

T.C
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
HİPOFİZ TÜMÖRÜ TRANSFORME EDİCİ GEN (PTTG)
EKSPRESYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MERVE GENÇER ÇELİKEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayşe Gül ZAMANI

KONYA 2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
HİPOFİZ TÜMÖRÜ TRANSFORME EDİCİ GEN (PTTG)
EKSPRESYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

MERVE GENÇER ÇELİKEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayşe Gül ZAMANI

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 131318010 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Merve Gençler Çelikel'in "Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında Hipofiz Tümörü Transform Edici Gen (PTTG) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Konya / 10.07.2019

Tez Danışmanı

Doç Dr. Ayşe Gül ZAMANI

NEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D

Asil Jüri Üyesi

Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

NEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D

Asil Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üy. Dudu ERKOÇ KAYA

S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 16/07/2019 tarih ve 15/8 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “Evaluation of Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) Expression in Chronic Myeloid Leukemia Patients“ by Merve Gençer Çelikel that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of Medical Genetics Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya ,Turkey / 10.07.2019

Principal Advisor

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gul ZAMANI
N.E.U Faculty of Medicine
Department of Medical Genetics

Royal Examination Committee Member

Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

N.E.U Faculty of Medicine

Department of Medical Genetics

Royal Examination Committee Member

Asst. Prof. Dr. Dudu ERKOC KAYA

S.U. Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOGLU ATALIK

Director of Institute of Health Science

Date and Signature

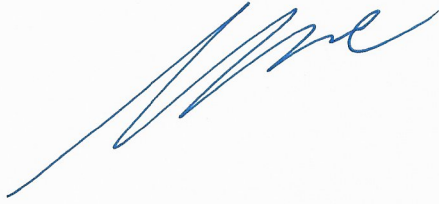


BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19.06.2019

Merve GENÇER ÇELİKEL



[Vize](#)
[Öğrenciler](#)
[Not Defteri](#)
[Kütüphaneler](#)
[Takvim](#)
[Tartışma](#)
[Tercihler](#)

Bu sayfa hakkında


Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

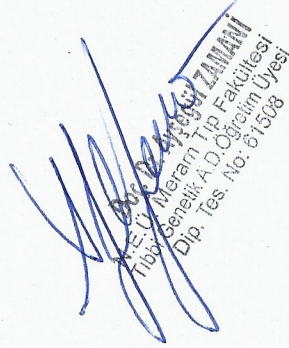
KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA HİPOFİZ TÜMÖRÜ ...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

[Sil](#) [İndir](#) [Suraya taşı...](#)

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input type="checkbox"/>	Merve Gençer Çelikel	 KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA HİPOF...	%17 <input type="text" value="%17"/>	12%	2%	11%	—	—	ödev indir	1145488927	20-Haz-2019


Dr. Öğr. Üyesi ZAMANI
İstanbul Kültür Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Dip. Tes. No: 61508

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ayşe Gül ZAMANİ başta olmak üzere, eğitimime katkıda bulunan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Genetik Laboratuvar çalışanlarına da teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerini her zaman hissettiğim aileme, yüksek lisans eğitim dönemim boyunca yanımda olan ve sabırla beni destekleyen sevgili eşime, varlığıyla bana güç veren kızıma sonsuz teşekkür ederim.

Tezimi destekleyen N.E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Merve GENÇER ÇELİKEL

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Beyanat</i>	<i>iv</i>
<i>Turnitin</i>	<i>v</i>
<i>Önsöz</i>	<i>vi</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vii</i>
<i>Özet</i>	<i>ix</i>
<i>Abstract</i>	<i>x</i>
<i>Kısaltmalar</i>	<i>xi</i>
<i>Şekiller</i>	<i>xiii</i>
<i>Tablolar</i>	<i>xiv</i>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi	3
2.2. Kronik Myeloid Lösemi	4
2.2.1. Tanım ve Tarihçe	4
2.2.2. İnsidans	5
2.2.3. Myeloid Neoplazilerin Sınıflaması ve KML	5
2.2.4. Etiyoloji	8
2.2.5. Klinik	8
2.2.5.1. Kronik Faz	9
2.2.5.2. Akselere Faz	10
2.2.5.3. Blast Faz	10

2.2.6. Progresyon	10
2.2.7. Kronik Myeloid Lösemi 'de Sitogenetik Değişiklikler	11
2.2.8. Kronik Myeloid Lösemi 'de Moleküler Patogenez	13
2.2.8.1. BCR Geni 'nin Yapısı ve Proteini	13
2.2.8.2. ABL1 Geni 'nin Yapısı ve Proteini	15
2.2.8.3. BCR/ABL1 Füzyon Geni 'nin Yapısı ve Proteini	15
2.2.8.4. BCR/ABL1 Füzyon Proteini ve Sinyal Yolaklarına Etkisi	17
2.2.9. Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında Tanı	19
2.2.9.1. Periferik Kan Bulguları	19
2.2.9.2. Kemik İliği Bulguları: Sitogenetik Analiz	20
2.2.9.3. Moleküler Sitogenetik Analiz	21
2.2.9.4. Moleküler Analiz: Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
2.3. Hipofiz Tümörü Transform Edici Gen	22
2.3.1. Yapısı ve Fonksiyonu	23
2.3.2. Onkogeneze İlişkisi	24
3. MATERYAL ve METHOD	26
3.1. cDNA Sentez Aşaması	26
3.2. Real Time PCR Aşaması	27
3.3. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
7. KAYNAKLAR	37
8. ÖZGEÇMİŞ	41

ÖZET

T.C NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında
Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen (PTTG) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Merve GENÇER ÇELİKEL

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2019

Kronik myeloid Lösemi (KML) pluripotent hematopoetik kök hücrenin malign transformasyonu sonucu gelişen klonal bir kök hücre hastalığıdır. KML olgularının %95’de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu lösemik fenotipin gelişmesinden sorumlu *BCR-ABL1* füzyon proteini oluşmaktadır. *BCR/ABL1* füzyon proteiniyle karakterize olan KML, erişkinlerdeki lösemilerin yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır.

KML etiyojisinden sorumlu tutulabilecek herhangi bir çevresel etken bilinmemekle birlikte iyonize radyasyona maruz kalmanın KML riskini arttırdığı rapor edilmiştir.

KML’nin klinik seyri laboratuvar bulguları ve klinik karakteristiklerine göre üç ayrı evreye ayrılır: kronik evre, akselere evre ve blastik evredir.

KML tanısı, periferik kan yayması ve kemik iliği incelemesi ile birlikte karyotip analizinde Ph kromozomu varlığının veya floresan insituhibridizasyon (FISH) ya da polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *BCR-ABL1* füzyon geninin saptanması ile konur. Sitogenetik analiz ile hastaların yaklaşık olarak %95’ inde Ph kromozomu saptanır. Sitogenetik analiz ile Ph kromozomu saptanmayan KML hastalarının çoğunda moleküler tekniklerle translokasyon saptanabilir. Ph kromozomu üzerinde oluşan *BCR-ABL1* füzyon geni, hücre içinde birçok yolağı aktive eden bir tirozin kinazı kodlar.

Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen (Pituitary Tumor Transforming Gene-PTTG) gen, sıçan hipofiz tümörü hücrelerinden 1997 yılında izole edildi . PTTG’nin birincil fonksiyonu, kardeş kromatidlerin zıt kutuplara iğ iplikleri ile ayrılmasının kontrolü ile ilgilidir. Bu aktiviteye göre, kromozomun hatalı ayrılmasının bir sonucu olarak genomik dengesizlik, upregüle PTTG ekspresyonunun onkojenik potansiyelinin sebebinin açıklayabilir. PTTG’in aşırı ekspresyonu anöploid jenerasyonu ile ilişkilidir, bu durum multiple tümör tiplerindeki farklılaşmış prognoz ile korelasyon gösterir.

Çalışmada, RNA izolasyonu ve RT-PCR analizi kullanılarak 129 numune üzerinden değerlendirme yapıldı. *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan 88 adet hasta numunesi ile *BCR/ABL1* transkripti negatif olan 41 adet hasta numunesi arasındaki PTTG gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, negatif ve pozitif transkript örnekleri arasında PTTG gen ekspresyonunun farklılık gösterdiği gözlenmiştir. *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan numunelerde PTTG ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir.

KML deki klinik seyrin ek kromozom anomalilerle ilişkisi göz önüne alındığında PTTG ekspresyonunun KML’de değerlendirilmesinin önemli olabileceğini ön görüldü. Bu çalışmada, KML hastalarında PTTG ekspresyonunun hasta prognozu ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmek amaçlandı.

Anahtar Sözcükler: Kronik Myeloid Lösemi; PTTG Ekspresyonu; RT-PCR

ABSTRACT

THE REPUBLIC of TURKEY

UNIVERSITY of NECMETTIN ERBAKAN
INSTITUTE HEALTH SCIENCES

“Evaluation of Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) Expression
in Chronic Myeloid Leukemia Patients

Merve GENCER CELİKEL

Medical Genetics Department

THE THESIS OF MASTER/KONYA-2019

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal stem cell disease caused by malignant transformation of a pluripotent hematopoietic stem cell *BCR-ABL1* fusion protein is responsible for the development of leukemic phenotype as a result of t (9; 22) (q34; q11) translocation in 95% of CML cases. CML, be characterized by the *BCR / ABL1* fusion protein, constitutes for about 20% of leukemias in adults.

Although there are no known environmental factors responsible for the etiology of CML, exposure to ionizing radiation has been reported to increase the risk of CML.

According to the clinical course and laboratory findings of CML is divided into three different phases: chronic phase, accelerated phase and blastic phase.

The diagnosis of CML is made by peripheral blood smear and bone marrow examination with detecting the presence of the Ph chromosome in the karyotype analysis, or by the detection of the *BCR-ABL1* fusion gene by fluorescence insitu hybridization (FISH) or polymerase chain reaction (PCR). Ph-chromosome is detected in approximately 95 % of the patients by cytogenetic analysis. Most CML patients without Ph-chromosome in cytogenetic analysis can detect translocation by molecular techniques The *BCR-ABL1* fusion gene formed on the Ph chromosome, encodes a tyrosine kinase that activates many pathways within the cell.

Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) gene was isolated from rat pituitary tumor cells in 1997. PTTG1 primary function is related to the control of sister chromatid separation to the opposite spindle poles. According to this activity, genomic imbalance as a result of chromosome missegregation is a rationale for the oncogenic potential of upregulated PTTG1 expression. In fact, PTTG1 over-expression has been associated with aneuploidy generation, what correlates with a differentiated prognosis in multiple tumor types .

In this study, 129 samples were evaluated using RNA isolation and RT-PCR analysis. PTTG gene expression was evaluated between 88 patient samples with positive *BCR / ABL1* transcript and 41 patient samples with negative *BCR / ABL1* transcript. When the analysis results were evaluated, it was observed that PTTG gene expression differed between negative and positive transcript samples. PTTG expression was found to be increased in samples with positive *BCR / ABL1* transcript.

Considering the relationship between clinical course and additional chromosomal abnormalities in CML, it was predicted that evaluation of PTTG expression in CML may be important. In this study, we aimed to evaluate whether PTTG expression is associated with patient prognosis in CML patients.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia; PTTG Expression; RT-PCR.

