomunun oluşumu .....	5
Şekil 2.3. Bcr proteininin ve fonksiyonel bölgelerinin şematik gösterimi .....	7
Şekil 2.4. KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu .....	14
Şekil 2.5. KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ile oluşan füzyon genler .....	15
Şekil 2.6. ABL proteinine ait fonksiyonel bölgeler.....	16
Şekil 2.7. p210 <sup>Bcr-Abl</sup> , nin sinyal yolları.....	17
Şekil 2.8.ALL'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu görülen p190 <sup>BCR-ABL</sup> geni.....	23
Şekil 2.9. t(4;11)(q21;q23) sonucunda MLL-AF4 füzyon geninin şematik şekli .....	24
Şekil 2.10.(a) t(4;11)(q21;q23) içerisinde bulunan MLL ve AF4 genin intron / ekson yapısının şematik diyagramı (b)t(4;11) sonucunda farklı MLL-AF4 füzyon türevleri.....	25
Şekil 2.11. MLL proteininin şematik yapısı .....	26
Şekil 2.12. ALL'de t(12;21)(p13;q22) translokasyonu sonucu görülen TEL-AML1 füzyon geni.....	30
Şekil 2.13. (a) t(12;21)(p13;q22) içerisinde bulunan TEL ve AML1 genin intron / ekson yapısının şematik diyagramı (b) TEL-AML1 füzyon transkriptlerinin şematik diyagramı.....	32
Şekil 2.14. TEL-AML1 geninin aksiyonunun moleküler mekanizması.....	33
Şekil 3.1. Genel akış şeması .....	36
Şekil 4.1. KML-23 numaralı hastanın p210 <sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.2. KML-10 numaralı hastanın p210 <sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probu ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	49

<b>Şekil 4.3.</b> SD1 hücre hattına ait p190 <sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	51
<b>Şekil 4.4.</b> REH hücre hattına ait TEL-AML genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.....	51



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> BCR geninin moleküler özellikleri.....	6
<b>Çizelge 2.2.</b> BCR Proteinin karakteristik fonksiyonları .....	10
<b>Çizelge 2.3.</b> ABL geninin moleküler özellikleri ve fonksiyonları .....	11
<b>Çizelge 2.4.</b> p210 <sup>BCR-ABL</sup> karakteristik özellikleri.....	18
<b>Çizelge 2.5.</b> Çocukluk çağı ALL'lerde klonal gözlenen önemli bazı translokasyonlar ve oluşturdukları füzyon genleri.....	22
<b>Çizelge 2.6.</b> p190 <sup>BCR-ABL</sup> karakteristik özellikleri.....	24
<b>Çizelge 2.7.</b> MLL proteinin karakteristik fonksiyonları.....	27
<b>Çizelge 2.8.</b> TEL gen ve proteinin karakteristik özellikleri .....	30
<b>Çizelge 2.9.</b> AML1 gen ve proteinin karakteristik özellikleri .....	31
<b>Çizelge 4.1.</b> Yetişkin KML ön tanılı hastalarda p210 <sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni ve Ph kromozomu tayini .....	47
<b>Çizelge 4.2.</b> Ek klinik bulgularla kesin tanısı KML konulmuş hastalar .....	48
<b>Çizelge 4.3.</b> Çocukluk çağı ALL ön tanılı hastalarda p190 <sup>BCR-ABL</sup> , MLL-AF4 ve TEL-AML1 füzyon genleri tayini .....	50

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABL .....	Abelson proto-onkogeni
AF10 .....	ALL1 Fused Gene From Chromosome 10
AF4 .....	ALL1 Fused Gene From Chromosome 4
AF6 .....	ALL1 Fused Gene From Chromosome 6
AF9 .....	ALL1 Fused Gene From Chromosome 9
ALL .....	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML .....	Akut Myeloid Lösemi
BCR .....	Breakpoint Cluster Region
Bp .....	Baz çifti
CBFA2 .....	Core Binding Factor A2
CD .....	Cluster of Differentiation
cDNA .....	Komplementer deoksiribonükleik asit
DNA .....	Deoksiribonükleik asit
dNTP .....	Deoksinükleotid trifosfat
ENL .....	Eleven-Nineteen Leukemia
ETV6 .....	ETS variant gene 6
FAB Sınıflandırması .....	Fransız-Amerikan-İngiliz Sınıflandırması
FISH .....	Fluorescence In Situ Hybridization
kb .....	Kilobaz
kD .....	Kilodalton
KLL .....	Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML .....	Kronik Myeloid Lösemi
lt .....	Litre

M-BCR .....	Majör-Breakpoint Cluster Region
m-BCR .....	Minör-Breakpoint Cluster Region
Mg .....	Miligram
MLL .....	Myeloid/Lymphoid, Mixed Lineage Leukemia
mRNA .....	Messenger Ribonükleik Asit
p .....	Kromozomun kısa kolu
PBX1 .....	Pre B cell leukemia homeobox 1
PCR .....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ph .....	Philadelphia Kromozomu
rpm .....	Revolutions per minute
q .....	kromozomun uzun kolu
QRT-PCR .....	Quantitative Reverse Transcription PCR
RNA .....	Ribonükleik asit
t .....	Translokasyon
TEL .....	Translocation ETS Leukemia
XPB Proteini .....	Xeroderma Pigmentosum Proteini
µl .....	Mikrolitre

## ÖZET

### Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) Ve Kronik Myeloid Lösemi (KML) Ön Tanılı Olgularda Füzyon Gen Ekspresyonlarının Analizi

Kronik Myeloid Lösemi, pluripotent hematopoetik kök hücrelerinin neoplastik dönüşümüne neden olan klonal bir hastalıktır. KML'nin ayırıcı özelliği t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan "Philedelphia kromozomu" nun varlığıdır. Bu translokasyona KML hastalarında %90-95 oranında rastlanılmaktadır.

Çocukluk çağı Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) de sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler %80 oranında görülmekte olup tanı için önem taşımaktadır. Bu dönemdeki olgularda t(9;22)(q34;q31) ile BCR-ABL füzyon geni %5 oranında görülmekte olup, kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. t(12;21)(p13;q22) sonucunda TEL/AML1 füzyon geni oluşmaktadır ve iyi prognozla ilişkilendirilir. TEL/AML1 geni çocukluk dönemi ALL'sinde %17-25 oranında görülmektedir. t(4;11)(q21-q23) sonucunda MLL-AF4 füzyon geni oluşur. Kötü prognozla ilişkilendirilen bu füzyon genin sıklığı %3-4'dur.

Tez kapsamında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Bilimler Anabilim Dalı- Hematoloji Bilim Dalı'na gelen yetişkin KML ön tanılı hastaların kemik iliği örneklerinde p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon genlerin varlığı ve Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'na gelen çocukluk çağı ALL ön tanılı hastaların kemik iliği örneklerinde p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML ve MLL-AF4 füzyon genlerinin varlığı araştırıldı. Hastaların kemik iliği örneklerinden RNA izole edildikten sonra RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Hastaların cDNA örnekleri spesifik primer ve proplar kullanılarak, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR) yöntemiyle füzyon gen ekspresyonları araştırıldı. 20 KML ön tanılı hastanın 4 tanesinde p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni tespit edildi. Bu hastalar sitogenetik yöntemle Ph kromozomu açısından da değerlendirildi ve 20 hastanın 10 tanesinde Ph kromozomu tespit edildi. 15 çocukluk çağı ALL ön tanılı hastalarda p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 füzyon genlerine rastlanmadı.

**Anahtar Kelimeler:** Çocukluk çağı ALL, KML, Ph kromozomu, p210<sup>BCR-ABL</sup>, p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL/AML1 geni, MLL-AF4 geni, Real Time-PCR

## ABSTRACT

### Analysis Of The Fusion Gene Expressions In The Preliminary diagnosis Cases Of Acute Lymphoblastic Leukaemia And Chronic Myeloid Leukemia

Chronic Myeloid Leukemia is a clonally disease, leading to the neoplastic transformation of pluripotent hematopoietic stem cells. The presence of “Philadelphia Chromosome” as a resulting of t(9 ;22)(q34 ;q11) translocation is a distinctive characteristic of CML. This translocation is found in 90-95% of CML patients.

Occurring in 80% of childhood ALL, the numeric and structural abnormalities are required for the diagnosis. BCR-ABL fusion gene that arise from t(9 ;22)(q34 ;q31) translocation is associated with poor prognosis, detected in 5% in the case of diagnosis. TEL-AML1 fusion gene occurs as a result of t(12 ;21)(q13 ;q22) and is associated with favorable prognosis. The TEL-AML1 gene is observed in 25% of childhood ALL. MLL-AF4 fusion gene is formed by the outcome of t(4 ;11)(q21-q23). The frequency of this fusion gene associated with poor prognosis is 3-4 %.

In the context of this thesis, bone marrow samples, obtained from adult patients with CML preliminary diagnosis diagnosed at Medicine Faculty of Mersin University, Department of Integrated Sciences - Department of Hematology are examined for the presence of p210<sup>BCR-ABL</sup> fusion gene. In addition, the presence of p210<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 and MLL-AF4 fusion genes is searched in the bone marrow samples obtained patients with childhood ALL at preliminary diagnosis diagnosed at Department of child’s Hematology. RNAs are isolated from patients’ bone marrow samples then transformed to the complement DNA (cDNA). Using specific primer and probe, the fusion gene expressions are examined by Real Time Polymerase Reaction (Real Time-PCR). p210 BCR-ABL fusion gene was determinate at the 4 of the 20 CML preliminary patients. These patients evaluated with the cytogenetic procedure also aspect of chromosome Ph and it was confirmed the 10 of the 20 patients. P190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 and MLL-AF4 fusion genes are not found in 15 patients with childhood ALL at preliminary diagnosis.

**Keywords:** Childhood ALL, CML, Ph chromosome, p210<sup>BCR-ABL</sup>, p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 gene, MLL-AF4 gene, Real Time-PCR

# 1. GİRİŞ

Genetik değişiklikler sonucu transforme olan hematopoetik hücrelerin klonal proliferasyonu, lösemiye neden olmaktadır. Özellikle belli kromozomal translokasyonları içeren bu genetik değişikliklerin, moleküler düzeyde açıklanması tanı ve tedavi açısından oldukça yararlıdır.

Akut lenfositik lösemiler (ALL), lenfohematopoetik hücrelerin olgunlaşmaları aşamasındaki duraklama sonucu malign özellikteki klonların çoğalması ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır ve çocukluk çağı malignitelerinin % 25-30'unu oluşturur. ALL; yalnız çocukluk çağının en sık görülen malign hastalığı olması açısından değil, tedavide elde edilen başarılar açısından da, bu dönemin en önemli malign hastalığıdır (1,2).

Çocukluk çağı Akut lenfositik lösemilerde, klonal olarak gözlenen bazı translokasyonlara; t(12;21)(p13;q22) ile TEL-AML1 (translocation ets leukemia- acute myeloid leukemia 1), t(9;22)(q34;q31) ile BCR-ABL (Breakpoint cluster region- Abelson proto-onkogeni leukemia), t(1;19)(q23;p13) ile PBX1-E2A (pre-B-cell leukemia homeobox 1- E2A), t(8;14)(q24;q32) ile myc-IgH (myelocytomatosis oncogene-Immunoglobulin Heavy), t(4;11)(q21;q23) ile MLL-AF4 (Mixed Lineage Leukemia- ALL1 Fused Gene From Chromosome 4), t(11;19)(q23;p13.3) ile MLL-ENL (Mixed Lineage Leukemia- eleven nineteen leukemia) füzyon genleri örnek olarak sıralabilir.

Kronik Myeloid Lösemi (KML) ise, multipotent kök hücrelerin neoplastik transformasyonundan ortaya çıkan, klonal myeloproliferatif bir hastalıktır (3,4). Gelişmiş ülkelerde, tüm lösemi olgularının dörtte birini kapsamaktadır. İnsidansı yılda 1/100.000'dir. Tüm yaş gruplarında gözlenebilmekle birlikte; en yaygın 40-50 yaşlar arasında, cinsiyet farklılığı olmadan gözlenmektedir (5). KML'nin sitogenetik belirtisi hastaların yaklaşık % 90-95'inde bulunan Philadelphia (Ph) kromozomudur (6).

Günümüzde Ph kromozomunun belirlenmesinde, konvansiyonel sitogenetik yöntemler halen altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Sadece kromozomal düzeydeki değişimlerin mikroskopik düzeyde gözlenmesinin yanı sıra; daha spesifik biçimde, translokasyon sonucu oluşan füzyon genlerin ekspresyon düzeyinde gözlenmesi için, moleküler tekniklere başvurulmaktadır (7,8).

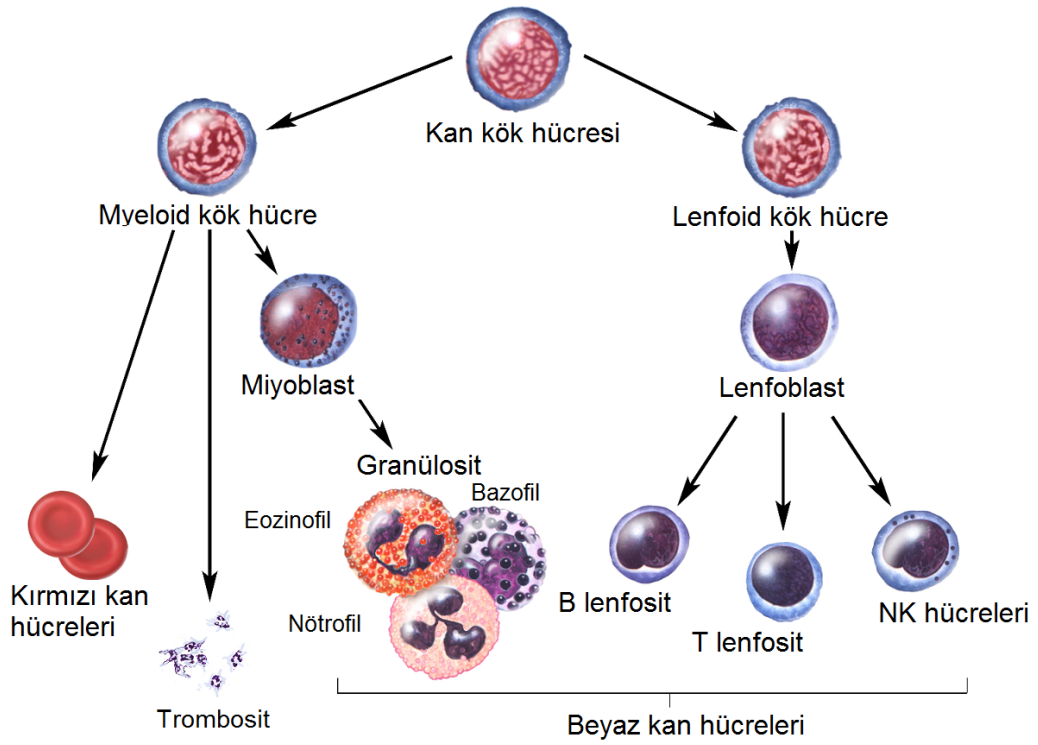
BCR-ABL füzyon geninin kodladığı p210 proteini KML için karakteristik; p190 proteini ise ALL için prognostik öneme sahiptir. Özellikle KML tedavisinde moleküler düzeyde yanıt takibi, tedavinin yönlendirilmesinde etkin rol oynamaktadır.

Bu çalışma ile çocukluk çağı lösemilerde prognozu etkileyen, TEL-AML1, MLL-AF4 ve p190<sup>BCR/ABL</sup> füzyon genlerinin varlığı; KML'de ise tanı ve takip açısından moleküler belirteç olarak kabul edilen p210<sup>BCR/ABL</sup> füzyon geninin varlığı Real Time-PCR yöntemi ile araştırılması planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lösemi

Hematopoetik kök hücreler; hematopoez süreci olması gerektiği gibi gerçekleştiğinde, periferal kan hücrelerine (olgun lenfositler, granülositler, monositler, eritrositler ve megakaryositler/trombositler gibi) Şekil 2.1'deki gibi farklılaşmaktadır (9).



Şekil.2.1. Hematopoetik farklılaşma (71)

Hematopoetik hücreler ortak bir multipotent ana hücreden kaynaklanmaktadır. Eritrositler, granülositler, monositler ve trombositler gibi perifer kanındaki, olgun hücreler, kemik iliğindeki progenitör hücrelerden tek bir hat üzerinde olgunlaşarak meydana gelmektedir (9).

Lenfoid kök hücre; lenfositleri, miyeloid kök hücre ise nötrofilleri, bazofilleri, eozinofilleri, monositleri, eritrositleri ve trombositleri oluşturacak şekilde



farklılaşmaktadır. Her farklılaşma aşamasında farklı hematopoetik büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir (9,10).

Lösemi; hematopoetik hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen, heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Morfolojik yönden, hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre (myeloid ya da lenfoid) ve proliferen olan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre (akut ya da kronik) sınıflandırması yapılmaktadır.

Akut lösemiler, olgunlaşmamış (blastik) kan yapıcı veya öncül hücrelerin artışı sonucu oluşmaktadır. Akut lösemilerde, kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise “akut lenfoblastik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncü hücreler ise “akut myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır.

Kronik lösemiler ise olgunlaşmış (blastik) kemik iliği elemanlarının artışı sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kronik lösemilerde kontrolsüz çoğalan hücreler lenfoid öncü hücreler ise “kronik lenfositik (lenfoid) lösemi”, myeloid öncü hücreler ise “kronik myelositik (myeloid) lösemi” olarak tanımlanmaktadır (10).

Lösemiler beş ana tip olarak tanımlanmaktadır;

- Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
- Akut Myeloid/Lenfoid olmayan Lösemi (AML/ANLL)
- Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
- Kronik Myeloid Lösemi (KML)
- Yetişkin T hücresi Lösemi

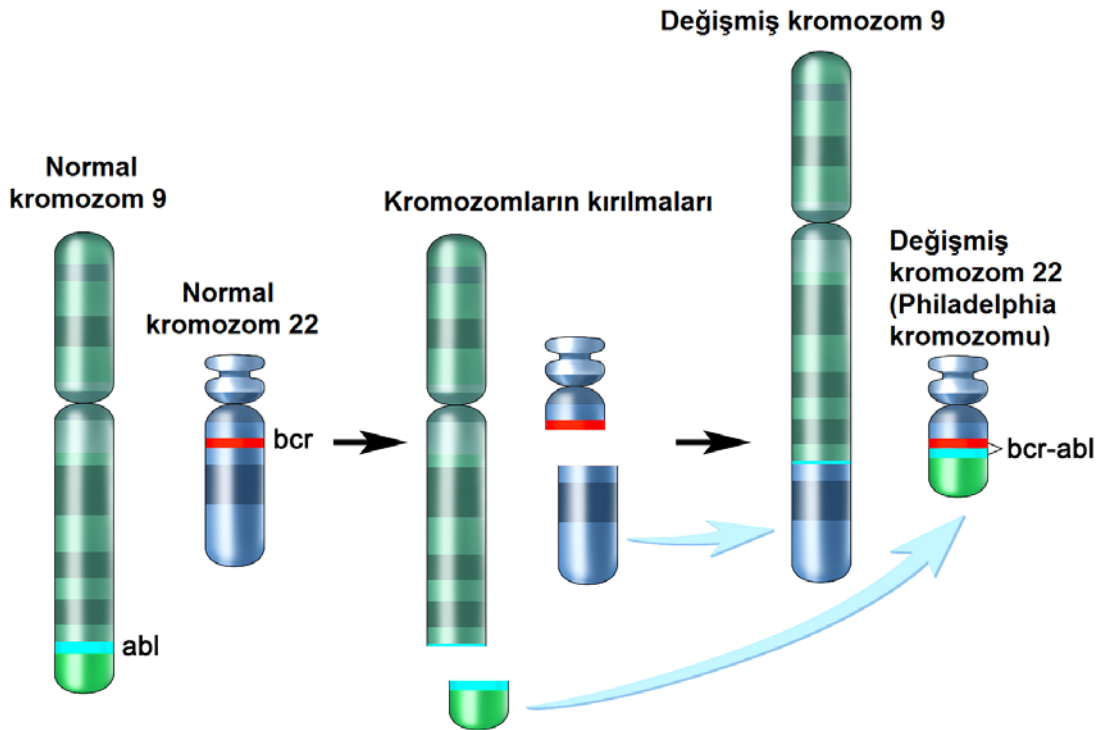
### **2.1.1.Kronik Miyeloid Lösemi (KML)**

Kronik Myeloid Lösemi, hematopoetik kök hücrelerinin neoplastik dönüşümün neden olduğu klonal bir hastalıktır (11). Myeloid, monositik, eritroid, megakaryositik, B-lenfoid ve nadiren de T-lenfoid serilerinin tümünü içerir. KML, spesifik karyotipik anomalinin saptandığı ilk hastalık olmakla beraber; biyolojik ajan (interferon) kullanılarak, lösemik klonun baskılandığı ve sağkalımın uzatıldığı, ilk neoplastik hastalıktır. Moleküler düzeyde en iyi karakterize edilmiş lösemi tipidir (12,13).