KISALTMALAR

ABL:	Abelson Murine Leukemia 1
ALL:	Akut Lenfositik Lösemi
AML:	Akut Myeloid Lösemi
APC/C:	Anafaz İlerletici Kompleks
BCR:	Breakpoint cluster region
bFGF:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
cDNA:	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
CFU:	Colony Forming Unit/ Koloni Oluşturan Ünite
CFU-E:	Erythrocyte Colony Forming Unit/Eritrosit Koloni Oluşturan Ünite
CFU-GM:	Granulocyte Makrophage Colony Forming Unit/ Granülosit Makrofaj Koloni Oluşturan Ünite
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
FGF :	Fibroblast Büyüme Faktörü
hPTTG:	Human Pituitary Tumor Transforming Gene/ İnsan Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen
kDa:	kiloDalton
KML:	Kronik Myeloid Lösemi
KMPH:	Kronik Myeloproliferatif Hastalık
LAP:	Lökosit Alkalen Fosfataz Skoru
M-BCR:	Majör BCR
pALL:	Pediyatrik Akut Lenfoblastik Lösemi
Ph:	Philedelphia Kromozumu
PTTG:	Pituitary Tumor Transforming Gene/Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen

SPSS 20.0: Statistical Package for The Social Science

VEGF: Vasküler Endotel Hücre Büyüme Faktörü

μ -BCR: Mikro *BCR*



ŞEKİLLER

Şekil 1. Hematopoetik kök hücrenin kanın öncüllerine gelişimi.....	4
Şekil 2. Philadelphia Kromozomu'nun gösterimi.....	12
Şekil 3. BCR ve ABL genlerinin kırılma noktaları ve füzyon transkriptlerinin şematik gösterimi.	17
Şekil 4. BCR/ABL füzyon proteinin etkilediği yollar.	18
Şekil 5. Konvansiyonel sitogenetik analizde t(9;22)(q34;q11)	21
Şekil 6. BCR/ABL füzyon geninin Floreasan In Situ Hibridizasyon yöntemi ile gösterimi.....	22
Şekil 7. PTTG'nin şematik gösterimi	24
Şekil 8. Grupların Dağılımı	29

TABLÖLAR

Tablo 1. DSÖ 2016 sınıflamasına göre kronik myeloproliferatif hastalıklar	7
Tablo 2. DSÖ kriterlerine göre akselere ve blastik evre belirteçleri.	9
Tablo 3. Sokal indeks hesaplaması.....	11
Tablo 4. Hasford skorlama hesaplaması.....	11
Tablo 5. Tanımlayıcı İstatistikler	29
Tablo 6. Normallik sınaması	30
Tablo 7. Mann-Whitney U sonuçları.....	31

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML) pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Erişkin yaşta görülen lösemilerin yaklaşık %20'sini oluşturur. KML, laboratuvar bulguları ve klinik seyrine göre üç evreye ayrılır. Doğal seyrinde KML tipik olarak kronik faz ile başlar, birkaç yıl içinde akselere faza progresyon olur ve son evre olarak da hastalık blastik faza (blastik kriz) ilerler. Blastik kriz, KML' nin son evresidir. Klinik olarak akut lösemilere benzer. Kronik fazdan akselere ve blastik faza geçişin en önemli belirteçlerinden biri yeni ortaya çıkan ek kromozom anomalileridir.

Hipofiz tümörü transforme edici gen (PTTG) ise bir insan sekürin proteindir. İlk olarak 1997 yılında fare hipofiz tümörü GH4 hücrelerinden izole edilmiştir. PTTG'nin bilinen fonksiyonu kromozom stabilitesini sağlamaktır. Aynı zamanda; DNA hasar tamiri, apoptoz, angiogenez gibi birçok normal hücresel aktivitede de görev yapmaktadır. Normal insan dokularından testis ve timusda yüksek, kolon, ince barsak, beyin ve pankreasta ise daha zayıf bir şekilde ifade bulur. Normal döngü esnasında metafaz aşamasında kardeş kromatidlerin erken ayrılmasını önlemek için kohesin proteini, sister kromatidleri birbirine bağlar. Anafazın başında seperaz enzimi kohesini yıkar, bu da metafazdan anafaza geçişi gerçekleşir. PTTG ise seperaza bağlanarak bu fonksiyonunu baskılar. PTTG'nin anafaz yönlendirici kompleks tarafından yıkılması seperazın aktif hale dönüşmesini ve kardeş kromatidlerin ayrılmasını sağlar. PTTG'nin normal düzeylerinde ortaya çıkacak bir değişiklik kromatid segregasyonunu bozarak bölünmeden sonra oluşacak hücrelerde anöploidiye ve kromozom anomalilerine yol açacaktır. İlginç bir şekilde, insan malign tümör hücreleri test edildiğinde, incelenen bütün malign hücre hatlarında PTTG geninin ekspresyonu yüksek bulunmuştur. PTTG'nin hipofiz, tiroid, meme, kolon, mide, akciğer ve özafagus kanserlerinde ekspresyonu yüksek iken tam tersine normal dokularda ekspresyonu kısıtlıdır. Artan ekspresyonun damar oluşumu ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Dolayısıyla, PTTG'nin artmış ekspresyonu çeşitli insan kanserlerinde metastaz ve genel olarak kötü sağkalım ile ilişkilidir.

KML deki klinik seyirin ek kromozom anomalilerle ilişkisi göz önüne alındığında PTTG ekspresyonunun KML'de değerlendirilmesinin önemli

olabileceğini ön görüldü. Bu çalışmada, KML hastalarında PTTG ekspresyonunun hasta prognozu ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmek amaçlandı.

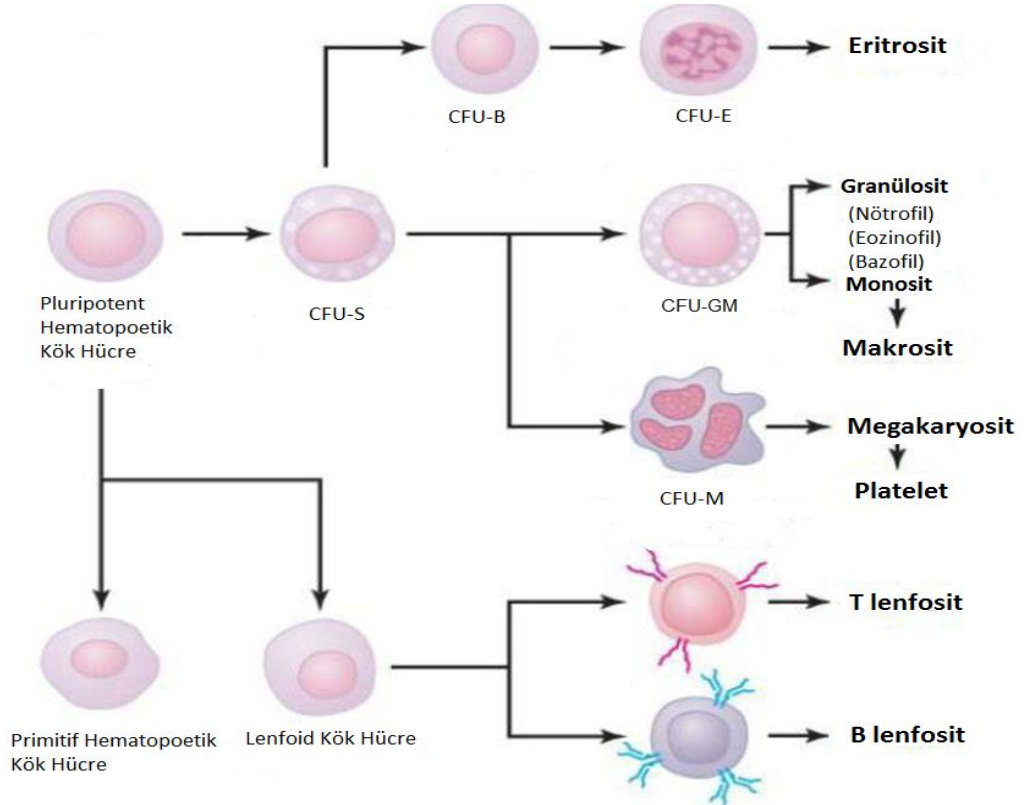


2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi

Hematopoetik kök hücreler tüm kan hücrelerinin öncüleridir. Bu hücrelerin kendini yenileme özelliği vardır ve birçok farklı hücreye dönüşebilir. Bu özelliklerinden dolayı pluripotent adını alır. Bu kök hücreden gelişen öncül hücreler farklı serilerdeki kan hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşır. Hücreler morfolojik olarak farklılaşıp olgunlaştıkça, kendilerini yenileme özellikleri azalır. Öncelikle lenfoid-myeloid serilerin ayrımı olur ve ortak lenfoid öncül ile ortak myeloid öncül oluşur. Buradan sonra oluşan hücreler, kültüre konulduklarında oluşturacakları spesifik hücreye göre “koloni oluşturan ünite” (CFU-colony forming unit) adını alırlar. CFU-E eritrosit, CFU-GM granulosit ve monosit oluşturur (Guyton ve Hall 2000).

Lökositlerin iki büyük grubu, lenfositik ve myelositik serilerden gelişir. Myelositik seri myeloblast ile başlar; bazofil, eozinofil ve nötrofil oluşturur. Myeloid seriden ayrıca eritrosit ve trombositler gelişir.



Şekil 1. Hematopoetik kök hücrenin kanın öncüllerine gelişimi. (<https://slideplayer.biz.tr/slide/12065739/>)

Hematopoetik sistemin düzenlenmesi bazı büyüme faktörleri ile sağlanır. Aralarında kök hücre faktörü (*stem cell factor*) granulosit-makrofaj uyarıcı faktör (*colony stimulating factor* (GM-CSF)), interlokin-3 (IL-3), eritropoetin ve trombopoetin gibi proteinlerin bulunduğu büyüme faktörleri, kontrollü salınımları ile kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini, öncül hücrelerin farklılaşmasını ve dolaşımdaki hücrelere dönüşümlerini düzenler (Guyton ve Hall 2000).

Yapılan çalışmalar Wnt, Notch, kemik morfojenik protein (BMP), sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörünün hematolojik kök hücre farklılaşmasını kontrol ettiği göstermiştir (Ross ve Li 2006).

2.2. Kronik Myeloid Lösemi

2.2.1. Tanım ve Tarihçe

Kronik myeloid lösemi, klonal hematopoetik kök hücre malignitesidir (Rabinowitz ve Larson 2004). Kemik iliğinde myeloid serinin tüm elemanlarındaki artışla karakterize olan KML, insanlarda bir spesifik kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır. İlk kez tanımlandığı 1845 yılından yaklaşık bir yüzyıl

sonra, 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından Philadelphia kromozomunun (Ph) ilk kez gösterilmesi ile KML yepyeni bir boyut kazandı (Nowell ve Hungerford 1960). 1973 yılında Ph kromozomunun 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyondan kaynaklandığı gösterildi. 1984 yılında 22. kromozomun kırık noktasındaki *Breakpoint Cluster Region (BCR)* klonlandı (Groffen ve ark. 1984). 1985 yılında ise *BCR-ABL1* füzyon geni, *BCR-ABL1* kimerik proteini ve bu proteinin tirozin kinaz özelliği tanımlandı (Shtivelman ve ark. 1984). İlerleyen yıllarda, şimdiki adıyla “*BCR-ABL1*” füzyon geninin hayvan deneylerinde KML yol açığının ve bu hastalığın nakledilebilir olduğunun gösterilmesi ile bu genetik değişikliğin KML hastalığının patogenezindeki rolü kesinleşti (Daley ve ark. 1990). 1998 yılında imatinib adı verilen molekülün *BCR-ABL1* protein ürününü inhibe etmesi KML'yi moleküler mekanizması üzerinden etkili tedavi geliştirilen ilk hastalıklardan biri yaptı (Druker ve ark. 2001).

2.2.2.İnsidans

Yıllık KML insidansı 100.000 de 1-2 vaka şeklinde gerçekleşir. Ortalama görülme yaşı 45-55 yaşları arasındadır. KML insidansı yaşla birlikte artış gösterir, hastaların %30'u 60 yaş üstündedir. Çocukluk çağı lösemilerinin %3'ü KML oluşturur. Erkeklerde, kadınlara oranla daha sık görülür.

2.2.3. Myeloid Neoplazilerin Sınıflandırılması ve KML

Hematopoetik pluripotent kök hücreler, kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptir. Eritrositler, lenfositler, granülositler, megakaryositler ve makrofajlar gibi çeşitli olgun kan hücrelerinin oluşmasını sağlayan myeloid veya lenfoid seriyi oluşturur. Hematopoetik sürecin oluşması için kemik iliğine, büyüme ve transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç vardır (Thapa ve Rogers 2019).

Periferik kandaki bir veya daha fazla terminal myeloid hücre hattının anormal proliferasyonu, myeloproliferatif neoplaziler adı verilen heterojen bir grup hastalığa yol açar. 1951 yılında William Dameshek, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından myeloproliferatif neoplaziler (MPNs) için tanımlanmış olan myeloproliferatif bozukluklar terimini kullandı. Kronik myeloid lösemi (KML), polisitemi vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve primer miyelofibrozis (PMF) dört klasik tip myeloproliferatif neoplazi türüdür. DSÖ sınıflaması ayrıca kronik nötrofilik lösemi

(KNL), kronik eozinofilik lösemi (KEL) ve sınıflandırılmayan MPN'yi de içermektedir. Klasik MPN tiplerinden KML, *BCR-ABL1* pozitifdir ancak PV, ET ve PMF, *BCR-ABL1* negatiftir. Ayrıca, DSÖ sınıflandırmasının myeloid ve akut lösemi sınıflamasının dördüncü baskısı, hematolojideki son gelişmelere bağlı olarak moleküler belirteçlerin ve prognostik belirleyicilerin tanımlanmasıyla birlikte hematolojik malignitelerin moleküler patogenezi ve genetiğinin daha iyi anlaşılmasıyla 2016 yılında revize edilmiştir (Thapa ve Rogers 2019).

DSÖ'nün 2016 sınıflandırmasına göre myeloid neoplazi ana alt grupları Tablo 1'de verilmiştir.



Tablo1.DSÖ 2016 sınıflamasına göre kronik myeloproliferatif hastalıklar (Arber ve ark. 2016)

DSÖ Göre Myeloid Neoplaziler Sınıflandırması, 2016

Myeloproliferatif neoplazma (MPN)

Kronik Myeloid Lösemi (KML), BCR/ABL+

Kronik Nötrofilik Lösemi (KNL)

Polisitemia Vera (PV)

Birincil Myelofibrosiz

 Birincil Myelofibroz, prefibrotik/erken evre

 Birincil Myelofibroz, prefibrotik/overt fibrotik evre

Kronik Eozinofilik Lösemi, aksi belirtilmedi

Myeloproliferatif Hastalıklar, sınıflandırılmaz

Mastositoz

PDGFRA, PDGFRB veya FGFR1 ya da ile PCM1-JAK2 yeniden düzenlenmeleri ve eozinofili ile birlikte Myeloid/Lenfoid neoplazmalar

Myeloid/Lenfoid neoplazmalar ile PDGFRA yeniden düzenlemeleri

Myeloid/Lenfoid neoplazmalar ile PDGFRB yeniden düzenlemeleri

Myeloid/Lenfoid neoplazmalar ile FGFR1 yeniden düzenlemeleri

Geçici mevcudiyetli: Myeloid/Lenfoid neoplazmalar ile PCM1-JAK2 yeniden düzenlemeleri

Myelodisplastik / myeloproliferatif neoplazmalar (MDS/MPN)

Kronik Myelomonositik Lösemi (KMML)

Atipik Kronik Miyeloid Lösemi (aKML), BCR/ABL-

Juvenil Myelomonositik Lösemi (JMML)

MDS/MPN halka sideroblast ve trombositozlu (MDS/MPN-RS-T)

MDS / MPN, sınıflandırılmayan

Myelodisplastik Sendromlar (MDS)

MDS tek köken displazi ile

MDS halka sideroblast ile (MDS-RS)

 MDS -RS ve tek köken displazi

 MDS -RS ve multiköken displazi

MDS multiköken displazi ile

MDS artan blast ile

MDS izole edilen del(5q)

MDS, sınıflandırılmayan

Geçici mevcudiyetli: Çocukluk çağı refraktar sitopeni

Üreme hücresi hattı yatkınlığı olan myeloid neoplazmalar

KML, myeloproliferatif hastalıklardandır ve gruptaki hastalıklar içinde yetişkinler arasında en yüksek insidansa sahip olanıdır (Rabinowitz ve Larson 2004).

Multipotent bir hematopoetik öncül hücreden köken almaları ve değişime uğrayan klonun diğer klonlar üzerinde dominant bir etki kurması KMPH'lerin ortak özellikleri arasındadır. Ayrıca tanımlanan bir uyarı olmadığı halde bir ya da daha fazla grup kan elemanının aşırı üretimi, kemik iliğinde hipersellularite, ekstramedüller hematopoez, akut lösemiye spontan dönüşüm ihtimali ve kemik iliği fibrozisi gelişimi de söz konusudur (Spivak ve ark. 2003).

2.2.4. Etiyoloji

KML etiyojisinden sorumlu tutulabilecek herhangi bir çevresel etken bilinmemekle birlikte iyonize radyasyona maruz kalmanın KML riskini arttırdığı rapor edilmiştir. Japonya'ya ikinci dünya savaşı esnasında atılan atom bombalarından sonra KML insidansı artmış ve maruziyetten 5-12 yıl sonra KML görülme sıklığının pik yaptığı ve bu durumun radyasyon dozuna bağımlı olduğu bildirilmiştir. Ancak nükleer endüstrileri çalışanlarında, akilleyici ajan maruziyeti ya da radyoterapi sonrası KML riskinde artış gösterilememiştir (Alp 2011). Obezite bir kaç solid tümörün yanı sıra KML içinde muhtemel risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Breccia ve ark. 2013). Maligniteler için kullanılan tedavilere bağlı KML gelişme olasılığı ile ilgili yapılan araştırmalar sonucu tatmin edici bulgular elde edilmemiştir.

2.2.5. Klinik

KML'nin klinik seyri, laboratuvar bulguları ve klinik karakteristiklerine göre üç ayrı evreye ayrılır (Jabbour ve Kantarjian 2014). Tanı alan hastaların %85'i kronik, %10'u akselere, %5'i blastik evrededir. KML tipik olarak kronik faz ile başlar, birkaç yıl içinde akselere faz gelişir. Son evre olarak da hastalık blastik kriz (blastik faza) ilerler. Blastik kriz, KML'nin terminal evresidir. Klinik olarak akut lösemilere benzemektedir. Kronik fazdan akselere ve blastik faza geçişte yeni ortaya çıkan kromozom anomalileri en önemli nedenlerinden biridir. DSÖ kriterlerine göre akselere ve blastik evre belirteçleri Tablo 1'da özetlenmiştir.

Tablo 2. DSÖ kriterlerine göre akselere ve blastik evre belirteçleri

AKSELERE (HIZLANMIS) EVRE:
Periferik kan lökositlerinin ve/veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması
Periferik kan bazofillerinin \geq %20 olması
Tedaviye bağlı olmayan kalıcı trombositopeni $<100.000/\text{mm}^3$ veya tedaviye yanıtızsız kalıcı trombositoz $> 1 \times 10^6/\text{mm}^3$
Tedaviye yanıtızsız ve giderek artan dalak büyüklüğü ve lökosit sayısı
Sitogenetik olarak klonal dönüşüm olması
BLASTİK EVRE:
Periferik kan lökositlerinin veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin \geq %20'sinin blast olması
Kemik iliği dışı (ekstramedüller) blastik proliferasyon
Kemik iliği biyopsisinde gruplar halinde blast olması

2.2.5.1. Kronik Faz

Tanı sırasında hastaların %90-95'i kronik fazdadır. Kronik faz belirti ve semptomları anemi ve splenomegali nedeni ile ortaya çıkmaktadır. Bunlar yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı ve sol üst kadranda dolgunluk ya da ağrıdır. Nadir belirtiler arasında kanama, (düşük trombosit sayısı ve / veya trombosit işlev bozukluğu ile ilişkili), tromboz (trombositoz ve / veya belirgin lökositoz ile ilişkili), gut artriti (yükselmiş ürik asit seviyelerinden), priapizm (genellikle belirgin lökositoz veya trombositoz), retinal kanamalar ve üst gastrointestinal ülserasyon ve kanama (bazofili nedeniyle yüksek histamin seviyelerinden) görülebilir (Jabbour ve Kantarjian 2014).

Pulmoner veya serebral damarlarda tortulaşan lösemik hücrelere bağlı lökotik semptomlar (dispne, uyku hali, koordinasyon kaybı, konfüzyon), $100 \times 10^9/\text{L}$ 'yi aşan beyaz kan hücresi (WBC) sayısına rağmen, kronik fazda nadir görülür. Splenomegali, vakaların %40-50'sinde tespit edilen en tutarlı fiziksel bulgudur. Hepatomegali daha az yaygındır. (%10'dan az). Lenfadenopati ve deri veya diğer dokuların infiltrasyonu nadirdir. Eğer mevcut ise, Ph negatif KML veya akut ya da blast faz döneminde karşılaşılabılır (Jabbour ve Kantarjian 2014) .

2.2.5.2. Akselere Faz

Akselere faza geçiş tanısı için kriterler değişkenlik gösterebilir. En yaygın kullanılan DSÖ tarafından yayınlanan kriterlerdir (Tablo 2) (Kara 2010). Akseler faz kemik iliğinde veya periferik kanda %10-20 blast görülen, tedaviye yanıtız ve kemik iliğinde ilave kromozomal anomalilerin görüldüğü evredir. Tedaviye rağmen organomegalinin devam etmesi ya da artması, kemik ağrısı, ateş, kilo kaybı akselere fazın klinik özellikleridir. Eozinofil ve bazofil sayısında artma, periferik kan ve kemik iliğinde immatür hücre sayısının artması, Ph kromozomuna ek olarak başka kromozom anomalilerinin saptanması akselere fazın tanısall bulgularıdır (Alp 2011).

2.2.5.3. Blast Faz

Blast faz KML değerlendirmesinde son evreyi oluşturmaktadır. Kemik iliği veya periferik kanda %20 ve üzeri blast saptanması veya ekstramedullerde (dalak, lenf nodları, cilt, meninksler, kemik) blastik hücre birikmesi karakterizedir (Aladağ ve Haznedaroğlu 2019). Çoğu hastada blastik faz öncesi akseler faz bulguları ortaya çıkmaktadır ancak hiçbir semptom ve bulgu olmadan doğrudan blastik faza ilerleme de görülebilir. Akseler fazda görülen bulgularına ek olarak lenfadenopati gelişimi blastik fazın önemli bir bulgusudur. Akut lösemnin bütün belirtileri blastik fazda görülebilir. Blastik fazda ortalama yaşam süresi 4 ay civarındadır (Alp 2011).

2.2.6. Progresyon

Ağır klinik belirtilerin çoğunlukla ortaya çıkmadığı kronik fazda, hastaların yaşam kalitesi çok fazla etkilenmez. Ancak, hastalık kaçınılmaz olarak blast krize ilerler ve bu aşamadan sonra uzun süreli sağkalım çok nadirdir. Blast krizi gelişmeyen KML hastalarının ölüm nedeni, genellikle kemik iliğinde fibrozisi sunucu ortaya çıkan kemik iliği yetmezliğidir (Rabinowitz ve Larson 2004).

KML' de hastaların prognostik risk gruplarını belirleyen çeşitli skorlama sistemleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan skorlama sistemleri prognostik faktörlerin multideğişkenli analizlerinin yapıldığı sistemlerdir. Sokal indeksi ve daha yeni bir skorlama sistemi olan Hasford skoru en sık kullanılan skorlama sistemleridir (Tablo 3ve Tablo 4). Sokal prognostik sınıflama sisteminde göre, blastik faza geçiş süresini ya da tüm sağkalımı etkileyen faktörler arasında dalak büyüklüğü,

dolaşımdaki blast yüzdesi ve yaş öne çıkmaktadır. Hasford risk skorlamasında ise yaş, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, myeloblast, eozinofil ve bazofil yüzdeleri dikkate alınır (Oğuz 2014).

Tablo 3. Sokal indeks hesaplaması.

(https://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/project_info/index_eng.html)

Sokal İndeksi Hesaplanması	Risk Sınıflandırması
$0.0116 \times [\text{yas (yıl)} - 43.4] + 0.0345 \times (\text{dalak} - 7.51)$	Düşük risk < 0.8
$+ 0.188 \times [(\text{trombosit sayısı}/700)^2 - 0.563] +$	Orta risk 0.8-1.2
$0.0887 \times (\text{blast} - 2.10)$	Yüksek risk > 1.2

Tablo 4. Hasford skortlama hesaplaması.