KML gelişmiş ülkelerde tüm lösemi olgularının dörtte birini kapsamaktadır. İnsidansı yılda 1/100.000’dir. Tüm yaş gruplarında gözlenebilmekle birlikte en yaygın 40-50 yaşlar arasında gözlenir. Cinsiyet farkı olmamakla beraber erkeklerde hafif bir

baskınlık vardır. Hastalığın kendine özgü bir seyri vardır. Bu süreç; stabil veya kronik faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere üç evreye ayrılabilir. KML tanısından ortalama 3-5 yıl sonra hastalık akselere veya blastik faza girer (14,15).

KML'nin ayırıcı özelliği, t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan "Philedelphia kromozomu" nun varlığıdır. Bu translokasyon Şekil-2.2'de görüldüğü gibi 22 nolu kromozom üzerindeki BCR (Breakpoint cluster region) geni ile 9 nolu kromozom üzerindeki protoonkogen c-ABL geninin birleşmesi BCR-ABL füzyon genini meydana getirir (16,17).



Şekil-2.2. 9 nolu kromozom ile 22 nolu kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Philedelphia kromozomunun oluşumu (72)

BCR proteini; farklı fonksiyonel domainler içeren kompleks bir molekül olup, sinyal proteinidir. Bu proteini kodlayan BCR geni 130 kb uzunlukta olup, 23 ekson içermektedir. 4,5kb ve 6,7kb uzunluğunda iki transkripti vardır. 1271 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlar (18). 22 nolu kromozomun q11'inde lokalize; BCR2,

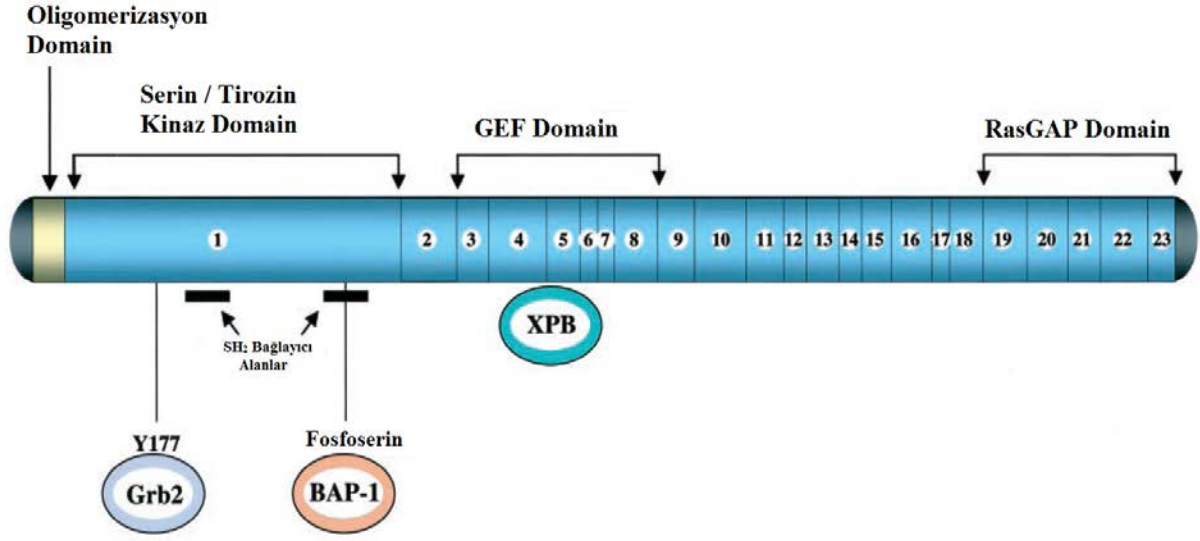
BCR3, BCR4 olarak adlandırılan, protein kodlamayan, pek çok pseudogen vardır (Çizelge 2.1)(19).

**Çizelge 2.1.** BCR Geninin Moleküler Özellikleri

<b>Lokalizasyon</b>	- Kromozom <i>22q11</i>
<b>Genin Büyüklüğü</b>	- 130 kb.
<b>Ekson Sayısı</b>	- 23 ekson (aynı zamanda alternatif ekson 1 ve 2'yi içerir)
<b>Transkriptin Büyüklüğü</b>	- 4.5 kb. ve 6.7 kb.
<b>Proteinlerin Büyüklüğü</b>	- Mr 130,000 ve Mr 160,000
<b>BCR Ekspresyon</b>	- Her zaman eksprese edilmektedir. - Beyin ve hematopoetik hücrelerde yüksek seviyededir.
<b>Genlere Bağlı BCR</b>	- Kromozom 22q11'de BCR2, BCR3 ve BCR4 pseudogenler ve kromozom 17p13'de ABR (active BCR-related) bulunmuştur.

BCR geni fonksiyonel olarak tanımlanmıştır. Tavuk embriyolarında, fare ve insan dokularında; BCR mRNA seviyesinin, beyinde ve hematopoetik hücrelerde daha yüksek olduğu keşfedilmiştir. BCR proteini; öncelikle miyeloid farklılaşmanın, erken safhasında sentezlenmekte ve hücreler polimorfonükleer lökositlere farklılaştığında ise azalmaktadır.

Fonksiyonel BCR proteini kodlayan BCR geni; birinci ekzonunda serin/threonin kinaz domaini, merkezi bir GEF bölgesi, karboksi terminal ucunda GAP bölgesi içerir (Şekil 2.3) BCR geninin 5' ucundaki proteine dönüşmeyen bölgesi (untranslate region-UTR) önemlidir, çünkü ABL (Abelson proto-onkogeni leukemia) geni, Ph kromozomu oluşumu sırasında, promoter aktivitesinin kontrol edildiği, uzunluğu 1kb olan, bu bölgeye transloke olmaktadır. Özellikle BCR geninin upstreamindeki -644. ve -718. nükleotid pozisyonları, transkripsiyonun kontrolü sırasında transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı kritik bölgedir (19).



Şekil 2.3. BCR proteininin ve fonksiyonel bölgelerinin şematik gösterimi (19)

BCR geninin ilk ekzonunun kritik önemi vardır. Çünkü BCR'nin birinci ekzonu, bilinen bütün BCR-ABL füzyon proteinlerini kapsamaktadır. BCR'nin bu bölgesi içerisinde kinaz bölgesi, SH2-bağlanma bölgelerini içeren iki 'serince zengin bölgeleri ve oligomerizasyon bölgesi bulunmaktadır. İlk ekzonda BCR proteininin serin/threonine kinaz aktivitesi vardır. Diğer kinazların fosfotransferaz bölgelerine benzer şekilde, ATP bağlanma bölgelerine homolog olan tekrar dizileri saptanmıştır. BCR, serin ve threonin aminoasit rezidülerinden /aminoasitleri üzerinden otofosforilasyon yapabilir (19, 20).

Ph pozitif hastalarda, BCR-ABL'in tirozin kinaz aktivitesi yüzünden, BCR ve BCR-ABL'de fosfotirozinler mevcut bulunmaktadır. BCR-ABL'in BCR komponentinin ilk ekzonu serin/threonin aminoasit rezidülerinde fosforilasyon olmaktadır. Aslında, BCR-ABL'in otofosforilasyonunun çoğunluğu proteinin ABL kısmının yerine BCR içerisinde gerçekleşmektedir (19).

BCR'nin ilk ekzonu içerisinde birçok SH2 bağlayıcı bölgeler bulunmaktadır (Şekil 2.3). SH2 bölgeleri; son derece korunumlu, yüz aminoasitlik non-katalitik bölgelerdir. Fosfotirozin içeren üç yada beş aminoasitten oluşan SH2 bağlanma bölgeleridir. Sinyal ileti kompleksinin bir araya gelmesi için önemlidir. BCR fosforamino asit, serin, threonin veya tirozini SH2 bağlayıcı bölgelerin ikisine bağlayabilir. BCR'a bağlanan SH2 bölgesi ABL'e aittir ve bu etkileşim fosforile serin ve threonin üzerinden gerçekleşir. BCR dizisindeki, 192–242 ve 298–413 arasındaki

aminoasitler bu etkileşim içerisinde yer almaktadırlar ve BCR-ABL'in onkogenik aktivitesi için gereklidirler. Üçüncü bir BCR SH2 bağlanma bölgesi de bulunmuştur. Bu fosforile olmuş tirozin sayesinde adaptör protein Grb2 ile birbirlerini etkilemektedirler. Sonuncu olanda Ras sinyal iletim yolundaki temel proteindir (18, 19, 20).

BCR'ın birinci ekzonunda bulunmuş olan üçüncü fonksiyonel bölge ise oligomerizasyon bölgesidir. Bu bölge aminoasit 28 ve 68 arasındaki hidrofobik aminoasit rezidülerin, yedili grup olarak tekrarlanması ile karakterize edilmiştir. BCR ve BCR-ABL bu bölge sayesinde "coimmunoprecipitate" (iki farklı proteinin etkileşimi olup olmadığını belirleyen arıtma işlemi) olduğu bulunmuştur. Oligomerizasyon bölgesindeki mutasyonlar BCR-ABL'in tirozin kinaz enzimatik aktivitesini azaltmaktadır ve BCR ve BCR-ABL arasındaki etkileşimi ortadan kaldırmaktadır. TEL (ETS ailesinden bir gen), ABL [akut löseminin t(9;12) translokasyonu] ile ortak olabilir ve ABL tirozin kinaz aktivitesini etkinleştirebilir.

Oligomerizasyon bölgesi, aynı zamanda BCR-ABL lokalizasyonunu da etkilemektedir. ABL, hem nükleer lokalizasyonunu hem de F-aktin-bağlanma (sitoplazmik) motifini içermektedir. Normal ABL, hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunmasına rağmen, BCR-ABL füzyon proteininin; sitoplazmik olduğu ve kısmen hücre iskeleti ile ilişkilendirildiği saptanmıştır. Oligomerizasyon bölgesinin delete olması; BCR-ABL'in F-aktin'e bağlanmasının azalması ile sonuçlanmaktadır. BCR'nin bu bölgesinin, BCR-ABL'in F-aktin bağlanma kapasitesini yükselttiği ve en azından BCR-ABL'in sitoplazmik lokalizasyonundan kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir.

BCR'nin merkezi (ve COOH-terminal) bölgelerinin G proteinler ile etkileşim yaptığı görülmüştür (Şekil 2.3). G proteinleri, intrasellüler sinyal iletiminde, hücre iskeleti organizasyonunda, hücre büyümesinde ve normal gelişimde önemli rol oynar. G proteinleri; GDP bağlı iken inaktif formda, GTP bağlı iken aktif formdadır. GEF, G proteininin aktif formda (GDP'yi GTP'ye dönüştürerek) olmasını sağlar. GAP ise, inaktif formda (GTP'yi hidrolize ederek) olmasını sağlar. BCR hem GAP hem de GEF bölgeleri aracılığı ile G protein aracılı sinyal ileti yollarında görevlidir (19).

GEF bölgesinde, XPB (xeroderma pigmentosum) proteini için bağlanma bölgesi vardır (Şekil 2.3). Xeroderma pigmentosum; güneş ışığına hassasiyet sonucu oluşan, DNA tamir mekanizmasındaki hata sonucu gözlenen, kalıtsal bir hastalıktır. XPB proteini DNA tamirinin yanı sıra transkripsiyonun başlangıcında da rol almaktadır.

XPB'nin hem normal BCR ile hem de p210<sup>BCR-ABL</sup> ile etkileşimi gözlenmiştir. Önemli olarak BCR cdc24 (cyclin dependent kinase) homolog bölgesi p210<sup>BCR-ABL</sup>, de bulunurken, p190<sup>BCR-ABL</sup>, de yoktur. XPB, p210<sup>BCR-ABL</sup> ile ortak ifade edildiğinde, XPB fosforile olmaktadır ve DNA tamiri yetersiz kalmaktadır. Bu olay p190<sup>BCR-ABL</sup>'in varlığında gözlenmemiştir. p210<sup>BCR-ABL</sup>'in varlığı; BCR ve XPB arasındaki normal etkileşimi engellemektedir, böylece BCR-ABL pozitif KML'deki DNA tamirindeki hata ve sonraki genomik dengesizlik sürdürülmektedir. Bu mekanizma, KML'deki klonal evrimi açıklamaktadır ve hastalığın kolay kontrol edilebilir benign fazından, ölümcül blast krizlere olan kaçınılmaz ilerlemesini sağlamaktadır.

BCR proteininin birçok proteinle (ABL, BCR-ABL, adaptör protein Grb2 ve XPB proteini) kompleks ilişkisi bulunmuştur. BCR ile etkileşime giren ilgili proteinler; 14-3-3 olarak adlandırılan asidik protein ailesindedir. Bu proteinler intrasellüler sinyal yollarında, hücre döngüsü, DNA hasar kontrol noktasında ve mitotik indükleyici Cdc25C'nin çekirdekte sitoplazmaya olan geçişinde rol oynamaktadır. İşlevsel olarak pek çok kritik bölgeye sahip olan BCR proteininin fonksiyonel özellikleri Çizelge 2.2 ile özetlenmiştir (18,19).

**Çizelge 2.2.** BCR Proteinin Karakteristik Fonksiyonları (18, 19).

<b>Serin/Tirozin Kinaz Aktivite</b>	Ekson 1	- İn vitro çalışmalarda histonları fosforile ettiği bilinmektedir; kendini fosforile ediyor. - 14-3-3 proteinleri ile birleşmektedir ve onları fosforile etmektedir.
<b>Oligomerizasyon Alanı</b>	Ekson 1	- Homotetramerleri oluşturabilir. - BCR-ABL'den transformasyon için gerekli olabilir.
<b>SH2-Bağlayıcı Alan 1</b>	Ekson 1	- Ras sinyal transdüksiyon yolaklarının anahtar proteini olan Grb-2'nin SH3'unu bağlamaktadır.
<b>SH2-Bağlayıcı Alanları 2 Ve 3</b>	Ekson 1	- Serin/rich alanında bulunmaktadır. - Bağımsız fosfotirozini, ABL'in sh2 alanına bağlamaktadır.
<b>Transkripsiyonel Suppressor</b>	M-BCR'in intronlarında	- p210 ve p190'nin farklı aktivitelerinde bu alanın yokluğu rol oynamaktadır.
<b>GEF Domain (Guanin Nükleotid Değişim Faktör Alanı)</b>	Ekson 3 -10	- Guanin nükleotid exchange faktörler olan Cde24 Dbl ve Vav ile homoloji göstermektedir. - XPB proteinini bağlamaktadır.
<b>GTPase Aktivite</b>	Ekson 19-22	- Sitoskeletal reorganizasyon için önemli olan protein p21 <sup>Rac</sup> 'i düzenlemektedir. - Nötrofil ateşleme boyunca süperoksid üretimini etkileyen Rac'in düzenlemesinde BCR rol oynamaktadır.
<b>ABL SH3 Alanını Bağlayan Molekül 3bp-1'e Homoloğu</b>	COOH-terminus	- ABL SH3 alanının delesyonu dönüşüm aktivitesini etkinleştirmektedir.
<b>Kromatin Birleşme</b>	Bilinmiyor	- Mitotik kromozomlar ve interfaz hücrelerin heterokromatinleri ile birleşmektedir.

ABL geni; moleküler ağırlığı 145 kilodalton (kd) olan, reseptör olmayan tirozin kinazı (p145<sup>ABL</sup>) kodlar. 11 ekzonu vardır ve 230 kb'lik bölgeye yayılır (Çizelge 2.3). ABL genindeki kırılma noktası genellikle ABL'nin 2. ekzonunun 5' ucunda oluşur. ABL'nin 2. ile 11. ekzonlarının (aynı zamanda a2 ile a11 olarak da adlandırılır) tamamı 22. kromozomdaki BCR geninin 12. ve 16. ekzonları (aynı zamanda b1 ve b5 ekzonlar olarak da adlandırılır) arasındaki major breakpoint cluster region (M-BCR) olarak adlandırılan bölgeye transpoze olur (12)

**Çizelge 2.3.** ABL Geninin Moleküler Özellikleri ve Fonksiyonları (18,19).

<b>Lokalizasyon</b>	- Kromozom 9q34
<b>Genin Büyüklüğü</b>	- >230 kb
<b>Ekson sayısı</b>	- 11 ekson (1a ve 2b olmak üzere iki alternatif eksonu daha vardır)
<b>Transkript Büyüklüğü</b>	- 6,0 kb ve 7,0 kb
<b>Protein Büyüklüğü</b>	- M <sub>r</sub> 145,000
<b>ABL ekspresyonu</b>	- Her zaman eksprese edilmektedir. - Miyeloid matürasyonu azalmaktadır. - Sitoplazmik ve nükleer lokalizasyon
<b>Fonksiyonlar</b>	- Non-reseptör tirozin kinaz - Nükleer translokasyon sinyal - Meiotik kromozom ile birbirlerini etkilemektedir - COOH-terminusdeki bağlayıcı alan DNA; AAC motifini bağlamaktadır. - COOH-terminusdeki bağlayıcı alan F-aktin - SH3 alanı sayesinde engellenmiş ABL - Rb, p53, p73, Atm ve siklin D hücre döngü proteinleri ile birleşmektedir. - Hücre döngüsü sırasında fosforilasyondan olarak farklıdır. - SH2 /SH3 adaptör protein ile birleşmektedir. - ABL'in overekspresyonu G tutuklamasına yol açar. - Abelson proteinle kinaz aktivitesini düzenler.

#### **2.1.1.1.BCR-ABL'in fonksiyonel özellikleri:**

**i) Kinaz aktivasyon:** Tirozin kinaz aktivitesi hücrel sinyal iletiminde ve büyümede önemlidir. Artmış kinaz aktivitesi, birçok sistemde onkojenik değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir. ABL proteini, çok düşük etkili kinaz aktivitesi olan nonreseptör tirozin kinazdır. Hem p210<sup>BCR-ABL</sup> hem de p190<sup>BCR-ABL</sup> temel olarak tirozin kinaz aktivitesini etkinleştirmektedir. p190 proteininde, yüksek düzeydeki aktivite ile birlikte, ilginç olarak otofosforile olmuş birçok tirozin BCR-ABL'in, BCR bölümünde meydana gelmektedir. Tirozin kinaz aktivitesi, füzyon proteinlerin ABL bölümünde bulunan kinaz aktivitesine dayandırılabilir. Ayrıca, BCR-ABL birçok hücrel proteinin tirozin fosforilasyonunu uyarmaktadır (19).



**ii) Ras yolakları ile etkileşim:** Ras yolaklarının BCR-ABL onkogenezis içerisindeki öneminin altı çizilmiştir, Ras aktivasyonu p190<sup>BCR-ABL</sup> ve p210<sup>BCR-ABL</sup> aracılığı ile oluşan dönüşüm için gereklidir. BCR-ABL'in Ras yolaklarıyla olan etkileşim mekanizması oldukça kompleksdir. Dahil edilmiş moleküller, adaptör protein Grb2, Ras activator SOS, RasGAP, Crkl (SH2/SH3 adaptör protein) ve yapışık protein p62Dok. Crkl ile normal ABL'in birbirlerini etkiledikleri gözlenmiştir (19).

**iii) Ship proteini ile etkileşim:** Ship proteinler (ship1 ve ship2) aynı zamanda BCR-ABL'nin downstream hedefleridir. P210<sup>BCR-ABL</sup> negatif olarak Ship1'in ekspresyonunu düzenlemektedir. Ship proteinlerinin, adaptör proteinler Shc ve Grb2 ile birbirlerini etkiledikleri görülmüştür (bu proteinler sinyal iletim yollarına aracı olan Ras'da rol oynamaktadır). BCR-ABL, spesifik kinaz inhibitör STI 571 Ship'in yeniden eksprese edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca p210<sup>BCR-ABL</sup> doğrudan ship ekspresyonunu düzenlemektedir (19).

**iv) Apoptozis üzerindeki etki:** Hematopoetik büyüme faktörlerinin apoptozisi durdurmak için olduğu bilinmektedir ve BCR-ABL, hematopoetik hücre dizilerinin değişikliklerine bağlı büyüme faktörünü baskılayabilmektedir. BCR-ABL tarafından apoptoz baskılanması antiapoptotik protein ekspresyonunun etkisiyle olabilir (Bcl-2, proapoptotik protein Bad'in fosforilasyonu, Ras bağımlı yollar) (19).

**v) Adhezyon molekülleri üzerine etki:** BCR-ABL'in tirozin kinaz aktivitesinden etkilenen bir diğer yapı, fokal adhezyon proteini Fak( focal adhesion kinase) ve paxillin'dir. Myeloid atasal ya da öncül hücrelerin olgunlaşmadan artışında, hücreler arasında adhezyon özelliklerinin hatalı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

**vi) Stat 5 üzerine etki:** Hematopoez büyüme faktörleri tarafından güçlü bir biçimde kontrol edilir. Myeloid hücrelerde interlökin-3, granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör (GMSF) Jak/Stat sinyal yolağını uyaracak biçimde görev yapar. Jak proteinini tirozin aminoasitinden fosforilleyerek, stat proteinini aktive eder. p210<sup>BCR-ABL</sup> ve p190<sup>BCR-ABL</sup> stat proteinlerinin birçok üyesini fosforille ederek stat yolağını uyarır (19).