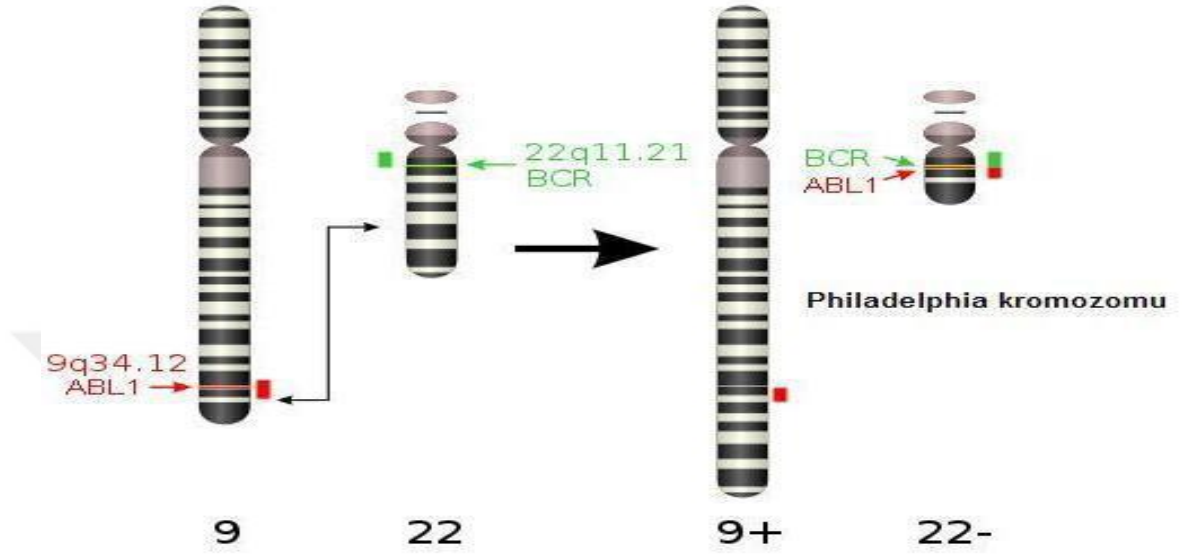
(https://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/project_info/index_eng.html)

Hasford Skortlama Hesaplanması	Risk Sınıflandırması
Yaş ≥ 50 ise $0.666 + (0.042 \times \text{dalak}) + \text{trombosit}$	Düşük risk ≤ 780
sayısı $> 1500 \times 10^9/L$ ise $1.0956 + (0.0584 \times \text{blast})$	Orta risk 781 - 1480
$+ \text{bazofil sayısı} > \%3$ ise $0.20399 + (0.0413 \times$	Yüksek risk > 1480
$\text{eozinofil}) \times 100$	

2.2.7.KML'de Sitogenetik Değişiklikler

KML, etyolojisinde kromozomal bir anomalinin tanımlandığı ilk kanserdir. Kromozomal anomali 9. ve 22. kromozomlar arasında gerçekleşen resiprokal bir translokasyondur. 9q34.1 bölgesinde ve 22q11.2 bölgesinde birer kırık oluşur ve kopan parçaların karşılıklı yer değişimi sonucu t(9;22)(q34.1;q11.2) translokasyonu oluşur (Syed ve ark. 2008). Oluşan 22. kromozom Philadelphia (Ph) kromozomu olarak isimlendirilir ve normal homologundan oldukça küçük olduğundan sitogenetik karyotiplemede kolaylıkla fark edilir. Hastalıktan sorumlu *BCR-ABL1* füzyon onkogeni, 22. kromozom üzerinde bulunur (Kantarjian ve ark. 2006). Bu translokasyon KML'nin ayırt edici özelliğidir ve KML hastalarının %95'inde bulunur. Ayrıca hastaların %2-3'ünde sitogenetik olarak tespit edilemeyen translokasyon kriptik olarak mevcuttur. Akut Lenfoblastik Lösemili (ALL) tanısı alan çocukların %5'inde, ALL tanısı alan erişkinlerin %15-30'unda ve yeni tanı alan akut myeloid lösemili (AML) hastalarının %2'sinde de bu translokasyon saptanır (Kara 2010).

KML'deki t(9;22)(q34.1;q11.2) resiprokal translokasyonunun oluşum mekanizması hakkında birkaç teori vardır. Bir görüşe göre, kromozomlardaki bu kırık ve birleşme tamamen rastgele gerçekleşmekte, fakat oluşan onkogenik ürün hücreye selektif büyüme avantajı sağlamaktadır (Melo ve Deininger 2004).



Şekil 2. Philadelphia Kromozomu'nun gösterimi

(<https://www.nhpr.org/post/philadelphia-chromosome-mutant-gene-and-quest-cure-cancer#stream/0>)

Translokasyonun rastgele olmadığını öne süren görüşün ise bu yönde bazı kanıtları bulunmaktadır. İlk olarak, epidemiyolojik araştırmalar KML'de iyonize edici radyasyonun bir risk faktörü olarak göstermiştir. Translokasyon, radyasyon etkisiyle oluşan kromozom kırıkları için sıcak nokta (hot-spot) kabul edilen bölgelerde gerçekleşmektedir (Ballarini ve Ottolenghi 2004). Ayrıca, interfaz aşamasında nükleusta 9. ve 22. kromozomların topografik yerleşimlerinin birbirine yakın olması sebebi bu translokasyonu oluşturmaya yatkın olabilecekleri öne sürülmüştür (Goldman, ve Melo 2008).

Ph kromozomu oluşumunun hastalık patogenezinin tek etken mi olduğu, hastalığın gelişiminde ikincil bir olay olarak mı geliştiği konusu henüz tamamen açıklığa kavuşmamıştır. Bazı olgularda KML tanısı konulduğu halde Ph kromozomu gösterilememektedir (Melo ve Deininger 2004). Bu duruma ek olarak, tamamen sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda ise %30'a varan oranlarda *BCR-ABL1* füzyon

ürünü saptanmıştır (Biernaux ve ark. 1995). Bu kanıtlar, *BCR-ABL1* hibrid geninin tek bir onkogen olarak malign dönüşüm için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. KML gelişen bireylerin yapısal ya da edinilmiş henüz tanımlanamamış predispozan moleküler bir değişikliğe sahip olmaları da mümkündür.

Olguların %5-10'unda, Ph kromozomunun dışında üçüncü bir kromozomun eklendiği kompleks translokasyonlar da görülür. Bu tip kompleks translokasyonlara en sık eklenen kromozom bölgeleri arasında sırasıyla 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 ve 22q13 yer alır. Bu translokasyonlarda *BCR-ABL1* füzyonu geni genellikle 22. kromozom üzerinde lokalizedir. Genetik olarak kompleks yapılarına rağmen, mevcut veriler, yeniden düzenlemelerin, standart bir Ph kromozomlu KML'ye kıyasla herhangi bir spesifik fenotipik veya prognostik etki sağlamadığını gösterir (Johansson ve ark. 2002).

Olgu takibi esnasında yapılan sitogenetik analizlerde Ph kromozomuna ek olarak başka kromozomal anomaliler de saptanabilir. İkincil kromozomal anomaliler blastik faza dönüşümün habercisi olarak yorumlanabilir. En sık gözlenen ikincil kromozomal anomaliler +8, çift Ph (+Ph), i(17)(q), +19, +21 ve Y kaybıdır. İkincil anomalilerin ortaya çıkışı klonal evrim olarak isimlendirilir. Hastalık progresyonu esnasında ortaya çıkan klonal evrim kötü prognoza işaretidir. Ph kromozomuna ek olarak meydana gelen değişikliklerin %60-80'ni blast evresinde görülür. (Johansson ve ark. 2002).

2.2.8. Kronik Myeloid Lösemi'de Moleküler Patogenez

2.2.8.1. *BCR* Geninin Yapısı ve Proteini

BCR geni, 22. kromozomda yer alan 130 kb uzunluğunda, 23 ekzonlu ve sürekli okunan bir gendir. İnsanda en çok beyin dokusunda ve hematopoetik hücrelerde ifade bulmaktadır. Hematopoetik hücrelerde özellikle myeloid farklılaşmanın erken evrelerinde etkin olduğu, hücre olgunlaştıkça translasyonun azaldığı gösterilmiştir. Normal *BCR* proteini, 160 kd ağırlığında sitoplazmik bir proteindir. Bir Serin/Treonin kinaz olarak görev yapar. *BCR* geninin ayrıca 130 kd ağırlığında ikinci bir protein ürettiği de bilinmektedir (Laurent ve ark. 2001).

BCR proteininin birçok fonksiyonel bölgesi bulunmaktadır. *BCR* geninin 5' ucunda yer alan proteine çevriminde ifade bulmayan bölgesi de (untranslate region-

UTR) önemlidir. Özellikle *BCR* geninin -644. ve -718. nükleotidleri transkripsiyonun kontrolü sırasında transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgedir. Oligomerizasyon bölgesi, *ABL1* kinazının aktivasyonunda görev alan önemli bir bölgedir. Ortaya çıkan *BCR-ABL1* füzyon proteininde otoposforilasyon işlemi bu bölge sayesinde gerçekleşir. Bu bölge ayrıca *BCR-ABL1* füzyon proteininin hücre içindeki lokalizasyonunu da etkilemektedir. Normal *ABL1* proteini, hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunmasına rağmen, *BCR-ABL1* füzyon proteininin; sitoplazmik ve kısmen hücre iskeleti ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Oligomerizasyon bölgesinin delete olması; *BCR-ABL1*'in F-aktin'e bağlanmasının azalması ile sonuçlanmaktadır. Oligomerizasyon bölgesinin, F-aktin bağlanma kapasitesini yükselttiği ve *BCR-ABL1* füzyon proteininin sitoplazmik lokalizasyonundan kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir. İlk ekzonun kodladığı bölge bir serin/treonin kinaz bölgesi, SH2 bölgeleri ve merkezi bir GEF bölgesi içerir. Proteinin karboksit terminal ucunda ise RasGAP bölgesi yer alır. SH2 bölgeleri; son derece korunumlu, yüz aminoasitlik non-katalitik bölgelerdir. SH2 bölgeleri sinyal iletim moleküllerini bağlar ve hücre içi önemli yolları aktive eder. Birinci ekzonda yer alan 192-242. ve 298-413. aminoasit dizilimlerini içeren iki SH2 bölgesi onkogenik aktivasyondan sorumludur. Bu bölgede yer alan 3. bir SH2 bölgesi 177. pozisyondaki tirozinin (Tyr177 ya da Y177) otoposforillenmesi ile bir adaptör protein olan GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ile major bir bağlanma bölgesi oluşur. *BCR*, GRB2 üzerinden Ras yolağı ile bağlantı sağlar (Laurent ve ark. 2001).

BCR proteininin santral ve karboksit terminal bölgeleri özellikle G-proteinleri ile olan çok yönlü ilişkileri nedeniyle önem taşımaktadır. G-proteinleri intrasellüler sinyal iletiminde, hücre büyümesinde ve hücre iskeleti organizasyonunda görev alırlar. G proteinleri; GDP bağlı iken inaktif formda, GTP bağlı iken aktif formdadır. GEF, GDP'yi GTP'ye dönüştürerek, G proteininin aktif formda geçmesini sağlar. GAP ise GTP'yi hidrolize inaktif pozisyona geçişi sağlar. *BCR* hem GAP hem de GEF bölgeleri aracılığı ile G protein aracılı sinyal ileti yollarında görevlidir. Rac GAP bölgesi bölgesi genelde füzyon proteininde yer almaz. GEF bölgesinde, XPB (xeroderma pigmentosum) proteini için bir bağlanma bölgesi vardır. Füzyon ortaya çıktığında *BCR* ve XPB arasındaki normal etkileşimi engellenmektedir, dolayısıyla *BCR-ABL1* pozitif KML'de DNA tamirindeki sıkıntı ve sonraki genomik dengesizlik izlenmektedir. Bu mekanizma, KML'deki klonal evrimi açıklamaktadır. Hastalığın

kolay kontrol edilebilir benign fazdan, ölümcül blast krize olan ilerlemesine neden olmaktadır (Laurent ve ark. 2001).