### 2.1.1.2.KML Biyolojisi

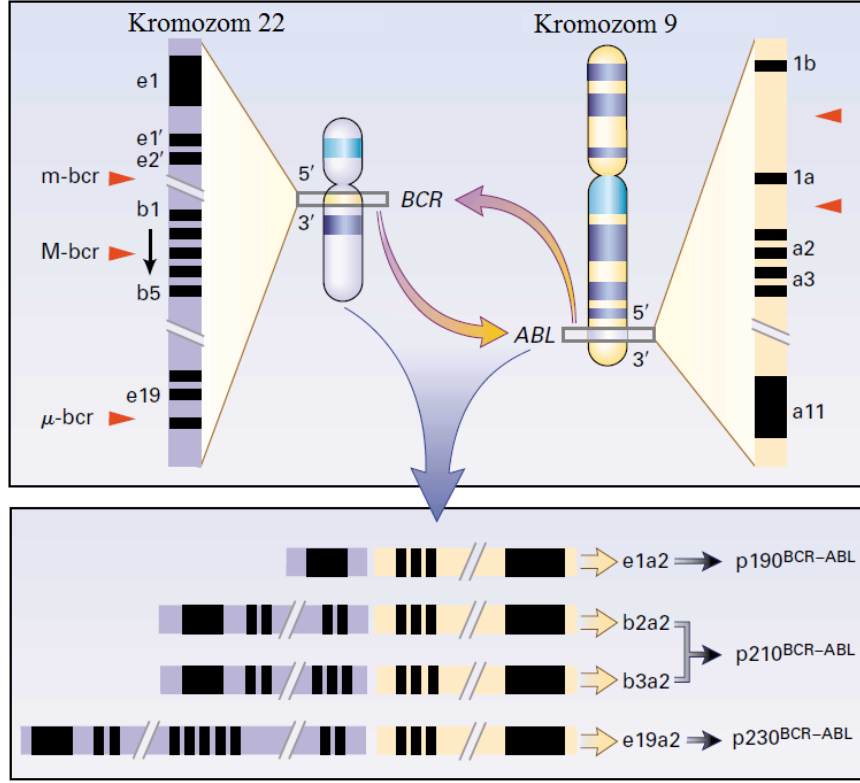
#### i-Moleküler Biyoloji

Philadelphia Kromozomu; 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11) sonucu oluşan, kısaltılmış 22 nolu kromozomdur. KML'nin en belirleyici özelliğidir ve hastaların %90-95'inde bulunur. Aynı zamanda çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemilerinin (ALL) %5'inde ve erişkin ALL'lerin %15-30'unda, yeni tanı almış AML'lerin ise %2'sinde saptanır. Philadelphia kromozomu translokasyonu kromozom 9q34'teki 3' ABL gen segmentini, kromozom 22q11'deki 5'BCR gen segmentine ekler. Böylece kimerik BCR-ABL messenger RNA (mRNA)'ya transkripsiyonu olan hibrid BCR-ABL geni oluşur (21). BCR'deki farklı kırılma noktalarına göre farklı boyutlarda BCR-ABL füzyon geni oluşur. Oluşan füzyon mRNA'lar (e1a2, b2a2, b3a2, e19a2) farklı kimerik proteinlere (p190, p210, p230) transkribe olurlar.

KML'li hastaların % 90'ında sitogenetik çalışmalar ile t(9;22)(q34;q11) yani Philadelphia kromozomu saptanır. % 5'inde (% 2-10) varyant Philadelphia kromozomu translokasyonu saptanır. Varyant philadelphia kromozomu translokasyonu 9q34 ve 22q11 ile birlikte diğer bir veya birkaç genomik bölgeyi içine alır. Bu genomik bölgelerden en sık görülenleri: 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 ve 22q13'tür. Varyant philadelphia kromozomu translokasyonu içerenlerin fenotipik ve prognostik özellikleri, standart philadelphia kromozomu translokasyonu olanlardan farklı değildir. Klinik olarak KML tanısı alan hastaların bir bölümünde ise, sitogenetik çalışmalar ile karyotip normal saptanır ve bunlar Philadelphia kromozomu negatif olarak adlandırılır. Fakat bu hastaların yarısında moleküler çalışmalar ile BCR-ABL füzyon ürünleri saptanır. Philadelphia kromozomu negatif KML'lilerin diğer yarısında ise BCR-ABL füzyon geni saptanamaz (22, 23).

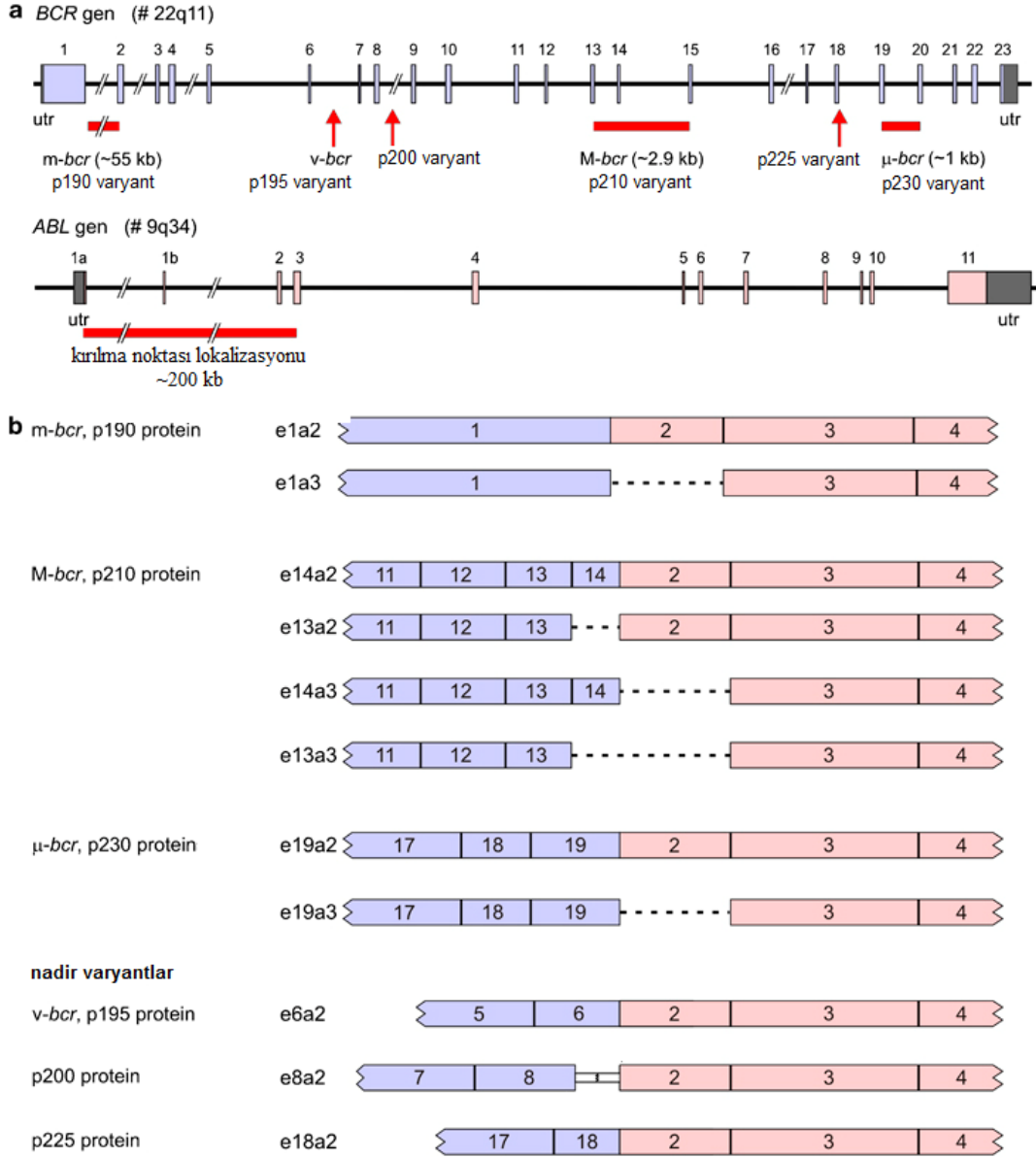
ABL'nin 2. ile 11. ekzonlarının (a2 ile a11) tamamı 22. kromozomdaki BCR geninin 12. ve 16. ekzonları (b1 ve b5) arasındaki M-BCR'a transloke olur. BCR'deki kırılma noktasının lokalizasyonu ekzon b2 ve b3 arasındaki 5' veya ekzon b3 ve b4 arasında 3' ucunda olabilir. b2a2 veya b3a2 birleşimi şeklinde oluşan BCR-ABL füzyon geni 8,5 kb büyüklüğündeki mRNA'ya transkribe olur. Oluşan mRNA'nın translasyonu 210 kd'luk kimerik bir proteine dönüşür. Bu protein p210<sup>BCR-ABL</sup> olarak adlandırılır. KML vakalarının çoğunda b2a2 veya b3a2 transkriptleri olurken, %5'inde alternatif

birleşmeler sonucu farklı füzyon proteinleri oluşur (Şekil 2.4). b2a2 ve b3a2 transkripti olanlarda; klinik özellikler, tedaviye cevap ve prognoz benzerdir. Farklı olarak b3a2 transkripti olanlarda daha yüksek trombosit sayısı görülür (12,19).



Şekil 2.4. KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu (12)

Philadelphia kromozomu pozitif olan yetişkin ALL vakalarının %50'sinde ve çocuk ALL vakalarının %80'inde ve nadiren de KML vakalarında; 22. kromozomdaki kırılma, M-BCR'nin 5' ucunda yer alan ve minor breakpoint cluster region (m-BCR) olarak adlandırılan bölgede olur. e1' ve e2' eksonlarının ABL genindeki eksonla birleşmesiyle ortaya çıkan BCR-ABL transkriptinin translasyonu sonucu oluşan 190 kd'luk füzyon proteini p190<sup>BCR-ABL</sup> olarak adlandırılır. BCR genindeki üçüncü kırılma noktasının lokalizasyonu m-BCR bölgesinin 3' ucunda yer alan eksonlar olan e19 ve e20 arasında olur ve bu bölge  $\mu$ -BCR olarak adlandırılır. e19a2 birleşimi ile oluşan transkriptin translasyonu sonucu oluşan 230 kd'luk protein p230<sup>BCR-ABL</sup> olarak adlandırılır (Şekil 2.5). KML'deki p190<sup>BCR-ABL</sup> ekspresyonu monositozla ve displastik değişikliklerle, p230<sup>BCR-ABL</sup> ekspresyonu ise kronik nötrofilik lösemi varyantı ve trombositozla ilişkili olabilir (19, 23,24).

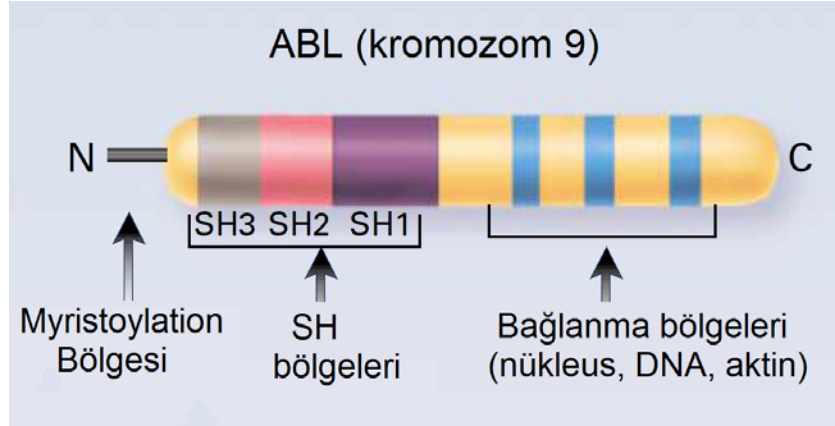


**Şekil 2.5.** KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ile oluşan füzyon genler (80)

## ii-BCR-ABL Sinyal Yolakları

ABL proteinleri, sinyal iletiminde ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahip, reseptör olmayan tirozin kinazlardır. ABL'nin N-terminal bölgesindeki 2 adet SRC homolog bölge (SH2 ve SH3), ABL'nin tirozin kinaz fonksiyonunu düzenleyen katalitik bölgelerdir. Yine N-terminal ucundaki myristoylation dizisi ABL'i plazma membranındaki proteinlere bağlar (25).

SH2'nin fonksiyonel bütünlüğündeki defektler, fosfotirozin bağlanmasını ve ABL'in transforme edici kapasitesini azaltır. Tirozin kinaz fonksiyonu üzerine SH3'ün, negatif düzenleyici etkisi vardır. SH3'ün delesyonu, ABL'nin transformasyonunu kolaylaştırır. ABL'nin C-terminal kısmında DNA-bağlayıcı bölge, nükleer lokalizasyon sinyalleri ve aktin için bağlanma bölgesi bulunur (Şekil 2.6.)(12).

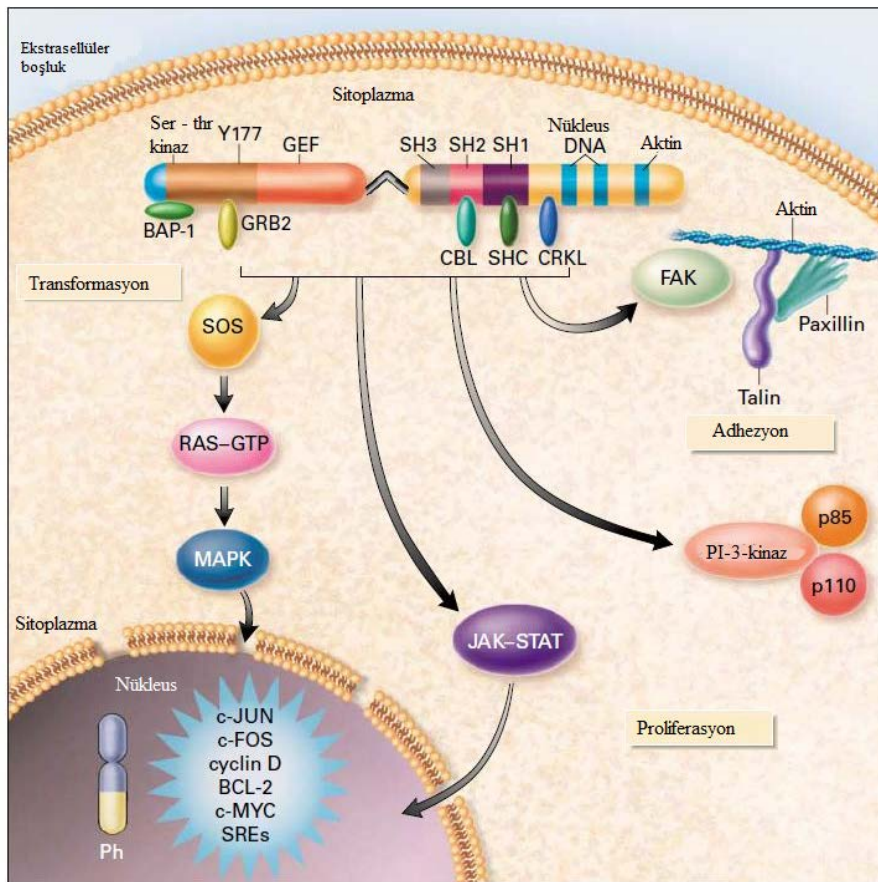


Şekil 2.6. ABL proteinine ait fonksiyonel bölgeler (12)

ABL ve BCR'nin çeşitli yapısal değişimleri BCR-ABL'nin lökomojenik transformasyonunu kolaylaştırır. BCR'nin N-terminalindeki çift sarmal motif, tirozin kinaz aktivitesini artırır ve F-aktin'in ABL tarafından bağlanmasını sağlar. BCR'nin serin-treonin kinaz bölgesi, ABL tirozin kinaz ve p210<sup>BCR-ABL</sup> tarafından düzenlenen sinyal yollarını aktive eder. BCR'nin ABL'ye, N-terminal füzyonu ABL'nin SH2 segmentine geniş bir aminoasit sekansı ekler. BCR, komşu SH3 kinaz düzenleyici bölge ile etkileşerek ABL'nin yapısal olarak aktif bir tirozin fosfokinaza dönüşmesine neden olur (26).

P210<sup>BCR-ABL</sup> ve p190<sup>BCR-ABL</sup> füzyon proteinlerinin tirozin fosfokinaz aktivitesi normal ABL protieni olan P145<sup>BCR-ABL</sup>'den daha fazladır. P210<sup>BCR-ABL</sup>'nin yapısı multiprotein etkileşimine neden olur ve farklı intrasellüler sinyal yollarını aktive eder. Birçok BCR bölgesi, çeşitli adaptör proteinlerin bağlanmasına yardım eder. Bu adaptör proteinlerden bazıları growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), CRK-oncogene like protein (CRKL), casitas B-lineage lymphoma protein (CBL) ve SRC homology 2-containing protein (SHC)'dir. GRB2'nin SH2 bölgesi P210<sup>BCR-ABL</sup>'nin

BCR kısmındaki bir tirozin rezidüsüne (Y177) bağlanır, bu olay P210<sup>BCR-ABL</sup>'nin RAS'a bağlanmasını sağlar. RAS bir guanozin trifosfat bağlayıcı proteindir, hücre bölünmesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynar. Bu özelliği ile KML patogenezindeki en belirgin sinyal yollarının merkezinde yer alır. RAS'tan sonraki sinyal akışı tam olarak karakterize edilememiştir, JNK (JUN kinase ) veya yeni adıyla stress-activated protein kinase (SAPK) yolağı gibi MAPKs (mitogen activated protein kinase)'ları içerebilir. P210<sup>BCR-ABL</sup>'nin RAS'ı içermeyen sinyal yolları, C-Myc gibi belirlenmiştir ama bunların KML patogenezindeki rolü belirsizdir (20, 27).



Şekil 2.7. p210<sup>BCR-ABL</sup>'nin sinyal yolları (12)

RAS KML'deki birçok sinyal yolağının merkezinde yer alır. BCR-ABL'deki birçok bölge RAS için kontrol görevi yapar. RAS'ın aktivasyonu GRB2, CBL, SHC ve CRKL gibi adaptör proteinler üzerinden olur. Adaptör proteinler aynı zamanda p210<sup>BCR-ABL</sup>'yi PI-3 kinaz gibi fokal adhezyon komplekslerine ve JAK-STAT gibi diğer mesajcı sistemlere bağlar. RAS'tan sonraki sinyal akışı tam karakterize

edilememiştir. Muhtemelen MAPKs özellikle de JNK yolağını içerir. BAP-1 (BCR-associated protein 1), GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), CBL (casitas B-lineage lymphoma protein), SHC (SRC homology 2-containing protein), CRKL (CRK-oncogene-like protein), JAK-STAT (Janus kinase-signal transducers and activators of transkription), FAK (focal adhesion kinase), SOS (son-of-sevenless), GDP (guanozin difosfat), GTP (guanozin trifosfat), SRE (stimulated response element), Ser-thr (serin-treonin), Y177 (bir tirozin rezidüsünü), GEF (GDP-GTP exchange factor) göstermektedir (19, 20, 27).

**Çizelge 2.4.** p210<sup>BCR-ABL</sup> karakteristik özellikleri

<b>P210'nun Kodlandığı Gen Bölgesi</b>	Kromozom <i>22q11</i>
<b>Genin Büyüklüğü</b>	- Kırılma noktasının sitesine göre farklılaşmaktadır. - 5.8-kb (M-BCR) olarak bilinen BCR geninin merkezi alanındaki kırık (kırılmalar m-BCR'in ekson 2 ve ekson 3 veya ekson 3 ve ekson 4'de oluşmaktadır) - ABL genindeki kırılma ekson 1'in upstreaminde oluşmaktadır.
<b>Transkriptin Büyüklüğü</b>	8.5-kb BCR-ABL transkript
<b>Lokalizasyon</b>	-Sitoplazmik protein -Vezikül içindeki kortikal F-actin'de yerleşmiştir
<b>Fonksiyonlar</b>	-Tirozin kinazi aktive eder. -Sitoskeletal aktine ve mikrofilamentlere bağlanabilir. -Miyeloid farklılaşma ile ekspresyon azaltmaktadır -Substratlar sinyal transdüksiyon moleküllerle alakalı RAS'i içerebilirler. -Tirozin fosfoprotein Crkl ile, SH2/SH3adaptor protein ile kompleks oluşturur. -Docking protein p62doc ile birbirlerini etkilemektedirler. -Apoptozisi engellemektedir -Jak/Stat yolaklarına bağlanmıştır. -Fosfotidilinositol 3-kinaz/ Akt yolaklarına bağlanmıştır. -Jun kinazi aktive etmektedir. -XPB protein ile birbirlerini etkilemektedir ve bu proteini düzenlemektedir. -Kısmen Ras yolakları üzerinden aracılık etmiş aktiviteyi değiştirmektedir. -Yapışma özelliklerinde değişimlere neden olabilir. -Ship proteinin ekspresyonu down-regulate yapmaktadır (down-regulate; uyarana verilen cevabın bastırılma veya azaltılması olayı)

### 2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinin klonal, malign hastalığıdır. ALL'deki malign hücreler; gelişimlerin erken safasında duraklayan, lenfoid öncül hücreleridir. Kemik iliğinde çoğalarak normal hematopoeitik hücrelerin yerini alıp, normal kan hücrelerinin yapılmasını engellerler. Aşırı çoğalma kabiliyeti gösteren lösemik hücrelerin; kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesi ile karakterizedir. Çoğu zaman spesifik kromozomal translokasyonlara, ikincil anormal gen ekspresyonundan dolayı meydana gelmektedir (28,29).