2.2.8.2. ABL Geninin Yapısı ve Proteini

ABL geni reseptörü olmayan bir tirozin kinaz molekülü kodlar. 9. kromozom üzerine yerleşmiş olan ABL geni 11 ekzondan oluşur. Abelson Murine Lösemi Virüsünün taşıdığı v-abl geni ile homolog bir yapı gösterir. 145 kd ağırlığında bir protein üretir. ABL proteini hem sitoplazma hem de nükleus içerisinde bulunur. Normalde hücre büyümesini hem uyarır hem de inhibe eder. ABL ile indüklenen apoptoz iyonize radyasyon ve oksidatif stres gibi hücresel stres durumlarına yanıt olarak aktive olur; p53 ve p73 proteinlerinin büyümeyi durdurması ve hücre ölümünü sağlamasıyla sonuçlanır. ABL proteinin amino ucunda “cap” olarak adlandırılan bir yapı bulunur ve bu yapı ABL proteininin SH3 ve katalitik bölgelerine bağlanarak protein kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece ABL nin tirozin kinaz aktivitesi sıkı kontrol altında tutulmaktadır (Laneuville 1995; Sawyers 2002). ABL füzyon geninin sitoplazmik mRNA’sında ABL geni her zaman 2. ekzondan itibaren bulunur.

ABL geni üç adet SH bölgesine sahiptir. SH1 domaini tirozin kinaz fonksiyonuna sahip iken SH2 ve SH3 domainleri ABL proteininin diğer proteinler ile olan etkileşimini sağlar. ABL geninin SH1 bölgesi resiprokal translokasyon sonucu *BCR* geni dizilerine invaze olur. Bunun sonucunda SH1 bölgesi tirozin kinaz aktivitesi sürekli hale gelir (Deininger ve ark. 2000).

2.2.8.3. *BCR/ABL1* Füzyon Geninin Yapısı ve Proteini

KML hastalarının yaklaşık %90’lık kısmında rastlanan Philadelphia kromozomu, kromozom 9’daki ABL onkogeni ile kromozom 22’deki *BCR* gen bölgesinin t(9;22)(q34.1;q11.2) translokasyonu sonucunda oluşmaktadır (Litzow 2006).

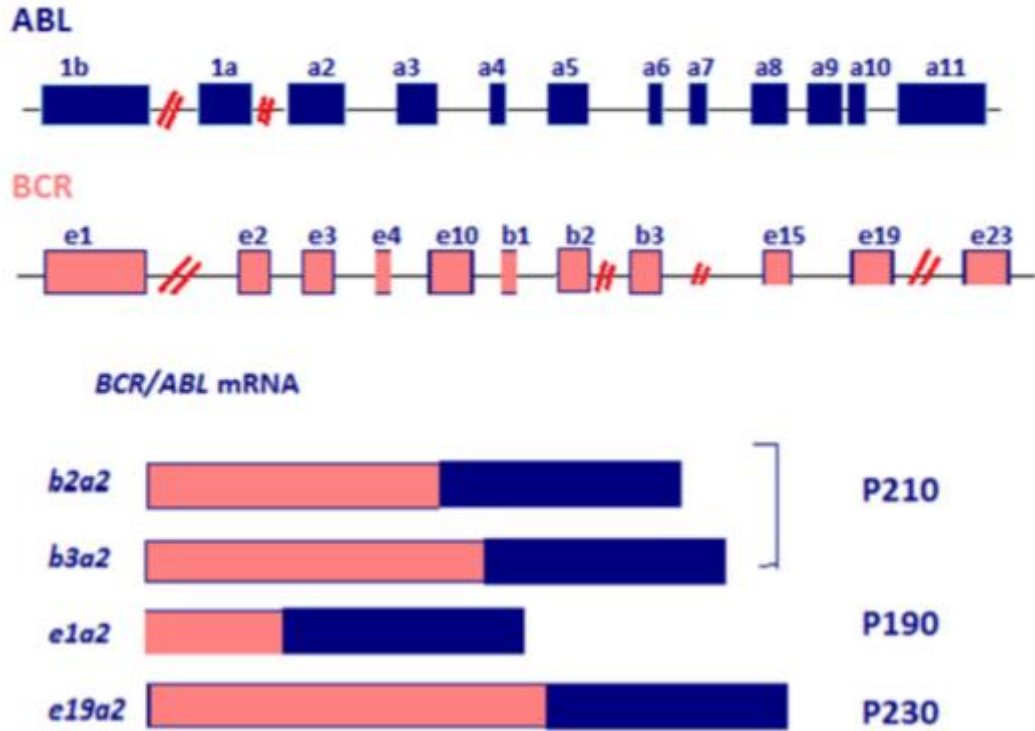
BCR/ABL1 geninin 5 ucu *BCR* den, 3 ucu *ABL* den gelen ekzonlardan oluşur. ABL geninin kırık bölgesi değişmez. ABL genindeki kırık genin 5’ ucunda 200 kb’lık bir bölgede herhangi bir yerde, a1-a2 ekzonu arasında, oluşabilir. Ancak *BCR/ABL1* mRNA transkripti, *ABL1* nereden kırılırsa kırılınsın a2 ekzonu ile başlar.

Bu durum alternatif kırılma ile düzenlenmektedir. *BCR* geninde kırık 3 ise farklı noktada olabilir. Bunlar:

1. Majör-*BCR* bölge kırıkları: Ekzon 12-13-14-15-16(b1-b2-b3-b4-b5) bölgesinde gerçekleşir. KML hastalarının %95'inde ve Ph+ ALL hastalarının yaklaşık üçte birinde kırık Majör *BCR* (*M-BCR*) denilen bölgede oluşur. Sıklıkla ya 13. ekzondan sonraki intronun 5' kısmından (e13-b2) ya da 14.ekzondan (e14-b3) sonraki intronun 3' kısmından kırılma gerçekleşir. Sonuç olarak oluşan hibrid transkript e13a2 (b2a2) ya da e14a2 (b3a2) birleşimi içerir. Her iki durumda da 210 kd ağırlığında bir füzyon proteini oluşur ve *p210BCR-ABL* olarak adlandırılır.

2. Minor-*BCR* bölgesi kırıkları: Ekzon 1 ve ekzon 2 arasında oluşur. Ph+ ALL hastalarının üçte ikisinde, KML ve AML hastalarının çok az bir kısmında 1. ekzondan hemen sonra oluşur. Sonuç olarak oluşan hibrid transkript e1a2 birleşimini içerir ve 190 kd ağırlığında *p190BCR-ABL* isimli proteini kodlar.

3. Mikro-*BCR* bölgesi kırıkları: KML olgularının çok az bir kısmında ve kronik myeloproliferatif hastalıklar sınıfından kronik nötrofilik lösemi hastalarında görülen üçüncü kırık noktası mikro *BCR* (μ -*BCR*) olarak adlandırılır ve 19. ekzondan (c3) sonra oluşur. Hibrid transkript e19a2 birleşiminden oluşur ve 230 kd ağırlığındaki *p230BCR-ABL* proteinini kodlar (Laurent ve ark. 2001).

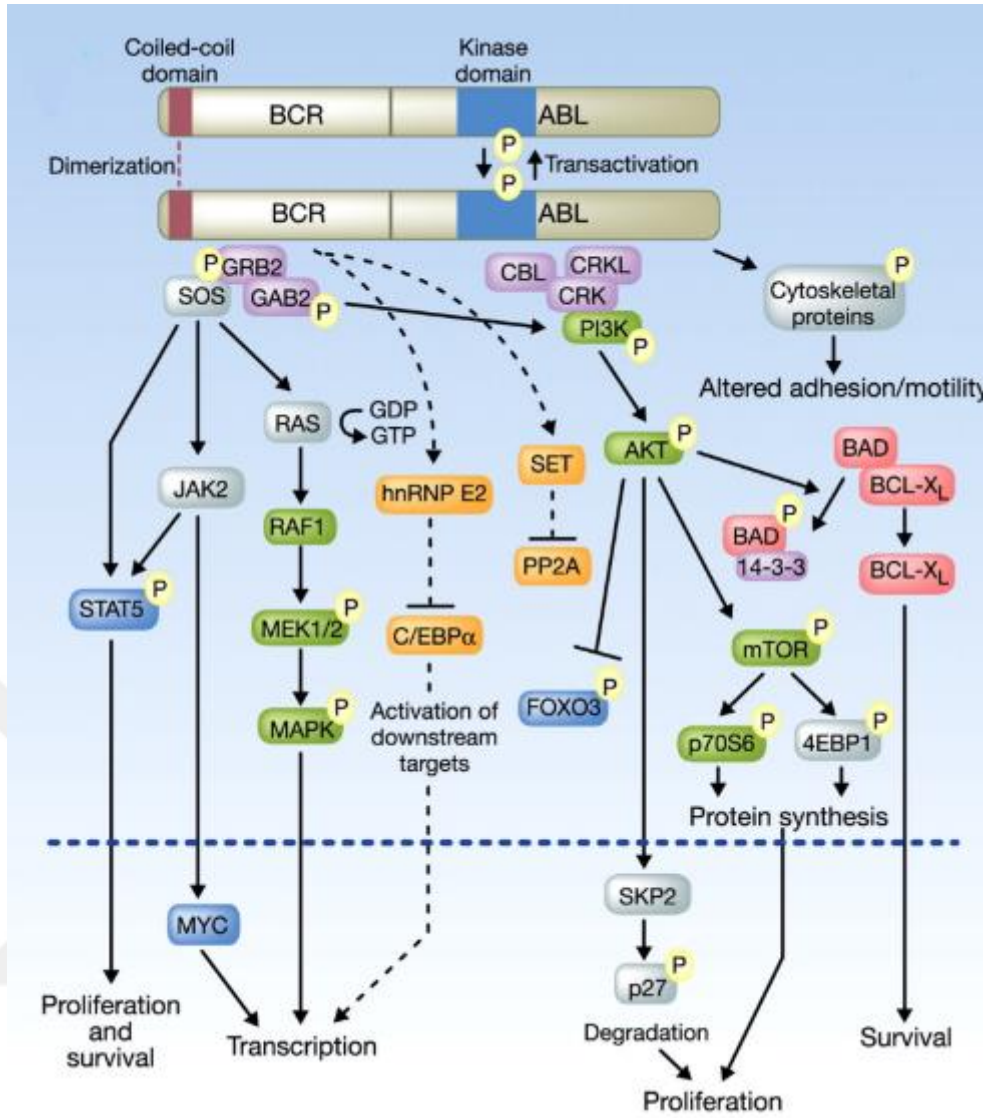


Şekil 3. *BCR* ve *ABL1* genlerinin kırılma noktaları ve füzyon transkriptlerinin şematik gösterimi (Bennour ve ark. 2015)

Kırılmanın *ABL1*'de sabit *BCR*' da ise değişken olması, *ABL* geninin sağlıklı hücreleri transformasyona uğratarak kanser hücresine dönüşmesine neden olduğunu, *BCR* geninin ise hastalığın fenotipini belirlediğini ortaya konmuştur (Deininger ve ark. 2000; Laurent ve ark. 2001).

2.2.8.4. BCR/ABL1 Füzyon Proteini ve Sinyal Yolaklarına Etkisi

BCR-ABL1 hibrid geni normal *ABL* genine göre yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip bir kimerik füzyon proteini sentezlenmesine neden olur (Savage ve Antman 2002).