Akut lösemiler; tüm kanser türlerinin %30'unu, lösemilerin ise %80'ini oluşturmaktadır. ALL, yetişkinlerdeki lösemilerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. ALL, erkeklerde kadınlara oranla daha sık (erkek/kız oranı:1,2-1,3) görülmektedir. Yetişkinlerde ALL, daha çok 15-50 yaş aralığında görülürken, 70 yaş ve üzerinde en yüksek değerlere ulaşmaktadır. ALL, çocukluk çağında en sık görülen malignite olup, 1-4 yaş aralığındaki çocuklarda daha sık görülmektedir (10, 30).

Lösemi, tek bir miyeloid ya da lenfoid progenitör hücrenin malign transformasyona uğraması ve bu transforme hücrenin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturması sonucu gelişmektedir. Akut lösemi hücrelerinin özelliği, farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Farklılaşma bozukluğu ya da aşırı proliferasyon sonucu lösemi hücreleri, kemik iliğinde birikmektedir. Lösemi hücreleri öncelikle kemik iliğinde proliferasyon olup, daha sonra periferik kana geçerek, diğer dokulara yayılmaktadır (10).

46'dan fazla kromozoma sahip hücrelerin bulunduğu (hiperdiploidi) ALL olgularında, prognoz daha iyi olduğu; 46'dan az kromozoma sahip (hipodiploidi) ALL olgularında ise, prognoz daha kötü olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (31, 32, 33).

Kromozomal yapısal anomaliler, ALL'de sık olarak bulunmakta ve olguların yaklaşık %40'ında translokasyon tespit edilmektedir. Bu translokasyonların lösemi patogenezinde rol oynadığı ve bazılarının kötü prognozu etkilediği bilinmektedir. Bu translokasyonlardan biri olan t(9;22)(q34;q31); çocukluk çağı ALL'de %5 oranında görülürken, yetişkin ALL'de bu oran %25'dir (34, 35).



Lösemilerde meydana gelen kromozomal anomalilerinin sitogenetik analizi; lösemi tipinin belirlenmesinde, remisyon ve relaps durumlarında hastalığın prognozunun anlaşılmasında ve minimal residual hastalığın takibinde önemli rol oynamaktadır (34, 36, 37).

### **2.1.2.1.Morfolojik Sınıflandırma**

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologlardan oluşan bir grup tarafından, periferik yayma ve kemik iliği preparatlarının morfolojik yönden incelenmesiyle FAB (Fransız-Amerikan-British) sınıflandırması ortaya konmuştur. Bu sınıflandırmada hücrelerin büyüklüğü, nukleus şekli, nukleolus sayısı, nukleus-sitoplazma oranı, vakuol, sitoplazmanın bazofili derecesi gibi özellikler esas alınmaktadır (38, 39).

FAB sınıflandırılmasına göre, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) L1, L2 ve L3 olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (30).

#### **i. FAB L1 Tip**

Çocukluk çağı ALL'lerinin %85'ini oluşturmaktadır. Blastlar küçük, birbirine benzer ve dar sitoplazmalıdır. Hücrelerin çoğunda nukleolus bulunmaz veya az sayıdadır. Vakuol yoktur. L1 lenfoblastlar; yüksek remisyon-indüksiyon oranı, uzamış remisyon ve sağkalım oranı göstermektedirler (30, 38).

#### **ii. FAB L2 Tip**

L2 alt tipi erişkinlerde daha sık görülmekle birlikte, çocukluk çağı ALL'lerde de %14 oranında görülmektedir. L2 alt tipinde, hücreler daha büyük ve daha geniş sitoplazmalıdır. Hücrelerin büyüklükleri farklı olup, biçimleri pleomorfizm göstermektedir. Nukleolus belirgin olup, bir veya daha fazla sayıdadır. Hücreler vakuollere sahip olabilir (10,30). L2 morfolojisindekiler diğer prognostik faktörlerden bağımsız olarak daha yüksek relaps oranı ile kötü prognoz gösterirler. Diğer prognostik özellikleri iyi de olsa daha yoğun bir protokolle tedavi edilmeleri gerekmektedir (38).

### iii. FAB L3 Tip

ALL'lerin %1'ini oluşturmaktadır. L3 alt tipinde hücreler büyük ve homojendir. Sitoplazma koyu mor bazofiliktir. Hücreler bol vakuollü ve nukleoluslu hücrelerdir. Bu hücrelerde mitoz siktir. L3 alt tipi, Burkitt lenfomasının lösemi şekli olarak kabul edilmektedir (10, 38).

### 2.1.2.2. İmmunolojik Sınıflama

Bu sınıflandırma klinik olarak daha uygun olup, temeli lösemi hücre yüzeyindeki belli antijenlerin ekspresyonuna dayanmaktadır. Sağlıklı lenfositler farklılaşmanın değişik aşamalarında düzenli olarak spesifik antijenler eksprese etmektedirler (39).

Yüzey antijenleri, başkalaşım kümeleri (Cluster of Differentiation, CD) olarak adlandırılmakta ve hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğu konusunda bilgi vermektedir.

Bu sınıflandırmaya göre ALL 4 tipe ayrılmaktadır:

**a) Erken Pre-B Hücreli ALL:** Çocuk ve yetişkinlerdeki ALL vakalarının yaklaşık %70'i bu kategoride yer almaktadır. Hastalar çoğunlukla gençtir (1-9 yaş) ve düşük lökosit sayılarına sahiptirler. 1 yaşından küçük çocukların yarısı, daha büyük yaştaki çocukların %10'u ve yetişkinlerin % 10-40'ı CD10 eksprese etmemektedirler. CD10 ekspresyonunun eksikliği, yüksek lökosit sayısı ve kötü prognozla ilişkilidir (39).

**b) Pre-B Hücreli ALL:** Bu grup, sitoplazmik immunoglobulin ağır zincirlerinin ekspresyonu ile tanımlanmaktadır. Tüm ALL vakalarının yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır ve erken Pre-B Hücreli ALL'ninkine benzer sıklıkta CD10 eksprese etmektedir. Hastalar yüksek hemoglobin seviyesi, lökosit sayısı ve laktik dehidrogenaz seviyesine sahiptirler (39).

**c) T-Hücreli ALL:** Çocukluk çağı ALL vakalarının yaklaşık %13-15'ni oluşturmaktadır. İleri yaş, yüksek lökosit sayısı, merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu ve mediastinal kitlelerle ilişkilidir (39).

**d) Olgun B-Hücreli ALL:** ALL hastalarının % 5'inden daha azında gözlenmekte ve Burkitt lenfomaya özgü bir lösemik faz göstermektedirler. Hastalarda abdominal lenfadenopati ve sıklıkla MSS tutulumu da görülmektedir. Morfolojik olarak FAB sınıflandırmasının L3 tipini göstermektedir (40).

### 2.1.2.3.ALL'de Gözlenen Yapısal Kromozom Anomalileri:

Çocukluk çağı Akut lenfositik lösemilerdeki klonal olarak gözlenen önemli bazı translokasyonlar ve oluşturdukları füzyon genleri Çizelge 2.5.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Çocukluk çağı ALL'lerde klonal gözlenen önemli bazı translokasyonlar ve oluşturdukları füzyon genleri (36).

	Translokasyon	Füzyon geni	Sıklığı (%)	Prognozla ilişkisi
<b>Pediyatrik ALL</b>	t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	17-25	
	t(9;22)(q34;q31)	BCR-ABL	5	Kötü
	t(1;19)(q23;p13)	PBX1-E2A	5	
	t(8;14)(q24;q32)	myc-IgH	2-5	
	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	3	Kötü
	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL-ENL	< 1	Kötü

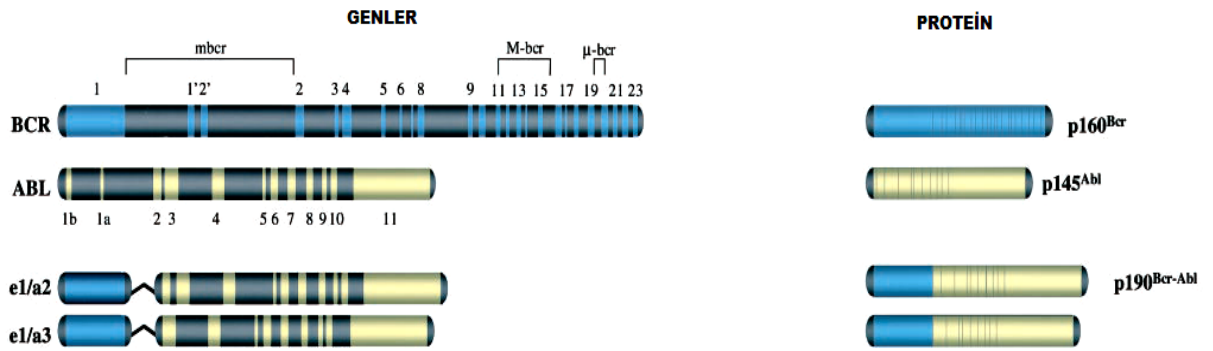
#### a) t(9;22)(q34;q31) translokasyonu (p190<sup>BCR-ABL</sup>)

9. ve 22. kromozom arasındaki translokasyon sonucunda “Philadelphia kromozomu (Ph)” ortaya çıkmaktadır. t(9;22)(q34;q11), daha çok(%90) KML ile karakterize olmasına rağmen, çocukluk çağı ALL'de %3-5, yetişkinlerde ise %25 oranında görülmektedir(34,41). 22q11'de bulunan BCR geni ile 9q34'te bulunan ABL protoonkogeninin füzyonu sonucu BCR-ABL adı verilen kimerik bir protein oluşmaktadır(41). Ph kromozomu bulunan ALL olgularında, kırık noktası BCR geninin ekson 1 ve ekson 2 (e1 ve e2) arasında “minör breakpoint cluster region (m-BCR)” adı verilen bir bölgede oluşmaktadır. ABL protoonkogenindeki kırık noktası da ekson 1 ve ekson 2 (e1-a2) arasında bulunmaktadır. Oluşan füzyon sonucunda ortaya 7 kb'lık bir

mRNA çıkararak, 190 kD ağırlığında bir protein oluşmakta ve p190<sup>BCR-ABL</sup> olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.8.). Çocukluk dönemi ALL’inde Ph(+) saptanan olguların yaklaşık %90’ında p190<sup>BCR-ABL</sup> füzyon proteini görülmektedir (19,41).

KML’de ise kırık, ekson 13 ve 14 (b2a2) ya da ekson 14 ve 15 (b3a2) arasında bulunan “major breakpoint cluster region (M-BCR)” adı verilen bir bölgede oluşmaktadır. Oluşan füzyon sonucunda 8,5kb’lık mRNA oluşmaktadır. t(9;22)(q34;q11), KML’de de görülmesine rağmen BCR genindeki kırık bölgelerine bağlı olarak farklı yapıda füzyon genleri oluşmaktadır. KML’de oluşan füzyon proteini, 210 kD’luk p210<sup>BCR-ABL</sup> adı verilen bir proteindir.

Her iki durumda da oluşan füzyon protein, sitoplazmada bulunmakta ve hücreyi apoptoza dirençli hale getirmektedir. Ph kromozomunun pozitif olması çocukluk çağı ALL’de kötü prognozun belirtisidir (34, 41).



Şekil 2.8. ALL’de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu görülen p190<sup>BCR-ABL</sup> geni (19)

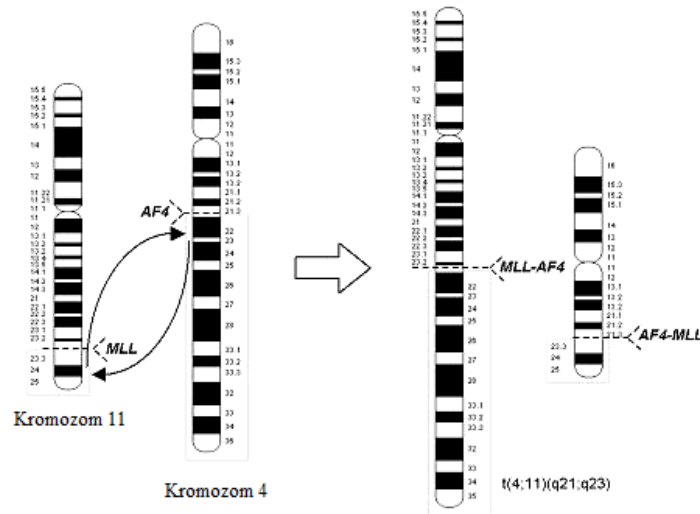
9 nolu kromozom üzerindeki BCR geni ile 22 nolu kromozom üzerindeki ABL genlerinin fonksiyonları ve karakteristik özellikleri hakkında Bölüm 2.1.1.1’de detaylı bilgiler verilmiştir. t(9;22)(q34;q11) oluşan p190<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geninin karakteristik özellikleri Çizelge 2.6. da gösterilmiştir.

**Çizelge 2.6.** p190<sup>BCR-ABL</sup> karakteristik özellikleri

<b>P190'nın kodlandığı gen bölgesi;</b>	-Kromozom 22q11
<b>Genin Büyüklüğü</b>	-NH2-terminal BCR dizilerini (BCR'in ekson 1'i) ve COOH-terminal ABL dizilerini içermektedir BCR geninin 1 intron bölgesinde 5' tarafından kırılma
<b>Transkriptin Büyüklüğü</b>	-7.0kb
<b>Lokalizasyon</b>	-Sitoplazmik protein
<b>Fonksiyonlar</b>	-Tirozin kinazi aktive eder. -Apoptozisi engeller. -Jak/Stat yolaqlarına bağlanır. -Fosfotidilinositol 3-kinaz/ Akt yolaqlarına bağlanır. -Ras yolaqları sayesinde aracılık etmiş aktiviteyi değiştirir. -ABL tirozin kinaz inhibitörün bozulmasına bağlı ubiquitine neden olur (Abelson etkileşim protein). -Yapışma özelliklerinde değişimlere neden olabilir.

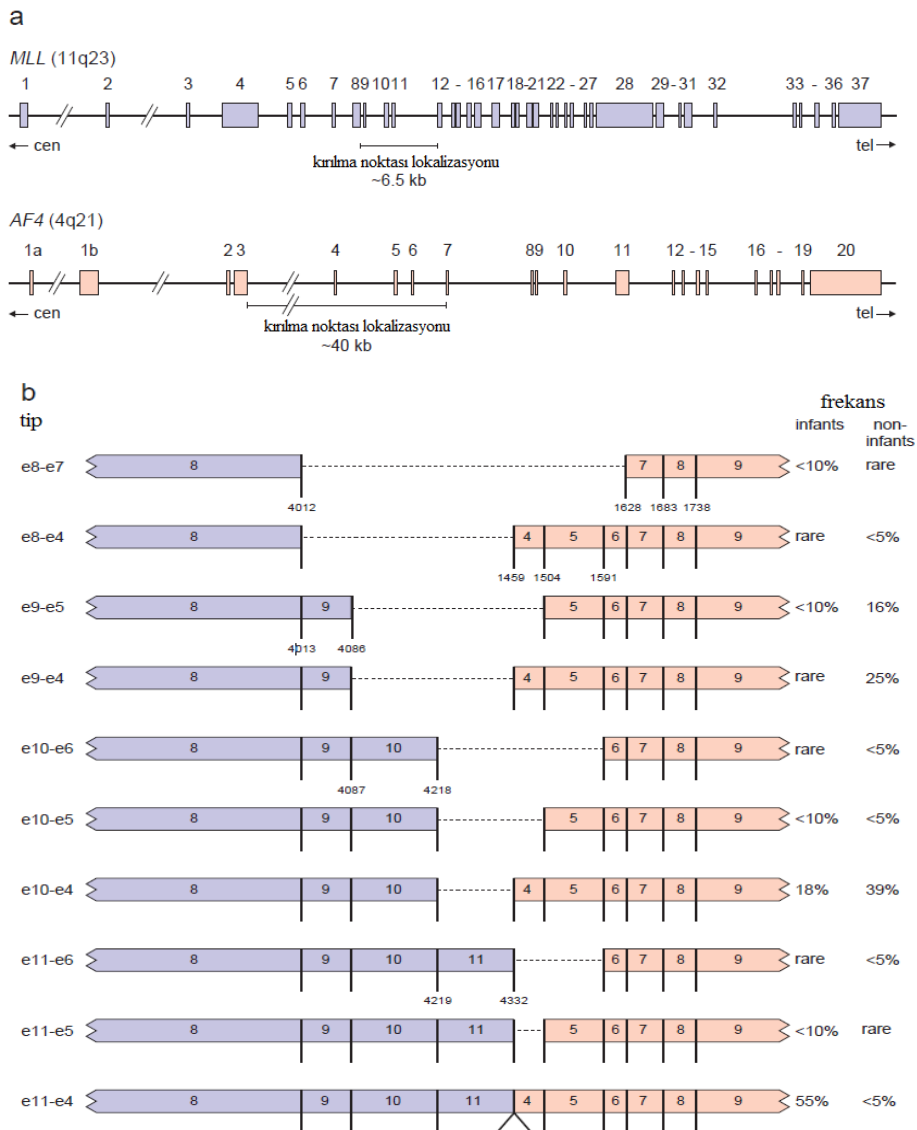
**b) t(4;11)(q21;q23) translokasyonu (MLL-AF4 füzyon geni)**

1 yaşın altındaki ALL'lerde %60, çocukluk çağı ALL'lerde %2 ve yetişkinlerde %3-6 oranında görülmektedir. Bu translokasyonun daha çok 2 yaşın altındaki çocuklarda ve dişilerde(%60) görüldüğü saptanmıştır.t(4;11)(q21;q23) sonucunda MLL-AF4 (ALL1 Fused Gene From Chromosome 4) füzyon geni oluşmaktadır (Şekil 2.9.).



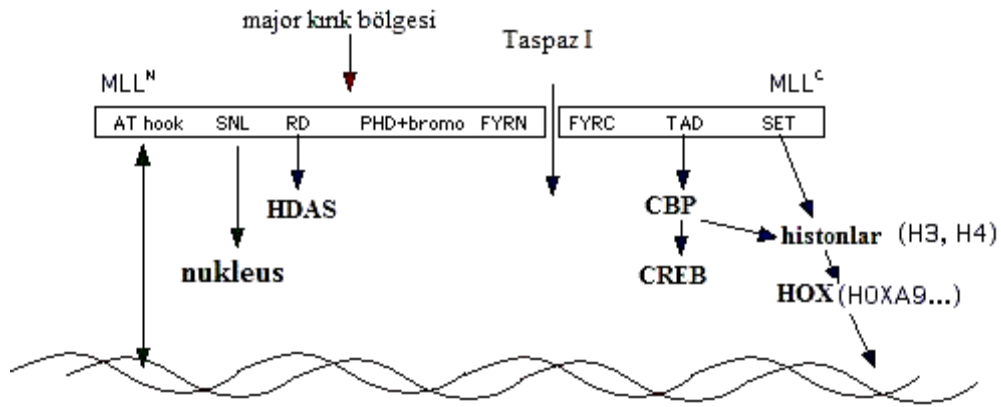
**Şekil 2.9.** t(4;11)(q21;q23) sonucunda MLL-AF4 füzyon geninin şematik şekli

4q21'deki AF4 geni ile 11q23'teki MLL geninin translokasyonu sonucu oluşan füzyon gen, 12kb'lık mRNA transkribe etmektedir. AF4 geninin kırık noktası, 3. ve 7. ekson arasındaki 40 kb'lık bir bölgededir ve AF4 geni, serin ve prolince zengin bir protein kodlamaktadır (Şekil 2.10). Bu translokasyonun yol açtığı lökomogenik etki bilinmemekle birlikte; 11q23'te değişkenlik gösteren kırılma noktaları ile MLL bölgesinin translokasyonu sonucu, 11q23'ten telomere kadar uzanan parça kaybı ile 5' MLL geni tarafında kodlanan, der(11) füzyonunun onkogenik bir füzyon proteini olduğu düşünülmektedir (33, 42, 43, 44).



**Şekil 2.10.** t(4;11)(q21;q23) içerisinde bulunan MLL ve AF4 geninin intron / ekson yapısının şematik diyagramı (Sentromer ve telomer eğilimi, ekson numaralandırması ve uygun kırılma noktası alanlarında gösterilmiştir). (b) t(4;11) sonucunda farklı MLL-AF4 füzyon türevleri (57)

MLL (Mixed Lineage Leukemia / Myeloid- Lymphoid Leukemia) gen bölgesi; 11q23'te lokalizedir. MLL geninin uzunluğu, yaklaşık 100 kb olup, 36 ekzon içermektedir. mRNA büyüklüğü 13-15 kb'dır. MLL geninin ürünü olan protein, 3968 amino asitten oluşup, 431 kD ağırlığındadır. Bu protein, N terminalinde 3 adet AT-hook domaini içermektedir ve bir bölgesi memelilerin DNA metil transferazı ile homoloji göstermektedir(Şekil 2.11). MLL geni; HRX, Htrx-1 ve ALL-1 olarak da adlandırılmaktadır (45, 46, 47, 48, 49).



Şekil 2.11. MLL proteininin şematik yapısı (50).

MLL geni, geniş bir alanda eksprese olmakla birlikte; özellikle beyin, böbrek, tiroid dokularında, B lenfosit ve miyeloid hücrelerinde eksprese olmaktadır. Hox genleri; homeobox gen ailesinden olup, erken embriyonik dönemde bazı genlerin transkripsiyonunun kontrolünde ve hematopoetik farklılaşma esnasında oldukça etkilidir. MLL geni, histonların asetilasyonu ve metilasyonu sırasında Hox genlerinin promotoruna bağlanmaktadır. MLL geni, Hox geninin ekspresyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. MLL geninde meydana gelen kırılmalar, rekombinasyonlar ve diğer genlerle birlikte meydana getirdiği kimerik füzyonlar, fonksiyonunun değişmesine neden olmaktadır (Çizelge 2.7.). Bu sebepten dolayı, hematopoetik hücrelerde Hox geninin ekspresyon profilinin değişmesi, Hox proteinlerinin fazla miktarda eksprese olmasına ve lösemilere özgü tablonun oluşmasına neden olmaktadır (42, 45, 47, 50, 51, 52, 53).

MLL geninin ürünü olan protein, erken embriyonik dönemde Hox geninin transkripsiyon düzenleyici faktörü olarak görev almaktadır. Hess ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; MLL gen bölgesi çıkarılmış olan fareler incelendiğinde, farelerin hematopoetik hücre farklılaşmasında anomaliler saptanmıştır. Farelerde yapılan bir başka çalışmada; t(9;11)'i taşıyan farelerde yaklaşık olarak 1 yıldan sonra lösemenin ortaya çıktığı belirlenmiş ve MLL geninin lökomogenezde önemli oranda rol oynadığı saptanmıştır. Hox A9 geninin yüksek orandaki ekspresyonu sonucu, fare modellerinde AML'ye eğilimin arttığı gözlenmiştir (46, 54, 55).

**Çizelge 2.7.** MLL Proteinin Karakteristik Fonksiyonları (50).

AT hook :	3 adet AT hook birimi içermektedir ve bu birimler DNA'nın minör oluşuna bağlanırlar.
SNL :	2 adet "Speckled Nuclear Localization- Benekli Nüklear Bölge" sinyalleri
RD :	Repression Domain-Baskılayıcı Üniteler(RD1 ve RD2)
RD1 ve CXXC:	Baskılayıcı Ünite(RD1) ve Sistein Metil Transferaz CpG'ce zengin bölgelere bağlanırlar
RD2:	Histon deasetilasyonunda rol oynar.
PHD + bromo :	3 adet sisteince zengin çinko parmak ünitesi, 1 adet asetilenmiş histonlara bağlanan bromodomain ve 1 adet homeodomain içermektedir. Bu birimler protein-protein etkileşiminde yer alır.
FYRN ve FRYC :	p300/320 N-term proteinini(MLLN) ve p180 C-term proteinini(MLLC) birbirine bağlamaktadır. MLL proteini nukleusa içerisine girmeden önce Taspoz 1 tarafından ikiye ayrılmakta ve daha sonra bir transkripsiyon faktörü olan TFIID tarafından multiprotein kompleksi haline getirir.
TAD :	Transaktivasyon Domaini; CBP'yi bağlar ve Hox gen bölgesi içerisindeki H3 ve H4' ün asetillenmesinde görev alır.
SET :	Enhancer of Zeste ve Trithorax Birimi; Metiltransferaz, H3'ü metiller. HOX alanındaki kromatinlerin histonları dâhil ederek translokasyon olmasını sağlar.



Southern Blot tekniği ile MLL gen bölgesindeki yeniden düzenlemelerin, 5. ve 11. ekson arasındaki 8.3 kb'lık bir kırık noktada meydana geldiği belirlenmiştir. MLL geni, 87 adet farklı gen ile yeniden düzenleme yapabilmektedir. Translokasyon yaptığı genlerin 52'si moleküler analizler ile belirlenmiştir (56).

MLL'in majör kırılma bölgesi çok iyi karakterize edilmiştir. Ekson 8 ve 12 arasındaki 6,5 kb alanı içerisindeki breakpoint cluster; kırılma en sık pediatrik ve yetişkin ALL'de intron 9 ve 10'da, ve çocukluk ALL'de intron 11'de meydana gelmektedir (yetişkin ve pediatrik hastalarda ekson 9 ve 10'un, çocukluk çağında ekson 7'ye füzyon genlerin karışmasına yol açarak). AF4'ün breakpoint cluster bölgesi geniştir, 40 kb'lık bir bölgeye yayılmaktadır. MLL-AF4 füzyon genlerinin en sık görülen füzyon noktası ekson 4'dür; nadir durumlarda ekson 5, 6 ve 7 MLL genine füzyon olmaktadır (57).

Birçok çalışma grupları tarafından, MLL-AF4 geni çocukluk lösemide 'karşı prognostik faktör' olarak tanımlanmıştır (57). 1 yaş altındaki ALL'lerde ise görülme sıklığı %60-80 arasında değişmektedir. 11q23 anomalisine sahip, çocukluk çağı ALL olgularında; organomegali, yüksek lökosit sayısı görülmektedir. Yeni doğanlarda görülen 11q23 anomalileri kötü prognoz ile karakterizedir (46)

Klonal özellik taşıyan kromozom sayı ya da yapı düzensizliklerin tespit edilmesi; hastalığın biyolojisinin anlaşılması ve bu düzensizliklerin "lökomogenez"deki rollerinin aydınlatılması bakımından oldukça önemlidir. Özellikle, translokasyonlar sonucu oluşan füzyon genlerinin sentezlediği yeni protein ürünlerinin hastalığın seyrine etkisinin bilinmesinin; yeni tedavi prensiplerinin stratejisi bakımından yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu spesifik kromozom yeniden düzenlenmelerinin hastalığın tanısı anında ve tedavisi sonrasında kalitatif ve kantitatif olarak saptanması hastalığın takibi, terapötik ilaca verilen yanıtın değerlendirilmesi ve minimal residüel hastalık tespiti bakımından da büyük değer taşımaktadır (36, 47).

### **c) t(12;21)(p13;q22) translokasyonu (TEL-AML1 füzyon geni)**

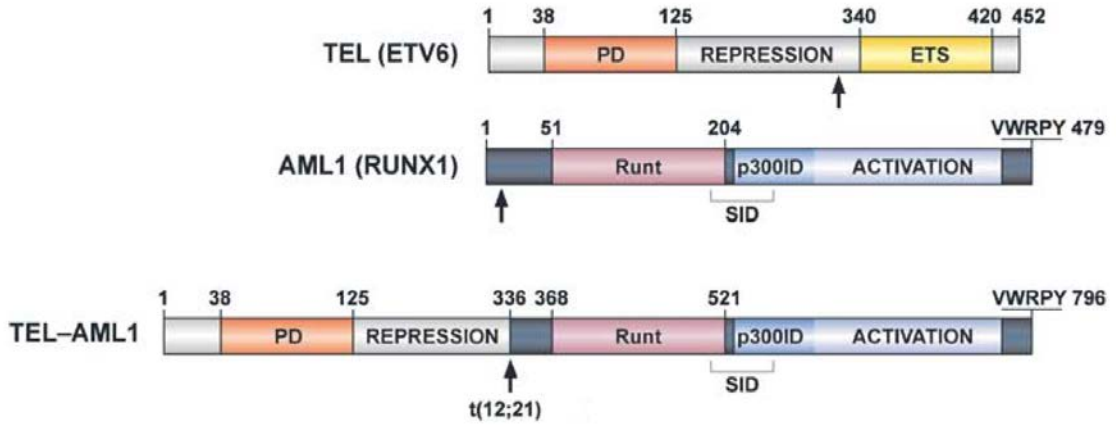
Yeni tanı konmuş çocukluk dönemi pre-B ALL'de yaklaşık %17-25 oranında görülen bu translokasyon, 12p13'te bulunan TEL geni ile 21q22'te bulunan AML1

geni birleşip, TEL/AML1 füzyon geni sonucu oluşmaktadır. Translocation ETS Leukemia geninin 5. eksonu ile AML1 geninin 2. ya da 3. eksonu birleşmektedir (58, 59, 60).

t(12;21)(p13;q22) sonucunda, TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) füzyon geni oluşmaktadır. Bu füzyon gen 1995 yılında Romana ve Gloub tarafından tanımlanmıştır (61, 62). TEL geni çok geniştir ve 8 eksondan oluşmaktadır, fakat kırılma noktası ekson 5 ve 6 arasındaki 15kb'lik bölgededir. İntron 4'de kırılma noktası olan sadece iki durum tanımlanmıştır. Bu translokasyonun görüldüğü hastalarda, prognoz iyidir.

t(12;21) yetişkin ALL'lerde, çok daha az oranda görülmektedir. Çocukluk çağı AML'de ise görülmemektedir (34). Önceleri, bu translokasyonun klasik sitogenetik yöntemlerle çok zor saptanmasından dolayı, nadir olarak ortaya çıkan genetik bir anomali olduğu düşünülmekteydi. Moleküler biyolojik tekniklerin gelişimi ile birlikte; Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile, bu translokasyonun kolaylıkla saptanması mümkün olmuştur. Bunun sonucunda, çocukluk çağı ALL'de en sık ortaya çıkan yapısal kromozomal anomali olduğu gözlenmiştir (63, 64, 65).

AML1 geninin, genomik organizasyonu halen tamamen çözülememiştir. Kırılma noktası ya çok geniş intron 1'de (en sık olan) veya intron 2'de meydana gelmektedir. Çoğu durumda, TEL-AML1 füzyon transkriptinde; TEL'in ekson 5 ile AML1'in 2. eksonuyla olan birleşimi gözlenmektedir. Alternatif splicing; çoğu transkriptlerde AML1'in 2. eksonunun atlanmasına yol açmaktadır, bu durum aynı hastada iki farklı PCR sonucuna neden olmaktadır. Ayrıca daha az sıklıkla TEL'in ekson 5 ile AML1'in 3. eksonuyla karşılaşmasına neden olan kırılma noktası, AML1'in 2. intronunda meydana gelmektedir. Bu nedenle, farklı iki füzyon protein aynı yapıya sahiptir (Şekil 2.12.)(57).



**Şekil 2.12.** ALL’de t(12;21)(p13;q22) translokasyonu sonucu görülen TEL-AML1 füzyon geni (70)

(RUNT DBD (RUNT) mSin3A interaksiyon alan, P300 HAT ile birbirlerini etkilediğini haber veren alan ve AML1’deki transkripsiyonel aktivasyonu, Kopresörlere bağlı groucho’yu bağlayan karboksi terminal VWRPY motifi, oligomerizasyon pointed alan PD gibi TEL proteindeki farklı fonksiyonel alanlar, merkezi represyon alanı ve ETS DBD gösterilmiştir. Oklar t(12;21)’den meydana gelen TEL ve AML1 arasındaki füzyon noktalarını göstermektedir. Anahtar fonksiyonel alanların sınırlarını çizen aminoasitler ilk methionine uygun gelen 1 sayısı ile numaralandırılmıştır).

**Çizelge 2.8.** TEL gen ve proteininin karakteristik özellikleri (66)

TEL GENİ	
<b>DNA/RNA</b>	
<b>Lokalizasyon</b>	- Kromozom 12p13
<b>Familya</b>	- Transkripsiyon fakörlerin ets ( E-26 belirli dönüşüm) familyasının üyesidir.
<b>Ekson sayısı</b>	- 8 eksondan meydana gelir.
<b>Transkripsiyon</b>	- 3 farklı transkripti vardır: 2400 kb, 4300 kb ve 6200 kb; 1356 kb cDNA kodlanır.
<b>PROTEİN</b>	
<b>Tanımlama</b>	- 250, 453 amino asitler ve diğer formlar; CBFβ ile heterodimerleri şekillendirir.
<b>Ekspresyon</b>	- Ekpresyon dizileri ve Northern analizleri, kemik iliği, dalak ve timusdaki önemli ekspresyonla birlikte her bölgede ekspresyonu görülür.
<b>Lokalizasyon</b>	- İmmunofloresans, nükleer lokalizasyon olduğunu gösterir.
<b>Fonksiyon</b>	- Transkripsiyonel düzenleyici gibi hareket etmektedir; vitellin angiogenesisinde ve kemik iliği hematopoezisi için önemlidir.

**Çizelge 2.9.** AML1 gen ve proteinin karakteristik özellikleri (67).

<b>AML1 GENİ</b>	
<b>DNA/RNA</b>	
<b>Diğer isimleri</b>	- AML1(akut miyeloid lösemi 1) - dCBFA2(core binding factor A2) - PEBPaB (polyomavirus enhancer binding protein aB)
<b>Lokalizasyon</b>	- Kromozom 21q22.3
<b>Tanım</b>	- 120 kb'lık bir alandan daha fazlasına yayılan gen
<b>PROTEİN</b>	
<b>Ekspresyonu</b>	- 250, 453 amino asitler ve diğer formlar; CFBF ile heterodimerleri şekillendirir.
<b>Lokalizasyon</b>	- Nükleer
<b>Fonksiyon</b>	- Hematopoietik belirli genler için transkripsiyon faktörü (aktivatör)

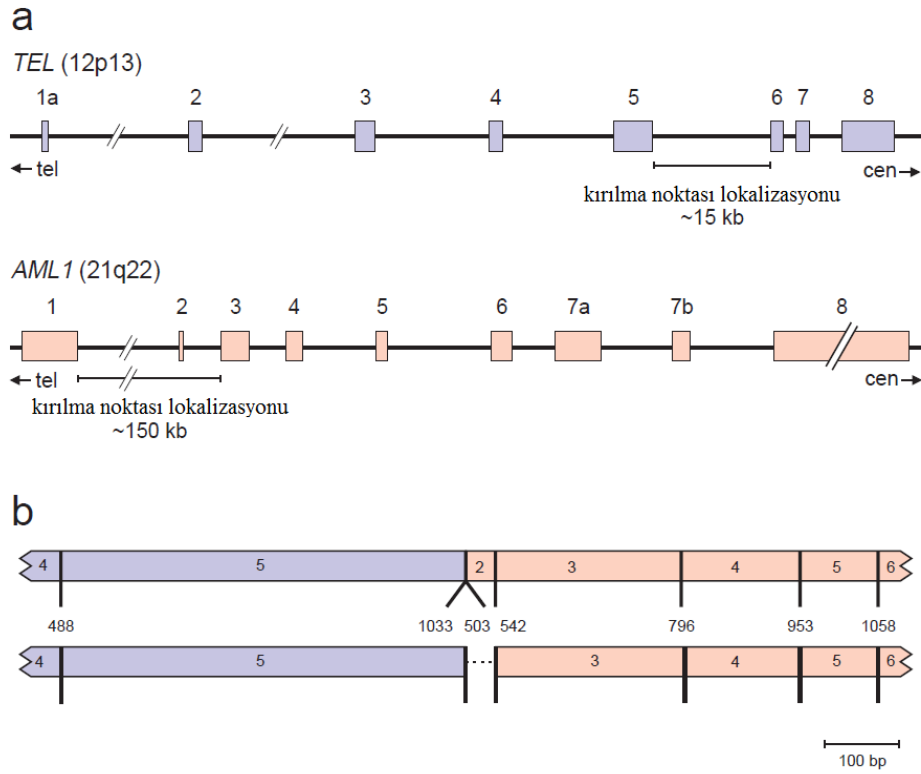
TEL-AML1 füzyon geni TEL proteininin fonksiyon kaybı veya AML1'in hedef genlerinin kontrolünün bozulmasıyla, ALL oluşumuna yol açmaktadır (59).

Çocukluk dönemi ALL hastalarında prognozun gelişmesinde bu translokasyonun sıklığının belirlenmesinin önemli yeri vardır (68, 69).

TEL-AML1, kimerik protein ile ilişkilendirilmiş, lösemi ETS DBD (DNA Binding Domain)'den amino terminale kadar olan (RUNT DBD'yi de içeren) TEL dizilerine ve AML1'in tüm bilinen fonksiyonlarına dayanmaktadır (Şekil 2.12).

Bu durumda, TEL-AML1; diğer AML1 füzyon proteinlerden, AML1'in C terminal düzenleyici dizilerini içermeyip, sadece amino terminal RUNT alanını bulundurması yönüyle farklıdır. TEL ve AML1'deki genomik kırılma noktaları TEL'in 12 kb'lık intron 5 ve AML1'deki yaklaşık 100 kb'lık intron 1 boyunca dağınık bulunmaktadır.

Sentromer ve telomer eğilimi, ekson numaralandırması ve uygun kırılma noktaları da gösterilmiştir. Çoğu t(12;21) pozitif hastalar, AML1 intron 1'deki kırılma noktası sebebiyle geniş transkriptlere sahiptirler fakat alternatif splicing sırasında, AML1 ekson1'in atlanmasına neden olmaktadır. Bazı hastalarda moleküler düzeyde iki PCR ürününe yol açar. Çünkü AML1 kırılma noktası, intron 2 içerisine yerleşmiştir ve AML1 ekson 2 olmadan olan kısa transkripsiyon ürününe neden olur. Ok işaretleri beş primerin pozisyonlarını göstermektedir; numaralar her primerin 5' nükleotid pozisyonundan söz etmektedir (70)(Şekil 2.13.).



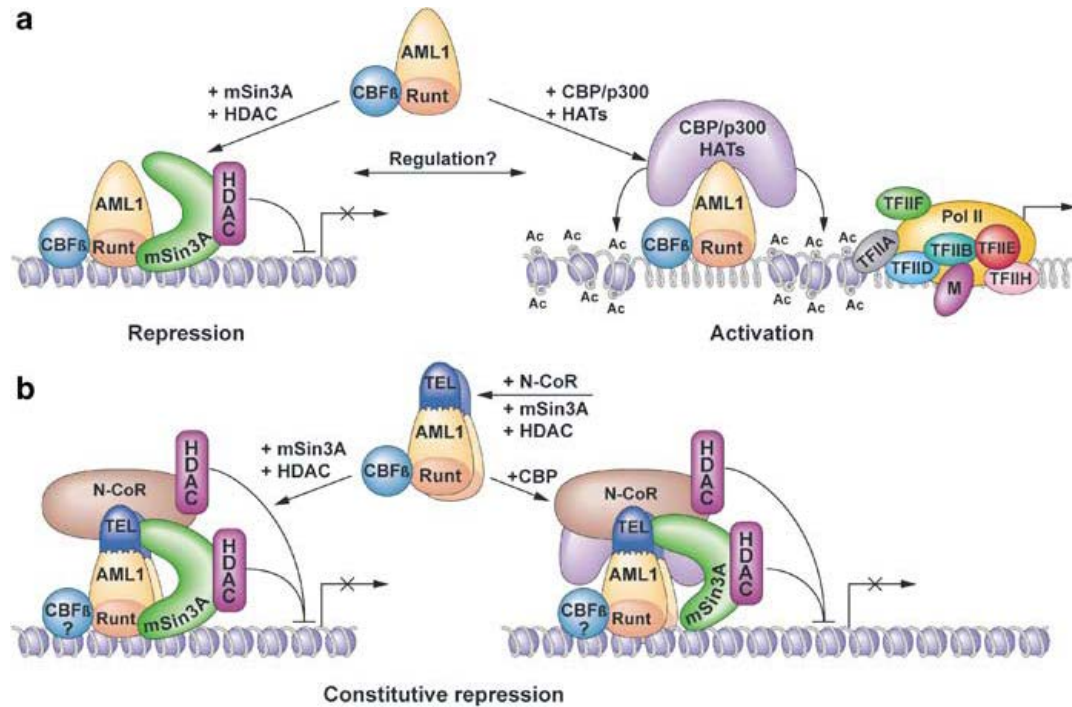
**Şekil 2.13.** (a) t(12;21)(p13;q22) içerisinde bulunan TEL ve AML1 genin intron / ekson yapısının şematik diyagramı. (b) TEL-AML1 füzyon transkriptlerinin şematik diyagramı. (57)

### TEL-AML Aktivitesinin Moleküler Mekanizması

Transkripsiyon faktörleri bazı DNA bağlayıcı komplekslerin yapısını değiştirebilir ve komşu promotorları ya aktive eder yada bastırır. Genin eksprese olması veya olmaması histonların değişikliklerinin yapısında kapladığı geniş bir bölgeye bağlıdır. AML1, genin ekspresyonu için gerekli olan DNA bağlanmasında transkripsiyonal aktivatör olarak işlev görür.