Şekil 4. BCR-ABL füzyon proteininin etkilediği sinyal ara yolları (O'Hare ve ark. 2010)

Hematopoetik hücrelerde proliferasyonu indükleyen ve apoptozu engelleyen büyüme faktörleri ve sitokinlerin aktive ettiği Ras yolağı, lösemilerde önemi gösterilmiş bir sinyal iletim sistemidir. *BCR-ABL1* füzyon proteininin yapısı çoklu protein etkileşimine neden olur. Farklı sinyal yollarının uyarılmasına yol açar. *BCR* bölgesi çeşitli adaptör proteinleri bağlar ve aktive eder. Bu adaptör proteinlerden bazıları GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), CRKL (CRK-oncogen like protein), CBL (casitas b-lineage lymphoma protein) ve SHC (SRC-homology 2 containing protein) dir. GRB2' nin SH2 bölgesi *BCR-ABL1*' in BCR kısmındaki belli bir tirozin rezidüsüne (Y177) bağlanır ve bu BCR-ABL proteininin Ras' a bağlanmasını sağlar. Aktif hale dönüşen Ras, hücre zarında bir serin/treonin kinaz olan Raf molekülünü aktive eder. Daha sonra MAP/ERK kinazlar

(MEK1/MEK2) ve *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) enzim sistemlerinin arka arkaya aktive olması ile hücre nükleusunda bazı genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Okunan genler hücre bölünmesini uyarır, hücre siklusu kontrolünde rol oynayan genlerdir. Ras yolağı transformasyon için tek başına yeterli değildir. Bu yolak KML'de aynı zamanda BCL2 ailesine ait proteinlerle etkileşerek antiapoptotik etki oluşturur (Balcı 2009). BCR-ABL füzyon proteini ile etkileşen adaptör proteinler aynı zamanda fosfotidilinositol 3-kinaz(PI3K)-AKT ve JAK (janus kinase)-STAT(signal transducer and activator of transcription)sinyal yolaklarını da aktive eder. Bir sitoplazmik tirozin kinaz olan JAK aktive olmuş sitokin reseptörlerinden gelen sinyallerin hücre içine iletiminden sorumludur. BCR-ABL füzyon proteini ve bu proteinle aktive olan bazı adaptör proteinler JAK-STAT sinyal yolağının birçok üyesini fosforille ederek yolağı uyarır. KML'de hastalık başlangıcında ve progresyonunda JAK-STAT yolağının BCR-ABL füzyon proteinine bağlı anormal aktivasyonunun önemli bir rolü olduğunun bilinmesine rağmen mekanizması net olarak aydınlatılmadığı için JAK-STAT yolağı ile KML bağlantısına ilişkin çalışmalar devam etmektedir (Xie ve ark. 2001;Klejman ve ark. 2002).

PI3K/Akt sinyal yolu hücre proliferasyonu, büyümesi, sağkalımı ve migrasyonu gibi pek çok normal biyolojik prosesin düzenlenmesinde rol oynar. Bu yolakta yer alan proteinleri kodlayan genlerin mutasyonunun ya da bozulmuş (değişmiş) ekspresyonunun insan kanserlerindeki etkisi yoğun bir şekilde araştırılmış ve bu yolağın kanserde önemli bir ağ olduğu tespit edilmiştir (Luo ve ark 2003;Davies 2012).

2.2.9. Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında Tanı

2.2.9.1. Periferik Kan Bulguları

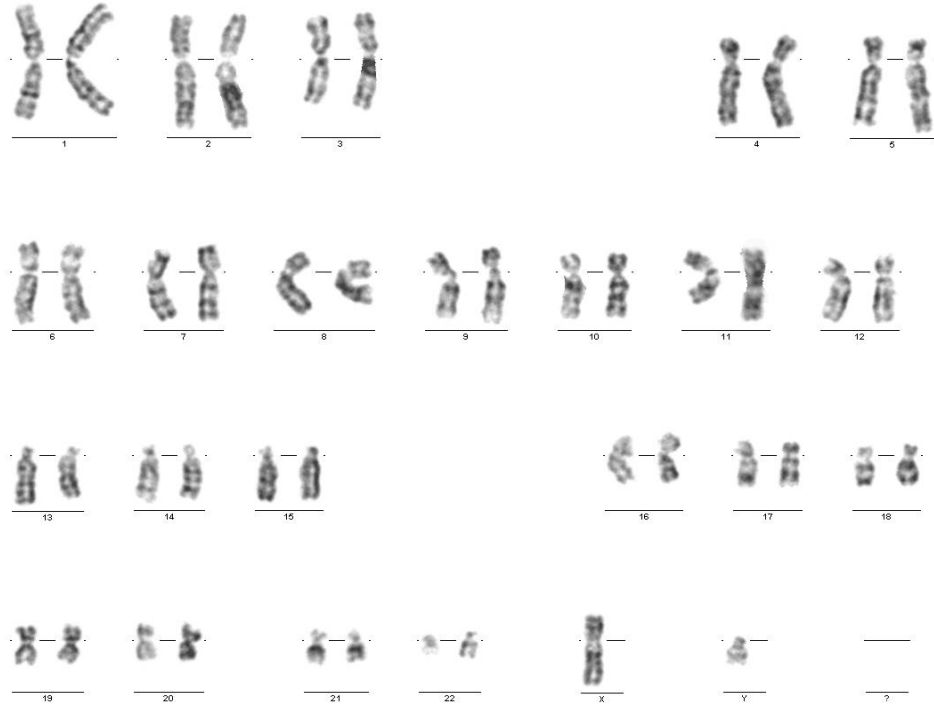
Tanı sırasında lökosit sayısı 10.000-500.000 mm³ arasında değişiklik gösterebilir. Periferik yaymada; blasttan parçalı nötrofillere kadar granülositer seri olgunlaşmasının tüm evrelerinin görülebileceği bir granülositoz mevcuttur. Miyeloblastlar tipik olarak %1-2 civarındadır, kronik fazda yer alan KML hastalarda ise %10 geçmez. Bazofiller ve eozinofiller genellikle artmıştır. Bazofili hastalığın erken döneminde lökosit sayısı artmadan önce bile tespit edilebilir. Trombositoz

sıkken, trombositopeni nadir olarak görülür. Hastaların üçte birinde hemoglobin seviyeleri 11g/dL'den azdır. KML'deki biyokimyasal anormallikler, düşük lökosit alkalen fosfataz skorunu (LAP) içerir. Ancak enfeksiyon varlığında, KML tedavisi sonrasında, akselere ve blast evrelerinde yüksek bulunabilir (Oğuz 2014).

2.2.9.2. Kemik İliği Bulguları: Konvansiyonel Sitogenetik Analiz

Kemik iliği incelemesi özellikle hastalığı diğer myeloproliferatif hastalıklardan ayırmada önem taşır. Kemik iliği belirgin hipersellüler olarak gözlenir ve bu sellülarite çoğunlukla nötrofilik prekürsörlerden oluşur. Maturasyon süreci ve morfolojisi, her evrede normal olarak görünür; ancak periferik kanda olduğu gibi myelositlerde belirgin artış göze çarpar. Myeloblastlar genellikle %5'in altındadır. Normal ilikte olduğu gibi; myeloid öncüller periosteal bölgelerde yerleşiktir. Bazofil, eozinofil ve hibrid hücreler ile bunların öncülleri de artmış olarak gözlenir. Megakaryositler tipik olarak artmıştır ve kümelenmiş halde görülür, ancak bu kümelenme esansiyel trombositozdaki gibi belirgin değildir. KML megakaryositleri normallerinden biraz küçüktür ve mikromegakaryositler saptanabilir. Hastaların üçte birinde pseudo-Gaucher hücresi adı verilen kaba granüler, periyodik-asit-Schiff-pozitif sitoplazmalı makrofajlar gözlenir. Myeloid/eritroid oranı her zaman artmış olarak saptanmakla birlikte, eritroid prekürsör sayısı artmış, azalmış ya da normal olabilir. Bazı olgularda bağ dokusu depolanması görülebilir (Rabinowitz ve Larson 2004).

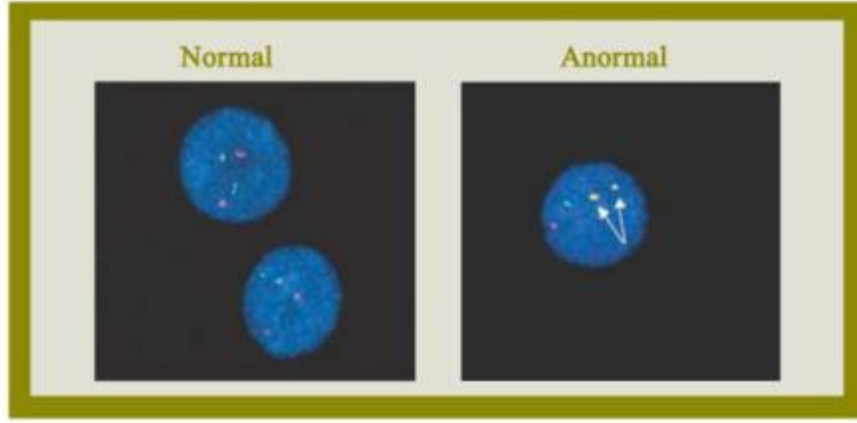
Sitogenetik analiz, Ph kromozomunun saptanması ve sürecin izlemesinde altın standarttır. Özellikle tedavi döneminde Ph negatif klonal evrimin nadiren myelodisplastik sendrom ya da akut myeloid lösemiye ilerleyebileceği, ilave oluşabilecek kromozomal anomalilerin tespit edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Karyotipleme raporu, en az 20 Ph pozitif metafaz sonucunu rapor eder. Konvansiyonel karyotiplemenin dezavantajı, hücre kültüründeki %1-5 Ph pozitif hücreleri temsil ettiği için düşük duyarlılıktır. Hücre kültürü için geçen zaman kaybının yanı sıra metafaz analizi yapılabilmesi için kaynak olarak hastadan kemik iliği aspirasyonu yapılması diğer dezavantajları arasında sayılabilir. Fakat hala altın standarttır ve en standardize tekniktir (Tohami 2012).



Şekil 5. Konvansiyonel sitogenetik analizinde t(9;22)(q34;q11) gösterimi (Meram Tıp Fakültesi arşivi)

2.2.9.3.Moleküler Sitogenetik Analiz

Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), hematolojik kanserlerde yaygın olarak kullanılan spesifik bir tekniktir. Konvansiyonel sitogenetik analiz aksine klinik kararın verilebilmesi için daha hızlı bir yöntemdir. Konvansiyonel sitogenetik analiz sonucu Ph negatif çıkan ya da hücre kültürü sonucu incelemelerde metafaz elde edilemeyen durumlarda BCR/ABL1 translokasyonunu göstermek için kullanılır. FISH, BCR/ABL1 kırılma noktalarındaki delesyonların da, imatinibe yanıt sırasında oluşabilir, tespitinde kullanılabilir. Fakat bu delesyonun varlığını doğrulayamaz. Ph kromozomunun durumunu doğrulamak için konvansiyonel sitogenetik analiz kaçınılmazdır (Tohami 2012).



Şekil 6. *BCR/ABL1* füzyon geninin Floreasan In Situ Hibridizasyon yöntemi ile gösterimi

Kompleks yeniden düzenlenmelerin gösterilebilmesi için karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, multicolor FISH gibi ek yöntemler gerekebilir.

2.2.9.4. Moleküler Analiz: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), her PCR reaksiyon döngüsü sırasında oluşan amplifikasyon ürünlerinin üretimi için floresan haberci molekülleri kullanarak monitörize eder (Bustin ve ark. 2005).

KML'de moleküler tanı, *BCR-ABL1* füzyon gen ürününün varlığının moleküler yöntemlerle araştırılmasına dayanır. RT-PCR yöntemi ile *BCR-ABL1* transkripti, komplementer DNA (cDNA) haline getirilir ve hassas bir reaksiyon ile çoğaltılır. Analiz sonucunda ürünün varlığı tespit edilirse pozitif sonuç rapor edilir. Moleküler analiz tanıda kullanılabileceği gibi, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de yüksek duyarlılığı nedeniyle tercih edilen yöntem olmuştur.

2.3. Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen

Hipofiz Tümörü Transforme Edici Gen (Pituitary Tumor Transforming Gene-PTTG) gen, sıçan hipofiz tümörü hücrelerinden 1997 yılında izole edildi. Daha sonra kardeş kromatid seperasyonunu regüle eden bir omurgalı sekürin proteini olarak tanımlandı. PTTG'nin çeşitli kanser türlerinde, hipofiz, meme, tiroid, yumurtalık, rahim, bağırsak ve akciğer, aşırı eksprese olduğu rapor edilmiştir (Tong ve Eigler 2009).

PTTG, hücre replikasyonunda, hücre siklusunda, DNA temir mekanizmasında, organ gelişiminde, metabolizmada, hücre transformasyonunda ve hücre yaşlanmasında görev alır (Tong ve Eigler 2009).

Normal insan dokusunda , PTTG protein seviyesi oldukça düşük ya da tespit edilemeyecek derece azdır.Buna rağmen , metastaz ve kötü klinik sonucu ile bağlantılı çoğu tümör tipinde yükselmiştir. Bunun için tümörgenesiz ile ilişkili görünen bir protoonkogen gibi gösterilmiştir (Liao ve ark. 2010).