AML1 bir faktördür ve bu faktörün transkripsiyonunun aktifleştirme ve baskılama yetenekleri p300 ve mSin3A/HDAC2'nin etkileşimine bağlıdır. Bu yetenekler bazı kötü tanımlanmış yöntemlerle düzenlenmiştir (örneğin fosforilasyon). AML1'in onun hedef genlerine bağlanması, düzenleyici altünite CBFβ (core binding factor β) ile birlikteliğinde olabildiğini göstermiştir. mSin3A ile ilişkilendirildiğinde, AML1 HDAC ile dolaylı olarak etkileşime girmesi, transkripsiyonu baskılar. Histonun amino ucuna yerleşmiş, lizin rezidülerinden asetil gruplarını çıkarır. Böylece kromatinin

baskılanması sağlanır ve promotörü transkripsiyonel açıdan önemli derecede azaltılmaktadır. AML1'in mSin3A2'dan ayrılmasıyla ve p300 HAT'la birleşmesiyle transkripsiyonel süreç tersine çevirilmektedir. AML1'in ya mSin3A ile ya da p300 HAT ile olan birlikteliği, bilinen AML1 hedef genin düzenleyici bölgesinin durumuna bağlıdır. Bu model AML1'in Groucho/TLE gibi diğer korepresörler yardımıyla transkripsiyonu baskılama olasılığını engelleyememektedir. Şekil 2.14 (b) TEL-AML1'in durumunda, TEL kısmını dimerize etme ve N-COR ve mSin3A korepresörlerini bağlama yetenekleri sabit represör kompleksin oluşumunu sağlamaktadırlar ve (a)'da gösterilen yapıya karşı kimerik proteinini dirençli hale getirmektedirler. Bu nedenle, AML1 hedef dizilerini bağlama yeteneklerini koruyan TEL-AML1 füzyon proteinin yapısal HDAC gibi işlev görme potansiyeli vardır (yapısal HDAC AML1 hedef genin deregülasyonuna neden olan represöre bağlıdır). P300'ün TEL-AML1'in AML1 kısmı ile birleşme yeteneğine sahip olabilmesine rağmen, muhtemelen füzyon proteinin konteksinde onun HAT aktivitesi doğru şekilde işleyemez. TEL oligomerizasyon/dimerizasyon PD sebebiyle, TEL-AML1 füzyon proteinin homodimer veya oligomer gibi AML1 hedef dizilerine bağlanmaktadır. TEL-AML1 oligomerlerin veya dimerlerin DNA bağlayıcısından AML1 bağlayıcı sitelerine kadar olan CBF $\beta$ 'nin fonksiyonel gereksinimleri belli değildir.



Şekil 2.14. TEL-AML1 geninin aksiyonunun moleküler mekanizması (70)

PD, mSin3A ve merkezi represyon alanla birbirlerini etkileyebilir, PD ve ETS DBD arasında saptanmış N-CoR ve HDACs ile etkileşim edildiği görülmüştür. Büyük olasılıkla, TEL'in oligomerizasyonu TEL PD değiştirilmesi gibi represör-korepresör komplekslerin değişmez oluşumunu sağlar. Füzyon proteinin AML1 kısmı yoluyla TEL dizilerinin koreseptör HDACC toplama kazancına ek olarak fonksiyonel sonuçlar vardır. Örnek; amino terminal TEL yoluyla AML1 RUNT DBD'nin oligomerizasyonu veya dimerizasyonu ilk olarak birden fazla AML1 binding bölgelerine yüksek derecede benzerlik bağlanmasını daha sonra da monomerik RUNT alanını sağlar, böylece wild-tip AML1'in aksiyonuna zıtlık yaratmaktadır. Birden çok AML1 bağlayıcı bölgeler için olan yüksek benzerlik AML1 ETO'yu kanıtlamıştır. Bu nitelik AML1-ETO AML1'in haematopoietik gelişimdeki fonksiyonundaki negatif etkilerin gözlemlerini açıklamaktadır (70).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Gruplarının Toplanması

Araştırmamıza, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran 20 yetişkin KML ön tanılı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran 10 çocukluk çağı ALL ön tanılı ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı'na başvuran 5 çocukluk çağı ALL ön tanısı konmuş toplam 35 hasta birey dahil edildi.

Çalışmamızda hasta grubu oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan (26.03.2009 tarih ve 2009/37 sayılı karar) onay alınmıştır.

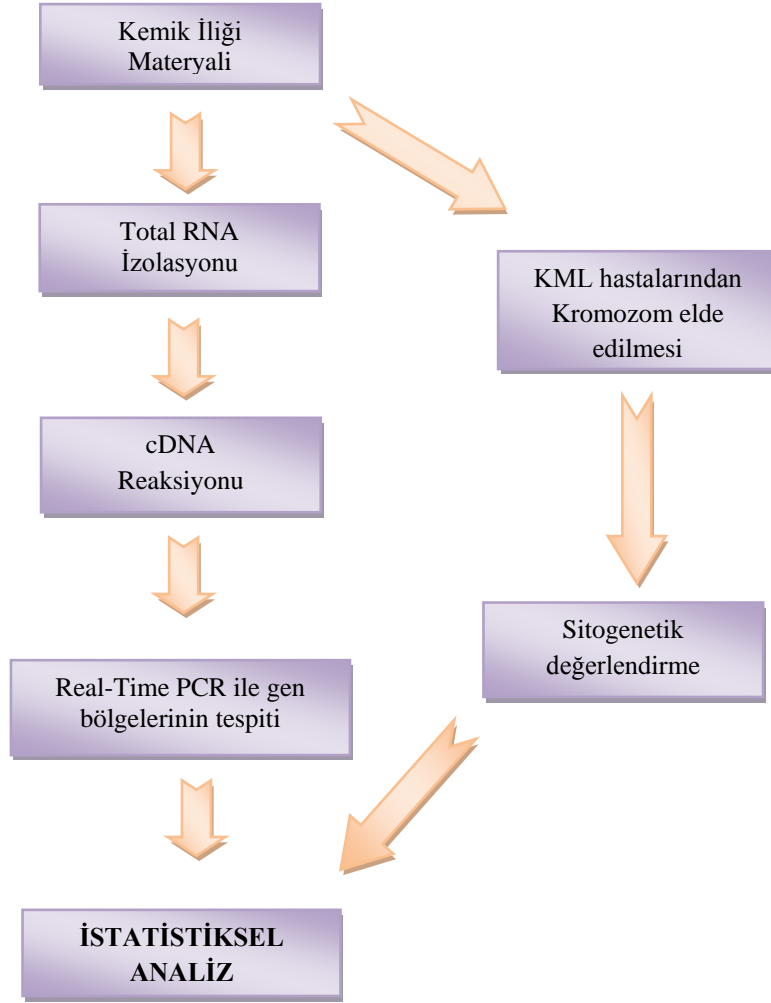
ALL ve KML ön tanısı konmuş ve tedavi süreci başlamamış hasta bireylerden, 2ml %2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere 1,5-2 ml kemik iliği örnekleri alındı. Alınan kemik iliği örneklerinden, örneklerin yoğunluk ve miktarına göre Single step acid/GITC (GuanidiniumIsoThioCyanate) yöntemiyle veya RNA izolasyon kiti (Roche-1828 665) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Elde edilen RNA'lar "Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR)" yöntemi ile cDNA'ya çevrildi ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

TEL-AML1, MLL-AF4, p19<sup>BCR-ABL</sup>, p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon genlerine ait gen bölgeleri (TEL için U11732, AML1 için D43969, MLL için L04284, AF4 için L13773, BCR için X02596 ve ABL için X16416) ve internal kontrol gen Beta-2-microglobulin (B2M) bölgesi (B2M için, BC032589) için oluşturulan primer ve probler kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction) ile amplifiye edildi. Ayrıca yetişkin KML ön tanılı hastalar sitogenetik yöntemle philadelphia kromozomu açısından değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda uygulanan yöntemlerin genel akış şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.





Şekil 3.1. Uygulanan Yöntemlerin Genel Akış Şeması

### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

#### 3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- ◆ Real Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- ◆ Termal Cycler (Techne Flexigene, Cambridge, UK)
- ◆ Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- ◆ Etüv (Nüve EN-500)
- ◆ Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- ◆ Vorteks (VELP)

- ◆ Hassas Terazı (AND)
- ◆ Mikropıpet Setı (Eppendorf)
- ◆ Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- ◆ Mikrodalga Fırın (Alaska)
- ◆ Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- ◆ Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)

### 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ☞ RNA izolasyon kiti (Roche-1828 665)
- ☞ Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- ☞ Fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) (Amresco K169)
- ☞ Kloroform/izoamil alkol (24:1) (Amresco 0757)
- ☞  $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma M3148)
- ☞ Dietilpirokarbonat (DEPC) (Serva 18835)
- ☞ Gliserol (Merck 4091)
- ☞ İzopropanol (Sigma I9516)
- ☞ Guanidyum tiyosiyanat (Amresco 0380)
- ☞ 5xRevers transkriptaz tamponu
- ☞ 2 mM dNTP Mix (Fermentas, R0241)
- ☞ 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)
- ☞ Bidistile Su
- ☞ Primerler ve proplar
- ☞ 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems)
- ☞ Revers transkriptaz (M-MLV) (Fermentas EP0441)
- ☞ RNase inhibitör (Fermentas E00381)
- ☞ Sodyum laurilsarkozin (Amresco 0719)
- ☞ Sodyum sitrat (Sigma S-4641)
- ☞ Taq DNA Polimeraz (Fermentas, EP0402)
- ☞ Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)

### 3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

➤ ***Dietilpirokarbonat (DEPC) H<sub>2</sub>O***

1000 ml deiyonize su içine 2 damla DEPC konup iyice çalkalandı.

Bir gece oda ısısında bırakıldı.

60 °C'de 2 saat kapağı hafifçe gevşetilerek tutulur ve ardından otoklavlandı.

+ 4 °C'de saklanır. Bu ısıda 1 yıl stabildir.

➤ ***0.75 M Sodyum Sitrat***

Sodyum sitrat 5.5 H<sub>2</sub>O 15.78 g

DEPC H<sub>2</sub>O ile 100 ml' ye tamamlandı (pH 7.0)

Otoklavlayarak sterilize edildi.

Oda ısısında 6 ay stabildir.

➤ ***%10 Sarkozil***

Sarkozil 1 g

DEPC H<sub>2</sub>O 10 ml

Oda ısısında en az 3 ay stabildir.

➤ ***4M Guanidinyum Tiyosiyanat (GSCN)***

Guanidinyum tiyosiyanat 25 g (4M)

0,75 M sodyum sitrat 5 ml (75 mM)

% 10 Sarkozil 2,5 ml

DEPC HO<sub>2</sub> 50 ml'ye tamamlanır.

Bu karışım oda ısısında 3 ay stabildir.

➤ ***Denatürasyon Çözeltisi (Solusyon D)***

GSCN 4M çözeltisi 9,9 ml

2-merkapttoetanol (14 M) 0.1 ml

Bu karışım oda ısısında 1 ay stabildir.

### 3.3. Yöntemler:

#### 3.3.1. Sitogenetik Analiz:

KML öntanımlı hastaların sitogenetik analizi konvansiyonel direkt kromozom eldesi yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Hastalardan alınan heparinize kemik iliği örneklerinden 5 ml RPMI 1640 (Biologic Industries) kültür ortamı içerisine 5-6 damla damlatıldıktan sonra mitotik inhibitör olarak 50 µl Kolçisin (10µ g/ml) (Biologic Industries) eklenerek 1 saat 37°C de inkübe edildi. Santrifügasyon (2000 rpm, 10 dk.) sonrası elde edilen hücre peleti, hipotonik (0.075 M KCl) işlemlerini takiben 5 kez 3:1 metanol:asetik asit ile fiske edildi. Son santrifügasyon sonrası elde edilen hücre peleti lam üzerine damlatılarak metafaz plakları elde edildi. Metafazlar G Bantlama yöntemi ile bantlanarak, sitogenetik olarak philadelphia kromozomu açısından değerlendirildi.

#### 3.3.2. Moleküler Analiz:

##### 3.3.2.1. RNA izolasyonu:

(Roche High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak)

1. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 300 µl kemik iliği ve 400 µl lysis/binding buffer eklenerek 2 dakika maksimum (14.000 rpm) hızda santrifüj edildi.
2. Süpernatant'dan 400 µl başka bir tüpe alınarak üzerine 200 µl (0,5 vol.) absolü etanol eklenerek karışım 2-3 dakika karıştırıldı.
3. Mikrosantrifüj tüpündeki karışım toplama tüpü içerisindeki filtre tüpüne alındı (max. 700 µl).
4. 30 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü steril bir toplama tüpüne yerleştirildi.
5. 10 µl'lik oligotlar şeklinde -20 °C'de sakladığımız DNase I working solüsyonu oda ısısında çözüldü ve üzerine 90 µl DNase Incubation buffer eklendi.
6. 100 µl'lik DNase I working + DNase Incubation buffer karışımı filtre tüpüne bırakıldı ve 15 dakika oda ısısında inkübe edildi.

7. Filtre tüpündeki karışımın üzerine 500  l Wash Buffer I eklendi ve 15 saniye 8.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü steril bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Filtre tüpüne 500  l Wash Buffer II eklendi ve 15 saniye 8.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü steril bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Filtre tüpüne 300  l Wash Buffer II eklendi ve 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alttaki toplama tüpü atılarak filtre tüpü steril bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne yerleştirildi.
10. Filtre tüpüne 100  l Elution Buffer eklenerek 1 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edilerek RNA elde edildi.
11. Elde elden RNA -20  C'de muhafaza edildi.

#### **3.3.2.2. RNA izolasyonu (manuel)**

Single step acid/GITC (GuanidiniumIsoThioCyanate) yöntemi (75):

1. 2 ml'lik EDTA'lı tüpte buluna yaklaşık 1,5 ml kemik iliğinin tamamı, 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 10 ml'ye tamamlandı.
2. Karışım 2-3 dk hızlı olarak aşağı yukarı karıştırdı.
3. 10 dk. 2.000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.
4. Süpernatant atıldıktan sonra peletin üzerine soğuk steril distile su ilave edilerek yaklaşık 10 ml'ye tamamlandı.
5. 10 dk. 2.000 rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant atıldı.
6. Bu işlem yaklaşık 2-3 kez tekrarlandı.
7. Oluşan pelet 1.5 ml'lik steril epend rf tüplere alındı ve üzerine 500  l denatürasyon solüsyonu bırakıldı.
8. Birkaç saniye vortekslendikten sonra 15 dk. -20 C'de bekletildi.
9. 500  l fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ekleyip buz içinde 15 dk. daha bekletildi.
10. Tüpler 4 dk. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
11. Üst faz alınıp yeni bir 1.5 ml lik steril epend rf tüplere aktarıldı.

12. Yeni tüplere 500 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) ekleyip 2 dk. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Üst sıvı fazı yeni bir 1.5 ml lik steril ependörf tüpe aktarılıp, alınan bu üst faza 1 ml absolu etanol eklendi ve -20 °C'de bir gece bırakıldı.
14. Tüpler -20 °C'den alınıp 15 dk. 12.500 rpm'de santrifüj edildi.
15. Tüplerdeki etanol atılıp 500 µl %70'lik etanol eklendi ve birkaç saniye vortekslendikten sonra 5 dk. 12.500 rpm'de santrifüj edildi.
16. Tüplerin ağzı açık olarak en az 10 dk bekletilip pelet üzerine, 50 µl DEPC'li distile su eklendi.
17. RNA'nın çözülmesi için 70 °C'de 1 saat bekletildi.
18. Elde edilen RNA -20 °C'de saklandı.

### 3.3.2.3. Komplementer DNA (cDNA) Reaksiyonu

Revers Transkriptaz PCR yönteminde kalıp olarak kullanılan RNA, revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrildi.

#### cDNA reaksiyon karışımı (1 örnek için):

1. Distile Su	12 µl
2. 5xRevers transkriptaz tamponu	4µl
3. 2 mM dNTP Mix	10µl
4. Poly T primer*	1µl
5. Revers Transkriptaz (20U/µl)	1µl
6. RNase inhibitör (40U/µl)	0,5 µl
7. RNA	5 µl

---

Her bir örnek için son hacim 32-33 µl olacak şekilde hazırlandı.

- Poly T dizisi 5'-TTTTTTTTTTTTTTTA-3'

### RT-PCR şartları

37 °C’de 60 dk. }  
95 °C’de 5 dk. } 1 döngü

buz içerisinde 15 dk. bekletilerek cDNA elde edildi.

### 3.4. Real Time PCR ile Var-Yok Analizi

RNA’larından cDNA eldesi yapılan örneklerden, p210<sup>BCR/ABL</sup>, p190<sup>BCR/ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 gen bölgeleri Real Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems) cihazı ile Var-Yok analizi yapılarak belirlendi. Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak İnsan p210<sup>BCR/ABL</sup>, p190<sup>BCR/ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 gen bölgeleri dizisinden (BCR için X02596, ABL için X16416, TEL için U11732, AML1 için D43969, MLL için L04284 ve AF4 için L13773,) ve internal kontrol olarak Beta-2-microglobulin (B2M için BC032589) geni dizisinden yararlanılarak primer ve prob dizileri oluşturuldu. Primer ve proplar “Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland” tarafından sentezlendi.

#### 3.4.1. Kullanılan Primer ve Proplar

##### i. İnternal kontrol olarak kullanılan B2M genine özgü primer ve proplar;

ENF1302 5’-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3’

ENR1362 5’-AATCCAAATGCGGCATCT-3’

ENPr1342 5’-Yakima Yellow-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-TAMRA-3’

Not: B2M genine özgü prob “Yakima Yellow” işaretlidir. Değerlendirme sürecinde “VIC” olarak değerlendirilmesinin sebebi “Yakima Yellow” ile “VIC”ın benzer dalga boylarında ışımaya yapmasıdır (Yakima Yellow’la işaretlenen probun maksimum emisyon değeri 549 nm, VIC’le işaretlenen probun maksimum emisyon değeri 525 nm)(73, 74).

**ii. Pozitif kontrol olarak kullanılan Hücre Hatları**

K562 hücre hattı (Human erytroleukemia cell line) : p210<sup>BCR-ABL</sup> için,  
SD1 hücre hattı (Human lymphocytic leukemia cell line) : p190<sup>BCR-ABL</sup> için,  
REH hücre hattı (Human pre-B cell line) : TEL-AML1 için,  
MV4-11 hücre hattı (Human myelomonositic cell line) : MLL-AF4 için

**iii. BCR-ABL p210 füzyon geni mRNA'sına özgü primer ve probalar;**

ENF501 5'-TCCGCTGACCATCAATAAGGA-3'  
ENR561 5'-CACTCAGACCCTGAGGCTCAA-3'  
ENPr541 5'-FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-TAMRA-3'

**iv. BCR-ABL P190 füzyon geni mRNA'sına özgü primer;**

ENF402 5'-CTGGCCCAACGATGGCGA-3'  
ENR561 5'-CACTCAGACCCTGAGGCTCAA-3'  
ENPr541 5'-FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA-TAMRA-3'

**v. MLL-AF4 (Ekson 9) geni mRNA'sına özgü primer ve probalar;**

ENF207 5'-CCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAA-3'  
ENR262 5'-GAAAGGAAACTTGGATGGCTCA-3'  
ENPr242 5'-FAM-CATGGCCGCCTCCTTTGACAGC-TAMRA-3'

**vi. MLL-AF4 (Ekson 10) geni mRNA'sına özgü primer ve probalar**

ENF208 5'-GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT-3'  
ENR262 5'-GAAAGGAAACTTGGATGGCTCA-3'  
ENPr242 5'-FAM-CATGGCCGCCTCCTTTGACAGC-TAMRA-3'

**vii. TEL-AML füzyon geni mRNA'sına özgü primerler;**

ENF301 5'-CTCTGTCTCCCCGCCTGAA-3'  
ENR361 5'-CGGCTCGTGCTGGCAT-3'  
ENPr341 5'-FAM-TCCCAATGGGCATGGCGTGC-TAMRA-3'



### 3.4.2. Var-Yok Analiz Tayini

Primer ve probalar kullanılarak Real Time PCR yöntemiyle “Var-Yok” analizi ile yetişkin KML ön tanıli hastalarda p210<sup>BCR/ABL</sup> geni, çocukluk çağı ALL ön tanıli hastalarda p190<sup>BCR/ABL</sup>, TEL/AML1 ve MLL/AF4 genlerinin var olup olmadığı araştırıldı. İnternal kontrol geni olarak insan Beta 2 mikroglobulin (B2M) ve pozitif kontrol grubu ilgili geni üretebilen hücre hattı (K562, SD1, REH veya MV4-11) kullanıldı.