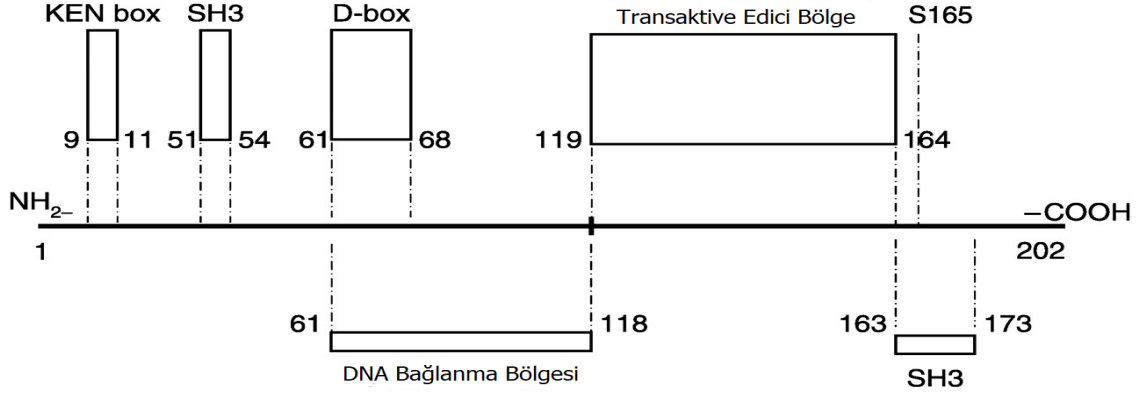
2.3.1. Yapısı ve Fonksiyonu

PTTG, 5q33.3'de bulunan ve birçok malignetin gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynadığı keşfedilen bir onkogendir (Wondergem ve ark 2012).

İnsan PTTG (hPTTG, human PTTG)'nin lokalize olduğu bölgenin myeloid lösemi, kronik miyeloproliferatif hastalıklar ve miyelodisplastik sendromlarında dahil olduğu neoplastik hastalıkların bildirildiği bir alan olduğu rapor edilmiştir (Saez ve ark. 2002).

hPTTG, bazik bir N-terminal kısmına ve asidik bir C-terminal kısmına sahip olan 202 amino asitlik proteindir (Saez ve ark. 2002). Gen ürünü bazik Fibroblast Büyüme Faktör (bFGF, basic fibroblast growth factor) ekspresyonun uyarılmasının yanı sıra, transformasyon ve tümörjenik aktivite için 2 PXXP motifini içerir (PTTG1 regulator of sister chromatid separation, securin [*Homo sapiens* (human)], Gene ID: 9232, updated on 12-May-2019)

İnsan PTTG proteininin şematik gösterimi Şekil 7'da gösterilmektedir. PTTG birkaç düzenleyici alan içerir. PTTG N-terminali SH3 alan-bağlama motifi (aa 51 ve 54 arasında), mitojen aktive edici protein kinazı (MEK) ile etkileşim için önemlidir. MAPK'nın PTTG transaktivitesi üzerindeki etkilerine aracılık etmek için PTTG – MEK etkileşimi gereklidir. PTTG transaktivite edici bölgede bir konsensüs fosforilasyon alanı içermektedir. PTTG transaktivite edici bölgenin önemi, in vitro olarak S162'de MAPK aracılığı ile fosforile edilerek gösterilmiştir. İnsandaki KEN kutusunun, PTTG degradasyonunda rol oynar (Tong ve Eigler 2009).



Şekil 7. PTTG şematik gösterimi (Tong ve Eigler 2009).

2.3.2. Onkogenez ile İlişkisi

hPTTG, NIH3T3 fibroblastlarında tümörjenik olduğu kanıtlanmış ve birçok tümörde aşırı eksprese olan 22-kDa bir proteindir. Fizyolojik koşullar altında, PTTG ekspresyonunun hücre döngüsü boyunca düzenlendiği, G2 / M fazında pik yaptığı bulunmuştur. PTTG'nin birincil fonksiyonu, kardeş kromatidlerin zıt kutuplara iğ iplikleri ile ayrılmasının kontrolü ile ilgilidir. Bu aktiviteye göre, kromozomun hatalı ayrılmasının bir sonucu olarak genomik dengesizlik, upregüle PTTG ekspresyonunun onkojenik potansiyelinin sebebinin izah edebilir. PTTG'in aşırı ekspresyonu anöploid jenerasyonu ile ilişkilidir, bu durum multiple tümör tiplerindeki farklılaşmış prognoz ile korelasyon gösterir. Ek olarak, PTTG ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) birlikte bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve tümör anjiyogenezini stimüle eder. Ayrıca, Ku-70 ile çift sarmal kırık tamirinde, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenleyen c-myc ve bax'ı harekete geçirmede bir rol oynayabilir. Dolayısıyla PTTG'nin tümörjenez için birkaç olası mekanizma olabilir (Hidalgo ve ark. 2008)

PTTG'nin aşırı ekspresyonu yumurtalık, akciğer, testis, böbrek, kolon, tiroid, hipofiz, karaciğer, böbreküstü , meme, prostat, melanom, lösemi ve lenfoma gibi birçok kanserde rapor edilmiştir (Panguluri ve Kakar 2009).

PTTG'nin bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu indüklemedeki fonksiyonunu benzerdir ve bu fonksiyon anjiyogenezi uyarır (Panguluri ve Kakar 2009).

PTTG'nin p53 ekspresyonunu etkileyerek apoptozu etkilediği tespit edilmiştir. Denemeler, PTTG'nin p53'ün varlığında veya yokluğunda apoptozu

düzenleme yeteneğine sahip olduğuna dair kesin kanıtlar sağlamıştır (Bradshaw ve Kakar 2007) p53-negatif hücreler, mikronükleus, makronükleus ve kromozomal köprülerin güçlendirilmesi gibi aneuploidi belirtileri sergiler. Bu veriler, p53'ün aktivasyonunun tam mekanizmasının anlaşılmadığını, ancak anöploidinin, PTTG'nin neden olduğu tümör oluşumuna yönelik mekanizmalardan biri olabileceğini göstermektedir (Hamid ve Kakar 2003).

PTTG'nin, pediatrik akut lenfoblastik lösemi (pALL) hücre sinyal ağında çeşitli proteinler ile etkileşime girerek multi-fonksiyonel bir regülatör olarak hizmet ettiği tespit edilmiştir (Yan ve ark. 2017).

PTTG, sekürin olarak da bilinen, normal dokularda mitotik faz sırasında hücre siklusunu düzenleyen seperaz inhibitör aktivitesine sahip bir proteindir. PTTG proteininin anafaz ilerletici kompleks tarafından degradasyonu (APC/C), metafaz – anafaz geçişi sırasında kardeş kromatidlerin separasyonu işleminin gerçekleşmesine izin verir. PTTG proteininin, hem G1 / S hem de G2 / M faz geçişlerini düzenlemede bir hücre döngüsü modülatörü olarak görev yaptığı da bilinmektedir. PTTG bir transkripsiyon faktörüdür ve aşırı eksprese olduğunda hücre siklusunu ilerleten, hücre çoğalmasını ve tümör genesizi uyaran bir onkogen gibi davranır. PTTG proteini, çeşitli invaziv tümörlerde ve hematopoetik malignitelerde bol miktarda eksprese edilirken, normal dokularda oldukça düşük seviyede ya da tespit edilemeyecek kadar az bir seviyede eksprese edilir (Chen ve ark. 2018).

3. MATERYAL VE METHOD

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı’da 2012-2014 yılları arasında KML tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edildi. KML hastalarından *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan örnekler ile tedavi sonrası *BCR/ABL1* transkripti negatifleşen örneklerin, PTTG gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. KML tanısı alan ve birbirinden farklı olan hastaların pozitif ve negatif olduğu dönemlerde izole edilmiş, -80 °C’de saklanan total RNA örneklerinden yeniden cDNA elde edilerek PTTG ekspresyonları düzeyleri değerlendirildi.

Çalışmaya cDNA aşamasından başlandı. Hastaların ilk başvurularında ve kontrollerinde konvansiyonel sitogenetik, FISH ve/veya moleküler analizler ile *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan örnekler; tedavi aşaması ve sonrası kontrollerinde konvansiyonel sitogenetik, FISH ve/veya moleküler analizler *BCR/ABL1* transkripti negatif olan örnekler bölümümüzde düzenli olarak tutulan excel kayıtlarından tespit edildi. Hasta grubunu oluşturan *BCR/ABL1* transkripti pozitif örnekler ile, kontrol grubunu oluşturan *BCR/ABL1* negatif döneme ait örnekler arasında PTTG ekspresyonu açısından anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı.

3.1. cDNA Sentez Aşaması

Transcriptor First Strant cDNA Synthesis Kiti:

İlk aşamada bir örnek için; Total RNA: 9 µl

Random Hexamer Primer: 2 µl

PCR Grade Water: 2 µl

Toplam: 13 µl eklendi.

Bu karışım Sensquest marka Thermal Cycler (Germany)’da firma önerileri doğrultusunda 65°C’de 10 dakika işleme alındı.

İkinci aşamada bir örnek için ise;

Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer: 4 µl

Protector RNase Inhibitor: 0,5 µl

Deoxynucleotide Mix: 2 µl

Transcriptor Reverse Transcriptase: 0,5 µl

Toplam tüplere dağılacak miktar: 7 µl

İlk aşamada elde edilen 13 µl total hacim üzerine 7 µl bu karışım konur. Her tüp içerisindeki hacim toplam 20 µl oldu.

Thermal Cycler'la: 25°C'de 10 dakika.

50°C'de 60 dakika

85°C'de 5 dakika işleme alındı ve cDNA'lar sentezlendi.

Örnekler gerektiğinde -20 °C'de saklandı.

3.2. Real Time PCR Aşaması

Referans Gen + Target Gen Mix Hazırlama

1 µl Primer ve Prob (Real Time Ready) + 10 µl Probe Master + 4 µl PCR Grade Water= 15 µl total hacim hazırlandı.

PCR MIX			
	Conc.	Volume	Final Conc.
PCR Grade Water	-	4 µl	-
Light Cycler 480 Probes Master	2x conc.	10 µl	1x conc.
Real time ready assay	20x conc.	1 µl	Primerler 8pmol her 4pmol UPL probu için
Total Volume		15 µl	

Her bir örnek için yukarıdaki protokole 5'er µl cDNA eklenerek ROCHE marka Light Cycler (İsviçre 2004) sistemlerinde firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki tabloda belirtilen protokolde çalışıldı.