#### 3.4.2.1 Real-Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı

Real-Time PCR reaksiyon ortamı, total 25 µl olacak şekilde hazırlandı:

- 12.5 µl, 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems)
- Son konsantrasyon; ilgili gen bölgesinin primerlerinden 900 nmol olacak şekilde kullanıldı (p210<sup>BCR-ABL</sup> için ENF501, ENR561; p190<sup>BCR-ABL</sup> için ENF402, ENR561; MLL-AF4 (ekson 9) için ENF207, ENR262; MLL-AF4 (ekson 10) için ENF208, ENR262; TEL-AML1 için ENF301, ENR361 kodlu primerler). FAM ile işaretli ilgili genin probalarından (p210<sup>BCR-ABL</sup> için ENPr541; p190<sup>BCR-ABL</sup> için ENPr541; MLL-AF4 (ekson 9 ve ekson 10) için ENPr242; TEL-AML1 için ENPr341 kodlu probalar) ve Yakima Yellow ile işaretli B2M (ENPr1342) probundan 200 nmol olacak şekilde probalar kullanıldı.
- 7,5 µl cDNA örneği
- Son hacmi 25 µl'ye tamamlayacak miktarda distile su

#### 3.4.2.2 Real-Time PCR Reaksiyon Şartları

50°C'de	2 dakika ön inkübasyon	(1 döngü)
95°C'de	10 dakika aktivasyon	(1 döngü)
95°C'de	15 saniye denatürasyon	(50 döngü)
60°C'de	1 dakika bağlanma/uzama	(50 döngü)

Real Time PCR işlemi “Var-Yok analizi işlemi” “ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)” cihazı ve “7500 Software; SDS 2.0.3 software for 7500 Real Time PCR Product (Applied Biosystems)” programı kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Real-Time PCR ile yetişkin KML hastalarında p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni, çocukluk çağı ALL hastalarında p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1, MLL-AF4 “Var-Yok” analizi yapılarak füzyon genler araştırıldı ve elde edilen sonuçlar; literatürlerdeki karşılaşılmış füzyon gen oranları ile kıyaslanması amacıyla one-sample independent T testinden yararlanıldı.

Tüm istatistik analizlerde Minitab 15 paket programı kullanılarak, analiz sonucunda yetişkin KML ön tanılı olgularda Ph kromozomu ve p210<sup>BCR-ABL</sup>  $p < 0,001$  olarak bulundu ve anlamlı fark olduğu tespit edildi. Aynı hastaların tanı takibi yapıldıktan sonra kesin tanısı KML konulmuş hastalar istatistiksel olarak analiz edildiğinde ise, Ph kromozomu açısından değerlendirildiğinde  $p = 0,468$  bulundu ve anlamlı fark olmadığı tespit edildi. p210<sup>BCR-ABL</sup> açısından değerlendirildiğinde  $p < 0,001$  değeri bulundu ve anlamlı derecede fark olduğu tespit edildi.

Çocukluk çağı ALL hastalarında; p190<sup>BCR-ABL</sup> gen varlığı analiz edildiğinde,  $p = 0,374$  olarak bulundu ve anlamlı olarak fark olmadığı tespit edildi. TEL-AML1 geni sonuçları için,  $p = 0,496$  ve MLL-AF4 geni sonuçları için,  $p = 0,053$  değerleri bulundu.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda yetişkin KML ön tanısı konulmuş hastalarda P210<sup>BCR-ABL</sup>, çocukluk çağı ALL ön tanısı konulmuş hastalarda p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 füzyon transkriptlerinin varlığı araştırıldı.

### 4.1. KML Ön Tanılı Hastalarda BCR-ABL p210 Füzyon Geni Bulguları

Tez çalışmasına dâhil edilen yetişkin KML ön tanısı konulmuş 20 hastanın kemik iliklerinden elde edilen total RNA, cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA örnekleri, BCR-ABL genine özgü primer ve proplar kullanılarak Real Time- PCR yöntemi ile B2M geninin ve söz konusu p210<sup>BCR-ABL</sup> kimerik geninin var olup olmadığının saptanmasında kullanıldı. Toplam 20 hastanın 4 tanesinde ( 5, 10, 17 ve 23 nolu hastalarda) kimerik p210<sup>BCR-ABL</sup> geni tespit edildi. Pozitif kontrol grubu olarak K562 hücre hattı kullanıldı. Real-Time PCR cihazı ile her bir gen için elde edilen PCR amplifikasyon eğrileri ile her bir örneğin ekspresyon var olup olmadığı değerlendirildi. (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Örnekler sitogenetik yöntemle Ph kromozomu açısından da değerlendirildi ve 20 KML ön tanılı hastadan 10 tanesinde Ph kromozomu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Aynı zamanda, 20 KML ön tanılı hastanın tanı takibine alınıp değerlendirildiğinde, ek klinik bulgularla 10 tanesinin kesin tanısı KML olarak belirlendi (Çizelge 4.2). Belirlenen 10 KML hastası Ph kromozomu ve p210<sup>BCR-ABL</sup> geni açısından da istatistiksel olarak yorumlandı.

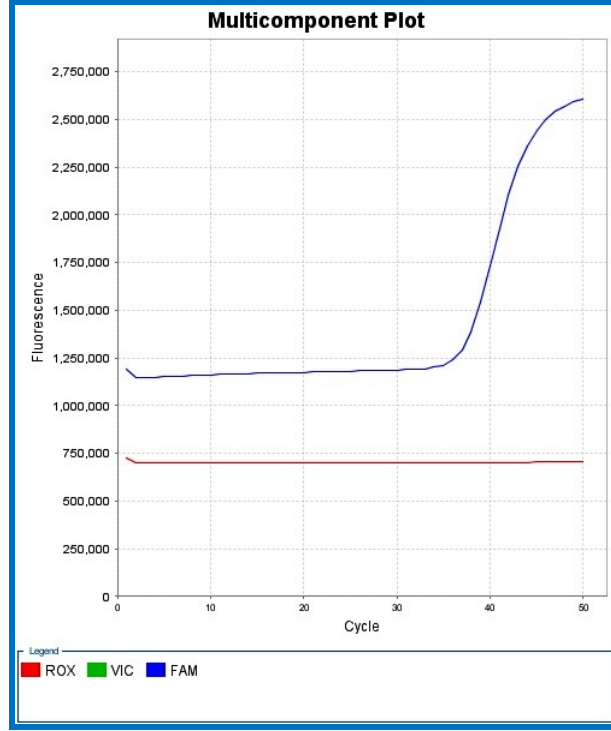
Elde edilen veriler MiniTab 15 programına aktarılarak istatistiksel analiz yapıldı.

**Çizelge 4.1.** Yetişkin KML ön tanıli hastalarda p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni ve Ph(+) tayini

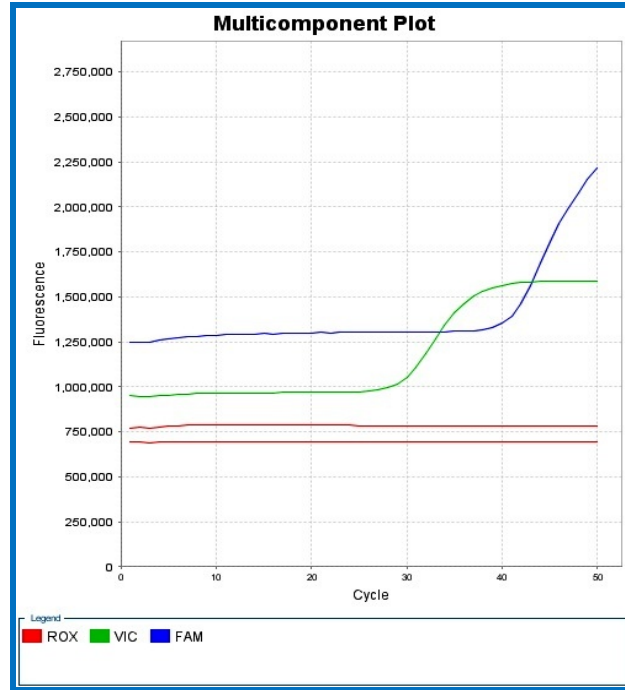
HASTA NO	B2M internal kontrol	P210 <sup>BCR-ABL</sup>	Ph Kromozomu (+)
<b>K562</b> Hücre Hattı (pozitif kontrol)	+	+	+
KML-1	+	Yok	Yok
KML-2	+	Yok	+
KML-3	+	Yok	+
KML-4	+	Yok	+
KML-5	+	+	+
KML-6	+	Yok	Yok
KML-7	+	Yok	Yok
KML-8	+	Yok	Yok
KML-9	+	Yok	Yok
KML-10	+	+	+
KML-11	+	Yok	Yok
KML-13	+	Yok	Yok
KML-14	+	Yok	Yok
KML-17	+	+	+
KML-18	+	Yok	+
KML-19	+	Yok	+
KML-20	+	Yok	+
KML-21	+	Yok	Yok
KML-22	+	Yok	Yok
KML-23	+	+	+

**Çizelge 4.2.** Ek klinik bulgularla kesin tanısı KML konulmuş hastalar

HASTA NO	KML ÖN TANILI HASTALAR	KESİN TANISI KML HASTALAR
KML-1	+	-
KML-2	+	+
KML-3	+	+
KML-4	+	+
KML-5	+	+
KML-6	+	-
KML-7	+	-
KML-8	+	-
KML-9	+	-
KML-10	+	+
KML-11	+	-
KML-13	+	-
KML-14	+	-
KML-17	+	+
KML-18	+	+
KML-19	+	+
KML-20	+	+
KML-21	+	-
KML-22	+	-
KML-23	+	+



Şekil 4.1. KML-23 numaralı hastanın p210<sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.2. KML-10 numaralı hastanın p210<sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probu ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.

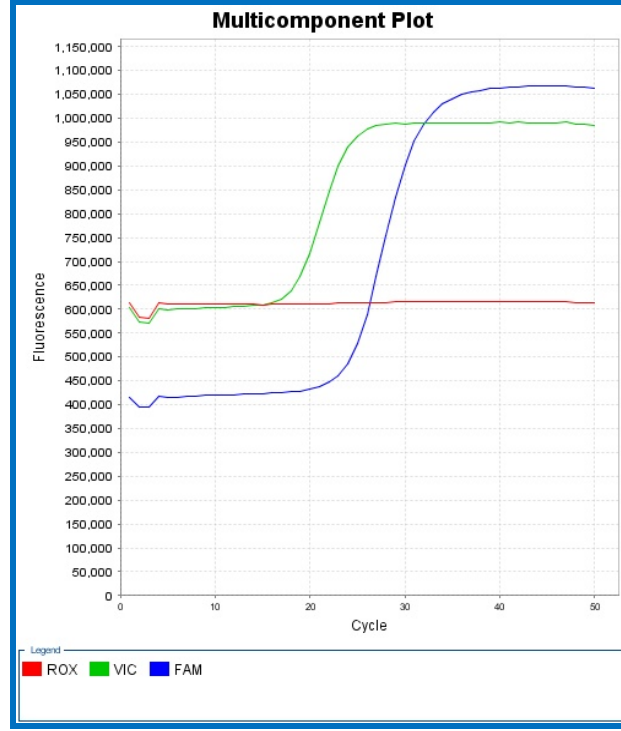
## 4.2. ALL Ön Tanılı Hastalarda BCR-ABL p190, MLL-AF4 ve TEL-AML1 Füzyon Geni Bulguları

Çocukluk çağı ALL ön tanısı konulmuş 15 hastanın cDNA'sı genlerin kendilerine özgü primer ve problemlerle çalışılmaları sonucunda p190<sup>BCR-ABL</sup>, MLL-AF4 ve TEL-AML1 füzyon gen transkriptlerine rastlanılmadı.

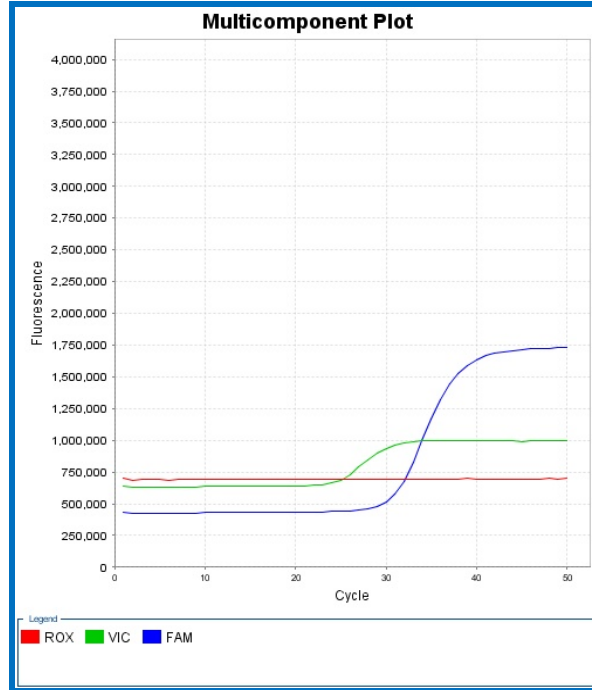
**Çizelge 4.3.** Çocukluk çağı ALL ön tanılı hastalarda p190<sup>BCR-ABL</sup>, MLL-AF4 ve TEL-AML1 füzyon genleri tayini

HASTA NO	B2M İnternal Kontrol	P190 <sup>BCR-ABL</sup> Füzyon Geni	TEL-AML1 Füzyon Geni	MLL-AF4 Füzyon Geni
SD1 Hücre Hattı	+	+	*	*
REH Hücre Hattı	+	*	+	*
MV 4-11 Hücre Hattı	+	*	*	+
ALL-1	+	Yok	Yok	Yok
ALL-2	+	Yok	Yok	Yok
ALL-3	+	Yok	Yok	Yok
ALL-4	+	Yok	Yok	Yok
ALL-6	+	Yok	Yok	Yok
ALL-7	+	Yok	Yok	Yok
ALL-9	+	Yok	Yok	Yok
ALL-10	+	Yok	Yok	Yok
ALL-12	+	Yok	Yok	Yok
ALL-13	+	Yok	Yok	Yok
ALL-14	+	Yok	Yok	Yok
ALL-15	+	Yok	Yok	Yok
ALL-16	+	Yok	Yok	Yok
ALL-17	+	Yok	Yok	Yok
ALL-18	+	Yok	Yok	Yok

\* kimerik gen ürününün saptanmasında ilgili hücre hatları kullanılmamıştır.



Şekil 4.3. SD1 hücre hattına ait p190<sup>BCR-ABL</sup> genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.4. REH hücre hattına ait TEL-AML genine ait, FAM'la işaretlenmiş probun ve B2M genine ait, YAKIMA YELLOW ile işaretlenmiş probun Real Time PCR amplifikasyon eğrisi.



## 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada yetişkin KML ön tanısı konmuş hastalardan alınan kemik iliklerinde p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni, çocukluk çağı ALL ön tanısı konulmuş hastalardan alınan kemik iliklerinde p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 füzyon genlerinin varlığı araştırıldı.

Nowell ve Hungerford; KML hastalarının kemik iliği örneklerinde benzer şekilde tekrarlayan, alışılmışın dışında küçük G grubundan bir kromozom tanımladılar (1960). Keşfettikleri şehrin adına ithaf ederek “philadelphia” adını verdiler. 1970’li yıllarda bantlama tekniklerinin gelişmesi ile birlikte KML hastalarında düzenli olarak gözlenen bu kromozom 9 ve 22 nolu kromozomlar arasında gerçekleşen bir translokasyon sonucu ortaya çıktığı ve neoplazmik durumla ilintili olduğu tanımlandı.

1991 yılında ISCN’ye göre ( An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) “Ph” kısaltmasıyla modern sitogenetik literatüründeki yerini aldı (5).

Ancak sitogenetik teknikle; kültür süresinin uzun olması; metafaz kalitesinin standart olmaması, analiz edilen metafaz sayısının çoğu zaman yetersiz olması gibi bazı dezavantajları sahiptir. Bu nedenle, tanı ve takip aşamasında daha hızlı ve daha spesifik yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Moleküler biyolojik teknikleri gelişimi tanıyı daha kısa sürede ulaşma ve özellikle de takip aşamasındaki hastaların, tedaviye yanıtını değerlendirmede büyük avantaj sağlamaktadır.

Günümüzde Ph kromozomu, kronik myeloblastik lösemilerde t(9;22) %90-95 oranında görülmekte ve sık olarak p210 BCR-ABL olarak ifade edilen füzyon proteini oluşmaktadır (6, 21).

Brian D. LICHTY ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (16), 67 KML hastasında RT-PCR ile FISH teknikleri kullanılarak p210<sup>BCR-ABL</sup> ve p190<sup>BCR-ABL</sup> füzyon genleri araştırılmış 67 hastanın 35’inde (% 52) BCR-ABL transkripti tespit edilmiştir. 67 hastanın 32 (% 48) p210<sup>BCR-ABL</sup> pozitif olarak tespit etmişler ve literatürlere uyumsuzluk gösteren bu durumu BCR-ABL geninin alternatif splincingleri ile ilişkilendirmişlerdir.

Beyhan DURAK ve arkadaşlarının (76) çalışmasında; yeni tanı konmuş ve *glivec* tedavisi görmekte olan toplam 50 hasta üzerinde, klasik sitogenetikle sonuç alınan 25 hastanın 17 tanesinde (%68) Ph (+) kromozomu tespit edilirken Real Time

PCR ile 50 hastanın tamamında sonuç alınmış ve BCR-ABL füzyon geni %58 oranında tespit edilmiştir. Ph pozitif, BCR-ABL negatif sonuçların; teknik hata veya BCR-ABL translokasyonunun nadir formlarına bağlı olabileceğini açıklamışlardır.

R. M. ARANA-TREJO ve E. Ruiz SANCHEZ ve arkadaşlarının (77) 2002 yılında yayınlamış oldukları makaledeki çalışmalarında 250 meksika kökenli KML hastasında p210<sup>BCR-ABL</sup>, p190<sup>BCR-ABL</sup>, p230<sup>BCR-ABL</sup> füzyon genleri RT-PCR yöntemi ile araştırılmış ve 250 hastanın 226'sında (% 90,4 oranında) p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni tespit edilmiş kalan 24 hastada ise p210<sup>BCR-ABL</sup>, p190<sup>BCR-ABL</sup>, p230<sup>BCR-ABL</sup> genlerinin eksprese olduğu tespit etmişler.

Çalışmamıza dahil edilen yetişkin KML ön tanılı hastalar hem sitogenetik teknikle hem de Real-Time kullanılarak moleküler teknikle çalışılmış, sitogenetik olarak 20 hastanın 10 tanesinde Ph kromozomu tespit edilmiştir. Real-Time ile yapılan çalışma sonucu ise, 20 hastanın 4 tanesinde p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni tespit edildi ve literatürlerle karşılaştırıldığında sonuçlar uyumsuzluk göstermiştir. Sonuçların uyumsuzluk göstermesinden dolayı hastaların kesin tanı sonuçları araştırılmış 20 KML ön tanılı hastanın 10 tanesinin KML hastası olduğu tespit edilmiştir. 10 KML hastasında tespit edilen Ph kromozomu ve p210<sup>BCR-ABL</sup> gen varlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 10 KML hastasının tamamında tespit edilen Ph kromozomu sonucu literatüre uygunluk göstermektedir. 10 KML hastandan 4 tanesinde tespit edilen p210<sup>BCR-ABL</sup> geni literatürlere uyumsuzluk göstermektedir. p210<sup>BCR-ABL</sup> sonucundaki uyumsuzluğun sebebinin hasta sayısının az olması ve BCR-ABL' in nadir formlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

KML tanılı hastaların tamamının sitogenetik olarak Ph kromozomu pozitif bulunması ve Real-Time PCR'la tespit edilen p210<sup>BCR-ABL</sup> geninin varlığının yüzdeler oranından fazla olması alternatif varyant türevlerinden kaynaklı olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Bu durumun daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi ve eksikliklerin nereden kaynaklandığına dair net bir sonuca ulaşılabilmesi için; hasta sayısının artırılması, BCR-ABL varyant füzyon genlerine ait primer ve probalar kullanılarak diğer füzyon genlerin tespit edilmesi ve hasta tanı takibinin yapılması gerekmektedir.

Bulgularımıza göre; Ph translokasyonunun belirlenmesinde klasik sitogenetik günümüzde halen altın standart yöntemdir. Alternatif bir moleküler sitogenetik yöntem olarak Real Time-PCR ise minimal rezidüel hastalığın değerlendirilmesini kolaylaştıran, sensitivitesi yüksek diğer bir alternatif moleküler yöntemdir. Translokasyonlar sonucu oluşan “füzyon” genlerden kodlanan füzyon proteinlerinin, hastalığın seyrine etkisinin bilinmesi yeni tedavi prensiplerinin stratejisi açısından yol gösterici olmaktadır. Hastalığın tanısında ve tedavisinde, bu spesifik füzyon gen ekspresyonlarının saptanması; hastalığın takibi, terapötik ilaca verilen yanıtın değerlendirilmesi ve minimal rezidüel hastalık takibi bakımından büyük değer taşımaktadır. Bu nedenle sitogenetik yöntemin destekleyerek moleküler analizinde yapılması durumunda sağlıklı bir sonuç verecektir.

Yapısal kromozomal anomaliler ALL’de sık olarak bulunmakta ve olguların yaklaşık %40’ında translokasyon tespit edilmektedir. Bu translokasyonların lösemi patogenezinde rol oynadığı ve bazılarının kötü prognozu olduğu bilinmektedir. Bu translokasyonlardan biri olan t(9;22)(q34;q11); çocukluk çağı ALL’de %5 oranında görülürken, yetişkin ALL’de bu oran %25’dir (34,35). Çocukluk çağı ALL’inde en sık (%17-25) görülen translokasyon t(12;21)(p13;q22) sonucu TEL-AML1 füzyon genidir ve iyi prognozla ilişkilidir (36). Bu translokasyonun klasik sitogenetik yöntemlerle çok zor saptanmasından dolayı FISH ve PCR gibi yöntemler ile bu translokasyonun saptanmasına olanak sağlamıştır. Çocukluk dönemi ALL’inde en sık ortaya çıkan yapısal kromozomal anomalidir (63, 64, 65)

Lösemilerde 11q23’de lokalize MLL geni birçok farklı kromozomlara transloke olmaktadır. Olguların yaşı arttıkça MLL geni translokasyonlarının görülme sıklığı azalmakta olup kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (68).

Spathas D.H. ve Stewart J. arkadaşlarının 31 çocukluk çağı B-linage ALL’li hastada FISH yöntemi kullanarak t(12;21) translokasyonu araştırılmaları sonucu 4 olguda TEL/AML1 geni tespit etmişlerdir (63).

Uğur ÖZBEK ve arkadaşlarının 219 çocukluk dönemi ALL’li olguda RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada ise TEL/AML1 füzyon transkripti %20.1 (44/219) oranında saptamışlardır (58).

Hee Yeon Woo ve arkadaşları (78), 1997-2002 yılları arasında Kore’de çocukluk ALL teşhisi konulmuş 65 hasta üzerinde çalışma yapmışlar. FISH ve sitogenetik (G-

bantlama) analizlerini kullanarak kemik iliklerinde BCR/ABL, MLL ve TEL/AML1 yeniden gen düzenlenmelerini araştırmışlar. TEL/AML1= %14,1, MLL=%11,3 ve BCR/ABL= %1,8 oranında görülmüstür.

Bu alışmada TEL/AML1 translokasyonu total ocukluk ALL'nin % 14,1 inde görülmüştür fakat bu oran Birleşmiş Milletlerde %12,3 Almanya'da ve İtalya'da %14 ve Fransa'da %15'dir. Kriterlerin, tekniklerin ve ierikliklerin farklı olmasına rağmen, bu çalışma ocukluk ALL'deki TEL-AML1 genin genetik yatkınlık coğrafyasal farklılığa yorumlamaktadır.

Abdul K. Siraj ve arkadaşlarının (79), yaptığı çalışmalarına dahil ettikleri 40 Suudi Arabistan kökenli ve 52 Hindistan kökenli ocuk ALL'lerde p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 füzyon genlerini araştırmışlar ve Suidi Arabistan kökenli 40 ocuk ALL vakasında 8 tanesinde (%20) TEL-AML1 füzyon geni tespit etmişler ama hiçbirinde p190<sup>BCR-ABL</sup> ve MLL-AF4 füzyon genine rastlamamışlardır. Hindistan kökenli 52 hastanın ise 2 tanesinde (% 3,8) TEL-AML1 füzyon geni, 4 tanesinde (% 7,6) p190<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni tespit etmelerine rağmen MLL-AF4 füzyon geni tespit etmemişlerdir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yetişkin KML hasta grubuna ait bireylerde sitogenetik olarak Ph kromozomunun varlığı ve Real-Time PCR ile p210<sup>bcr-ABL</sup> füzyon geni var olup olmadığı araştırılmaları sonucunda 20 yetişkin KML hastasından sitogenetik olarak yapılan çalışmada 10 hastada (%50) philadelphia kromozomuna rastlanıldı. Real-Time PCR çalışmaları sonucunda ise 20 hastanın 4'ünde (%20) p210<sup>BCR-ABL</sup> füzyon geni varlığı tespit edildi. Bu durum literatürdeki oranlarla uygunluk göstermemektedir ve istatistiksel olarak da anlamlı derecede fark (düşük) olduğu tespit edilmiştir (p<0,001).

Çalışılan hastalardan, KML kesin tanısı konulan 10 hastanın tamamında (%100) Ph kromozomu tespit edilmiştir (p=0,468). Kesin KML tanılı 10 hastadan 4'ünde (%40) p210<sup>BCR-ABL</sup> geni tespit edilmiştir (p<0,001). Tespit edilen Ph kromozomu literatüre uygunluk göstermektedir, tespit edilen p210<sup>BCR-ABL</sup> geni ise literatürlerle uygunluk göstermemektedir.

Çocukluk Çağı ALL hastalarında Real-Time PCR ile yapılan araştırmalar sonucunda p190<sup>BCR-ABL</sup>, TEL-AML1 ve MLL-AF4 füzyon genleri tespit edilmedi. p190<sup>BCR-ABL</sup> gen varlığı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde p=0,374 olarak bulundu ve literatürlerden anlamlı olarak fark olmadığı tespit edildi. TEL-AML1 geni sonuçları için p=0,496 ve MLL-AF4 geni sonuçları için p=0,053 değerleri bulundu. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde literatürlere uygunluk göstermelerine rağmen hasta sayısının artırılması durumunda daha sağlıklı sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada; tanı veya ön tanı için incelemenin uzun süre aldığı sitogenetik bantlamanın beraberinde Real-Time PCR yaparak, füzyon genlerin incelenmesi ve hastalara kısa sürede sonuç verilmesini sağlayacak olan Real-Time PCR yönteminin rutin incelemelerle uygulanabilmesi için ön çalışmaların yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; tanının kısa sürede konması, tanının desteklenmesi, tedavi protokollerinin belirlenmesi ve hastalığın prognozunun değerlendirilmesi mümkün olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Lanskowsky P. Leukemias. In: P. Lanzkowsky.** Manual of Peadiatric Hematol and Oncol 3rd ed. Churchill Livinstone, New York, **2000**;14: 359-411.
2. **Pui CH,** Acute lymphoblastic leukemia in children. Current Opinion in Oncology **2000**;12(1):3-12.
3. **Kabarowski JH, Witte ON.** Consequences of BCR-ABL Expression within the Hematopoietic Stem cell in Chronic Myeloid Leukemia. Stem Cells **2000**; 18:399-408.
4. **O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ.** Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. Annu Rev Med **2002**; 53: 369-81.
5. **Heim S, Mitelman F.**Cancer Cytogenetics, United States of America: Wiley-Liss Inc **1995**, 33-5 ve 180-2.
6. **Storlazzi CT, Anelli L, Surace C ve ark.** Molecular cytogenetic characterization of a complex rearrangement involving chromosomes 9 and 22 in a case of Ph-negative chronic myeloid leukemia. Cancer Genet Cytogenet **2002**;136:141-5.
7. **Schoch C, Schnittger S, Bursch S ve ark.** Comparision of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. Leukemia **2002**; 16: 53-59.
8. **Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F ve ark.** Interphase cytogenetics and competitive RTPCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukemia during interferon-alpha therapy. Br J Haematol **1998**; 101:552-557.
9. **Alberts B, Johnson A, Lewia J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Hücrenin moleküler biyolojisi 4. Baskı sayfa: 1283-1292.
10. **Dinçol G, PekçelenY, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, Beşışık S.** Klinik Hematoloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri; **2003**.
11. **Nelson Hamerschlak.** Leukemia: genetics and prognostic factors Jornal de Pediatria - Vol. 84, No. 4 (Suppl), **2008**.
12. **Fadrel S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM.** The biology of the chronic leukemias. N Eng J Med **1999**; 341:164-172.
13. **Talpaz M, Kantarjian HM, Mc Credie KB.** Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. Blood **1987**; 69:1280-8.
14. **Sawyers CL.** Chronic myeloid leukemia. N Eng J Med **1999**; 340:1330-1340.
15. **S. Heim, Felix Mitelman.** Cancer cytogenetics **1995**; 2. Baskı. Sayfa: 33-36.

16. **Brian D. Lichty, Armand Keating ve ark.** Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia *British Journal of Haematology*, **1998**, 103, 711–715.
17. **Ruibao REN.** Mechanisms Of Bcr–Abl In The Pathogenesis Of Chronic Myelogenous Leukaemia *Nature Reviews Cancer* **2005**;5, 172-183.
18. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BCR.html> (Erişim Tarihi: 25.09.2010).
19. **E. Laurent, M. Talpaz, H. Kantarjian ve Razelle Kurzrock.** BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis *CANCER RESEARCH* 61, 2343–2355, March 15, **2001**.
20. **Catherine M. Verfaillie MD.** Biology Of Chronic Myelogenous Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **1998**; 12:1-29.
21. **Specchia G, Mininni D, Guerrasio A, Palumbo G, Pastore D, Liso V.** Ph positive acute lymphoblastic leukemia in adults: molecular and clinical studies. *Leuk Lymphoma* **1995**; 18: Suppl 1:37-42.
22. **Johansson B, Fioretos T, Mitelman F.** Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Hematologica* **2002**; 107:76-94.
23. **Johansson B, Fioretos T, Mitelman F.** Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Hematologica* **2002**; 107:64-75.
24. **Michael W. N. Deininger, John M. Goldman ve Junia V. Melo.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia: *Blood* **2000**; 96: 3343-3356.
25. **Zhu, J. & Shore, S.K.** c-Abl tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **1996**; 16, 7054–7062.
26. **McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY.** A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* **1993**; 13:7587-95.
27. **Puil L, Liu J, Gish G.** Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* **1994**; 13:764-73.
28. **Charrin C.** Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A Collaborative Study of the Group Francais de Cytogenetique Hematologique *Blood* **1996**; 87: 3135-42
29. [http://www.thd.org.tr/doc/kurs\\_pdf/08\\_04\\_2006\\_ridvan\\_ali\\_08-45\\_09-10.pdf](http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/08_04_2006_ridvan_ali_08-45_09-10.pdf) (Erişim Tarihi: 10.10.2010)
30. **Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R.** Adult acute lymphoblastic leukemia. *Criticals in Oncology\Hematology.* **2004**; 50:223-261.
31. **Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z.** Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **1998**; 91(11):3995-4019.

32. **Sonbahar M, Topçugil F, Demir İ, Bal F, Bakan M.** Akut lösemilerde kromozom anomalileri ve prognoza etkisi. İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi. **2005**;43(2):79-85.
33. **33-Raimondi SC.** Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. **1993**;81(9):2237-2251.
34. **Ma SK, Wan TSK, Chan LC.** Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. Hematological Oncology. **1999**;17:91-105.
35. **Harrison CJ.** The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. **2001**;15:49-59.
36. **Yakut T, Gülten T.** Çocukluk dönemi lösemilerindeki genetik değişiklikler ve klinik önemi. Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi. **2005**; 31(1):57-62.
37. **Heerema NA, Arthur DC, Sather H, Albo V, Feusner J, Lange BJ ve ark.** Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia: Impact of the 11q23 breakpoint on outcome: a report of the Children's Cancer Group. Blood. **1994**;8:2274-2284.
38. **Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, Eden OB, Richards SM.** The French American British morphological classification of childhood lymphoblastic leukemia and its clinical importance. J.Clin Pathol. **1986**;39:998-1002.
39. **Cortes JE, Kantarjian HM.** Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. Cancer. **1995**; 76 (12): 2393-417.
40. **Yang Xie, M.P.H. Stella Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA.** Trends in Leukemia Incidence and Survival in the United States (1973–1998). Cancer. **2003**; 97: 2229-35.
41. **Brian J. Druker.** Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood. **2008** 112: 4808-4817.
42. **Chami I, Pérot C, Portnoi MF, Jouault H, Rieux C, Pautas C, Kuentz M ve ark.** Molecular analysis of an unusual rearrangement between chromosomes 4 and 11 in adult pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet and Cytogenet. **2002**;133:129-133.
43. **Uckun FM, Hatten KM, Crotty ML, Sensel MG, Sather HN, Ahlgren LT, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N.** Clinical Significance of MLL-AF4 Fusion Transcript Expression in the Absence of a Cytogenetically Detectable t(4;11)(q21;q23) Chromosomal Translocation. Blood **1998**;92(3):810-821
44. **Lijun Z, Parkhurst JB, Kern WF, Scott KV, Niccum D, Mulvihill JJ ve ark.** Chromosomal changes detected by fluorescence in situ hybridization in patients with acute lymphoblastic leukemias. Chinese Med J. **2003**;116(9):1298-1303
45. **Christine JH.** Acute lymphoblastic leukemia. Best Practise & Research Clinical Hematology. **2001**;14(3), 593-607.
46. **Harrison CJ.** The genetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. Best Practise&Research Clinical Hematology. **2000**;13(3):427-439.



47. **Felix CA, Lange BJ.** Leukemia in infants. *The Oncologist*. **1999**;4:225-240.
48. **Kubicka M, Soszynska K, Mucha B, Rafinska B, Kolodziej B, Haus O ve ark.** Unusual profiles of pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangement. *Leukemia&Lymphoma*. **2007**;48(10):2083-2086.
49. **Gamez JCG, Cervera J, Casado ZG, Duran AM, Valencia A, Barragan E ve ark.** MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet*. **2007**;174:127-131.
50. <http://atlasgeneticoncology.org/Genes/MLL.html>. (Erişim Tarihi: 16.10.2010).
51. **Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, Strout Mp ve ark.** MLL partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *The Journal of Clinical Investigation*. **2006**;116:2707-2716.
52. **Faber J, Armstrong SA.** Mixed lineage Leukemia translocations and a leukemia stem cell program. *Cancer Res*. **2007**;67(18).
53. **Pais A, Kadam PA, Raje G, Sawant M, Kabre S, Jain H ve ark.** Identification of various MLL gene aberrations that lead to MLL gene mutation in patients with acute lymphoblastic leukemia(ALL) and infanrs with acute leukemia. *Leukemia Research*. **2005**;29:517-526.
54. **Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, Boer ML, Minden MD, Sallan SE ve ark.** MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics*. **2002**;30:41-47.
55. **Bergh A, Emanuel B, Bholra SZ, Smetsers T, Soest R, Stul M ve ark.** A DNA prbe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias. *Genes, Chromosomes&Cancer*. **2000**;28:14-22.
56. **Bizarro S, Cerveira N, Correia C, Lisboa S, Peixoto A, Norton L, Teixeira MR.** Molecular characterization of a rare MLL-AF4 (MLL-AFF1) fusion rearrangement in infant leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet*. **2007**;178:61-64.
57. **J.J.M. van Dongen, E.A. Macintyre, J.A. Gabert, E. Delabesse, V. Rossi, G. Saglio, E. Gottardi, A. Rambaldi, G. Dotti, F. Griesinger, A. Parreira, P. Gameiro, M. Gonzalez Diaz, M. Malec, A.W. Langerak, J.F. San Miguel and A. Biondi.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* (**1999**) 13, 1901–1928.
58. **Özbek U, Sırma S, Ağaoglu L, Yüksel L, Anak S, Yıldız İ, Devocioğlu Ö, Timur Ç, Meral A, Gedikoğlu G.** Prognostik Significance Of The TEL/AML1 Fusion Gene in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in Turkey. *J Pediatr Hematol Oncol*. **2003**; 25(3): 204-208.
59. **Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C , Köchling J , Grümayer RP, Trka J, Greaves M.** TEL Deletion Analysis Supports a Novel View of Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* **2004**;10: 5355-5360.
60. **Wiemels JL, Greaves M.** Structure and Possible Mechanisms of TEL-AML1 Gene Fusions in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research*. **1999**; 59:4075-4082.

61. Seeger K, Stackelberg AV, Taube T, Buchwald D, Körner G, Suttorp M, Dörffel W, Tausch W, Henze G. Relapse of TEL-AML1–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood: A Matched-Pair Analysis. *J Pediatr Hematol Oncol.* **2001**; 19: 3188-3193.
62. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Wards DC, Wards PB, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci(PNAS).* **1995**; 92: 4917-4921.
63. Spathas DH, Stewart J, Singer IO, Theriault A, Bovey M, Connor JM. Detection of t(12,21) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* **1999**; 1107-13.
64. Harbott J, Viehmann A, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood,* **1997**; 90: 4933-4937.
65. Woerden NL, Pieters R, Loonen A, Hubeek I, Drunen E, Beverloo HB, Slater RM, Harbott J, Seyfarth J, Wering ER, Hahlen K, Schmiegelow K, Janka-Schaub GE, Veerman AJP. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **2000**;98(3): 1094-1099.
66. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/ETV6ID38.html> (Erişim Tarihi: 25.09.2010).
67. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/AML1.html> (Erişim Tarihi: 25.09.2010).
68. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML1 fusion gene: its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet.* **2000**; 122: 73-78.
69. Raynaud S, Cave H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Giroux CG, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. The 12;21 Translocation Involving TEL and Deletion of the other TEL allele:Two Frequently Associated Alternations Found in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **1996**; 87: 2891-2899.
70. Arthur Zelent, Mel Greaves and Tariq Enver. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* **2004** 23, 4275–4283.
71. <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000526538.jpg> (Erişim Tar.: 25.09.2010)
72. <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000533336.jpg> (Erişim Tar.:25.09.2010).
73. <http://www.eurogentec.com/product/research-yakima-yellow.html> (Erişim Tar.:13.12.2010).
74. Kuchta T., Krascenicová K., Bánréti G. Optimization of fluorescence measurement in duplex real-time PCR with TaqMan probes labeled with VIC and quenched by TAMRA Letter to the Editor **2007**; 42( 2):147-149
75. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry,* **1987**; 162: 156-159.

76. **Beyhan Durak, Olga Meltem Akay, N.Şule Yaşar, Muhsin Özdemir, Zafer Gülbaş, Sevilhan Artan.** BCR-ABL Pozitif Lösemilerde Klasik Sitogenetik, Fısh Ve Rtpcr Analizlerinin Karşılaştırılması. Osmangazi Tıp Dergisi **2008**; 30(1):1-9
77. **Arana-Trejo R.M., Ruiz Sanchez E., Ignacio-Ibarra G. ve ark.** BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). Clin. Lab. Haem **2002**; 24,145–150
78. **H.Y. Woo, D.W. Kim, H. Park, K.W. Seong, H.H. Koo and S.H. Kim,** Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic. J Korean Med Sci **2005**; 20: 36-41.
79. **Abdul K. Siraj, Ugur Ozbek, Sudha Sazawal, Sema Sirma, Georgina Timson, Abdallah Al-Nasser, Manorama Bhargava, Hassan El Solh, Kishor Bhatia and Marina I. Gutie´rrez.** Preclinical Validation of a Monochrome Real-Time Multiplex Assay for Translocations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical Cancer Research **2002**. 8, 3832–3840.
80. [http://www.nature.com/leu/journal/v23/n6/fig\\_tab/leu200993f1.html](http://www.nature.com/leu/journal/v23/n6/fig_tab/leu200993f1.html) (Erişim Tar.:03.08.2010).

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı:</b>	<b>Volkan</b>
<b>Soyadı:</b>	<b>ÖZER</b>
<b>Doğum Yeri:</b>	<b>Mut</b>
<b>Doğum Tarihi:</b>	<b>03.08.1982</b>
<b>Görev Yeri:</b>	<b>Toroslar Kaymakamlığı SYD</b>
<b>Yabancı Dil:</b>	<b>İngilizce</b>
<b>E-Posta Adresi</b>	<b>volkan_ozar33@hotmail.com</b>

<b>Tarih</b>	<b>Eğitim</b>
<b>2000-2004</b>	<b>Afyon Kocatepe Üniversitesi,Fen Fakültesi,Biyoloji Bölümü,Lisans</b>
<b>2004-2005</b>	<b>Afyon Kocatepe Üniversitesi,Eğitim Bilimleri Enstitüsü,Tezsiz Yüksek Lisans</b>
<b>2007-</b>	<b>Mersin Üniversitesi,Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Yüksek Lisans</b>

<b>Tarih</b>	<b>İş Tecrübesi</b>
<b>2006-2008</b>	<b>Mersin Valiliği SYD</b>
<b>2008-</b>	<b>Toroslar Kaymakamlığı SYD</b>