Real Time PCR Heat Protokolü:

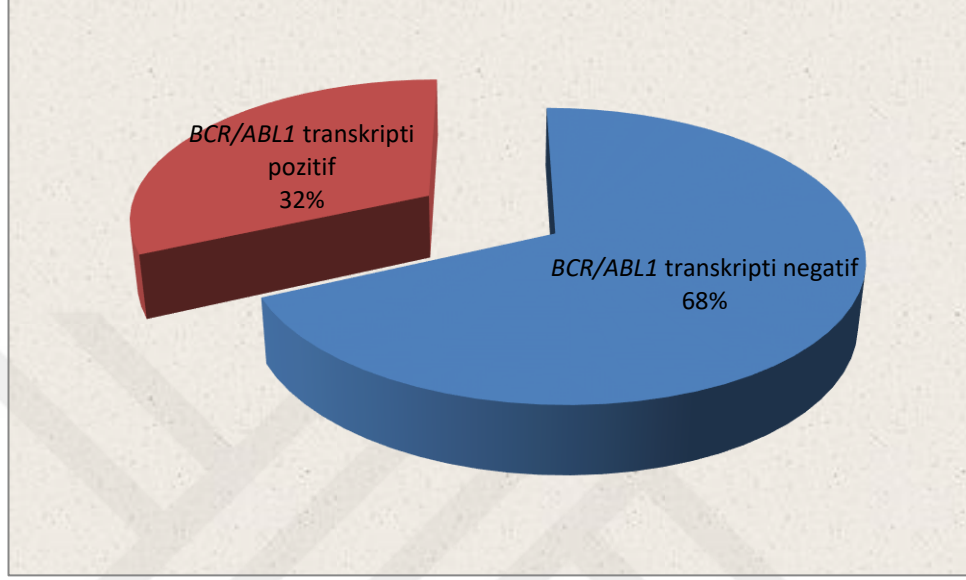
	SİKLUS	°C	ACQ.MODE	ZAMAN	RAMP RİTE
DENATURASYON	1	95°C	-	00:10:00	4,4
		95°C	-	00:00:10	4,4
AMPLİFİKASYON	45	60°C	-	00:00:30	2,2
		72°C	Tek	00:00:01	4,4
SOĞUTMA	1	40°C	-	00:01:00	2,2

3.3. İstatistiksel Analiz

BCR/ABL1 transkripti pozitif ve *BCR/ABL1* transkripti negatif iken tanı ve takip amacı ile Tıbbi Genetik Laboratuvarı'na başvurmuş ve total RNA'ları -80°C'de saklanan numuneler, PTTG gen ekspresyonu açısından değerlendirilme sürecinde ilk olarak istatistiksel paket programı olan SPSS 20.0 (Statistical Package for The Social Science) ile aktarılmıştır. *BCR/ABL1* transkripti pozitif ve *BCR/ABL1* transkripti negatif grubun PTTG gen ekspresyon değerlerinin tanımlayıcı istatistikleri en küçük, en büyük, ortalama ve standart sapma değerleri ile verilmiştir. Her iki grup için PTTG gen ekspresyon değerlerinin normallik sınaması çarpıklık-basıklık katsayıları ve Kolmogrov Simirnov ile test edilmiştir. Normal dağılıma uygun olmadığı belirlenen PTTG gen ekspresyonun pozitif ve negatif grup için ortalamaları parametrik olan bağımsız örneklem t testinin parametrik olmayan alternatifi olan Mann Whitney U ile test edilmiştir. Araştırma boyunca önem düzeyleri 0,01 ve 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma 41'i (%32) *BCR/ABL1* transkripti pozitif, 88'i (%68) *BCR/ABL1* transkripti negatif olmak üzere 129 örnek üzerinden yürütülmüştür (Şekil 8).



Şekil 8. Grupların dağılımı

BCR/ABL1 transkripti pozitif ve *BCR/ABL1* transkripti negatif örnek gruplarının PTTG gen ekspresyon değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Tanımlayıcı istatistikler

		N	En Düşük	En Yüksek	Ortalama	Standart Sapma
PTTG	<i>BCR/ABL1</i> pozitif	41	28,08	33,62	30,41	2,18
	<i>BCR/ABL1</i> negatif	88	22,44	31,76	26,48	1,75

BCR/ABL1 transkripti pozitif örneklerin en düşük PTTG gen ekspresyon değeri 28,08, en yüksek 33,62 olmak üzere ortalaması 30,41; *BCR/ABL1* transkripti negatif örneklerin en düşük PTTG gen ekspresyon değeri 22,44, en yüksek 31,76 olmak üzere ortalaması 26,48 olarak saptanmıştır. PTTG gen ekspresyon değerlerinde ortalama sapma, *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan örneklerde daha yüksek tespit edildi.

İstatistiksel analize geçmeden önce, parametrik ya da parametrik olmayan yöntemlerden hangisinin uygun olacağını belirlemek gerekmektedir. Çünkü parametrik yöntemlerin uygulanabilmesi için verilerin oransal ya da aralıklı olması, verilerin normal dağılıma uygun olması ve grup varyanslarının eşit olması varsayımlarının sağlanması gerekmektedir. Ancak veri setinde bu varsayımlarının ihlali ile karşılaşılabilir. Parametrik olmayan yöntemler genelde örneklem genişliği 30'dan az olan veri setlerinde veya parametrik varsayımlarının en az birinin sağlanmadığı durumlarda tercih edilmektedir (Kalaycı 2008).

BCR/ABL1 transkripti pozitif ve *BCR/ABL1* transkripti negatif örnek grubunun PTTG gen ekspresyon değerlerinin normallik sınaması için test olarak çarpıklık, basıklık katsayıları ve Kolmogorov Smirnov testi kullanılmış ve sonuçları Tablo 6'de verilmiştir.

Tablo 6. Normallik Sınaması

		PTTG	
		<i>BCR/ABL1</i> transkripti pozitif	<i>BCR/ABL1</i> transkripti negatif
Çarpıklık± Std. Sapma		0,441±0,169	0,826±0,257
Basıklık± Std. Sapma		-1,421±0,724	0,155±0,508
Kolmogorov Smirnov	Test istatistiği	0,214	0,108
	Sig.	0,000	0,012

Çarpıklık ve basıklık katsayıları normalliğin ya da normalden sapmanın yorumlanmasında kullanılmaktadır. Tam normal dağılımda çarpıklık ve basıklık katsayıları 0 olmaktadır. Çarpıklık katsayısı kendi standart sapmasına bölünerek ilgili önem düzeyindeki z kritik değerini aşması durumunda değişkenin normal dağılımdan uzak olduğunu göstermektedir (Kalaycı, 2008). *BCR/ABL1* transkripti negatif olan gruptaki PTTG gen ekspresyon değerleri için bu değer $0,826/0,257=3,21$, *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan gruptaki için $0,441/0,169=2,61$ olup %5 anlamlılık düzeyinde z kritik değeri 1,96'dan büyük olduğundan grupların *BCR/ABL1* değerlerinin normal dağılımdan uzaklaştığı söylenebilmektedir. Kolmogorov-Smirnov testinde "H₀: PTTG gen ekspresyon değerleri normal ya da normale yakın dağılım göstermektedir." yokluk hipotezi test edilmiş ve yokluk hipotezinin hem hasta hem de kontrol grubu için %95 güvenle ret edildiği gözlenmiştir (Sig.=0,012<0,05,

Sig.=0,000<0,05). Normallik varsayımı ihlal edildiğinden istatistiksel analizde parametrik olmayan yöntemin kullanılması uygun görülmüştür.

Kan örneği *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken alınan örnek grubu ile *BCR/ABL1* transkripti negatif iken alınan örnek grubunun PTTG gen ekspresyonu değerlerinin farklılaşmasını sınamak için parametrik olmayan yöntemlerden Mann Whitney U testi kullanılmış ve sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Mann Whitney U Sonuçları

			Ranklar			Test İstatistikleri		
Grup	N	Ortalama	Ortalama Rank	Ranklar Toplamı	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Sig.
<i>BCR/ABL1</i> transkripti pozitif	41	30,41	101,27	4152,00	317,00	4233,00	-7,521	0,000
<i>BCR/ABL1</i> transkripti negatif	88	26,48	48,10	4233,00				

“Ho: *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan grup ile *BCR/ABL1* transkripti negatif olan grubun PTTG ekspresyonu değerleri arasında fark yoktur.” Yokluk hipotezinin testine ilişkin Mann Whitney U sonuçlarına göre, yokluk hipotezi Sig.=0,000< 0,01 olduğu için ret edilmiştir. Yani *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken alınan örnek ile *BCR/ABL1* transkripti negatif iken alınan örnek arasında PTTG gen ekspresyonu açısından %99 güvenle istatistiksel olarak fark vardır. Ortalama ve ortalama rank değerleri incelendiğinde, *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken alınan örnek grubunun PTTG gen ekspresyonu değerleri, *BCR/ABL1* transkripti negatif iken alınan örnek grubunun PTTG gen ekspresyonu değerlerinden daha yüksektir.

5. TARTIŞMA

İnsan Myeloid Lösemi, myeloid blast proliferasyonunu arttıran, kendi kendine yenilenmelerini teşvik eden ya da hematopoetik farklılaşmayı bloklayan genetik mutasyonlar tarafından karakterize edilen yüksek oranda heterojen neoplazidir.(Rowley 2008). 9. ve 22. kromozomlar arasında gerçekleşen translokasyon sonucu ortaya çıkan *BCR/ABL1* füzyon geni, KML patogenezinin başlıca sorumlusudur. *BCR/ABL1* füzyon genini tespitinde kullanılan genetik analizler, hastaların tanı ve takibinde etkin olarak kullanılmaktadır. Klinik göstergeler ve rutin laboratuvar testleri hastanın prognozu hakkında bilgi verse de, genetik değişiklikler hastanın uzun süre hayatta kalması ve tam remisyonun başarısı için dikkat edilmesi gereken en önemli göstergelerdir.

PTTG, memeli sekürin dizini, metafaz sırasında kardeş kromatitlerinin seperasyonunu düzenleyen, iğ ipliklerinin kontrol noktasının bir komponentidir (Zou ve ark. 1999) PTTG, onkogen özellikleri sergiler ve hücre döngüsünün ilerlemesini kolaylaştırır (Pei ve Melmed, 1997; Zhang ve arkadaşları, 1999). PTTG'nin aşırı ekspresyonu, in vitro hücre transformasyonuna neden olur (Yu ve ark. 2003), nude farelerde tümör oluşumunu teşvik eder ve anjiyogenezi aktive eder (Heaney ve Melmed 1999;Ishikawa ve ark. 2001). İn vitro hücre transformasyonuna neden olan PTTG'nin aşırı ekspresyonu, in vivo tümör formasyonu ve bFGF ekspresyonunu stimüle ettiği bildirilmiştir (Yan ve ark. 2017).

İlk olarak hipofiz tümör hücrelerinden izole edilen PTTG, hipofiz, meme, tiroid, endometriyal, özofageal ve kolorektal tümörlerde bol miktarda eksprese edilir ve PTTG ekspresyon düzeyleri, tümör invazivliği, nüksetme ve kötü prognoz ile eş anlamlıdır (Vlotides ve ark. 2007). Yüksek eksprese edilen PTTG'nin birçok tümör tipinde metastaz, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Liao ve ark.2012;Noll ve ark. 2015).

PTTG proteini, deneysel olarak östrojen ile uyarılmış hipofiz tümörlerinde erken indüklenir (Heaney ve ark. 1999). Transgenik hipofiz hedefli PTTG'nin aşırı ekspresyonu fokal hipofiz hiperplazisi ve adenom oluşumu ile sonuçlanması gibi hipofiz tümörögenesisi için PTTG gereklidir.

PTTG, hematolojik malignansilerin biri olan pALL gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. PTTG, hücre sinyal ağında çeşitli proteinlerin etkileşiminde multifonksiyonel regülatör olarak hizmet etmektedir. pALL'de SH3 içeren proteinlerin bir çeşidi tarafından tanımlanabilen iki adet SH3 bağlayıcı peptid motifine sahiptir. PTTG fosforilasyonunda MAP3K ve PI3K gibi protein kinazların etkili olduğu; düzenleyici modül olarak fonksiyon gösteren bir non-katalitik SH3 domaini içerdiği belirtilmiştir (Yan ve ark. 2017).

Bu genin normal periferik kan lökositlerinde gözlenen düşük ekspresyonundan dolayı normal T lenfositlerde, Jurkat T hücrelerinde ve sağlıklı donörlerde, lösemili veya diğer hematopoetik neoplastik rahatsızlıklardan gelen numunelerde ekspresyonu incelenmiştir. Veriler, hPTTG'nin yalnızca Jurkat hücrelerinde değil aynı zamanda incelenen primer tümörlerin yüksek bir kısmında aşırı eksprese edildiğini ve bunun hücre kültürünün bir eseri olmadığını gösterir. Bu sonuçlar, lösemik hücrelerde hPTTG'nin anormal ifade edildiğini ve bu genin lökomogenezde yer aldığını gösterir (Domínguez ve ark. 1998)

Kritik kanser genlerinin çoğu, vücutta hücrenin sosyal davranışlarını; hücre içi sinyal iletimi ile bölünme, farklılaşma ya da ölüme giden mekanizmaları düzenleyen yolların bileşenlerini kodlamaktadır. BCR/ABL1 füzyon geni de hücre çoğalması, anti-apoptosis, hücre göçü ve benzersiz metabolizma gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler. *BCR-ABL1* mitojenle aktive olan protein kinaz (RAS/MAPK), Fosfoinozid 3- Kinaz (PI-3 kinaz), Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) ve onkogenik protein (Src yolağı) gibi hücre içi sinyal yollarını aktifleştirir. Ras yolağının aktifleşmesinde GAB2, GRB2, Ras aktivatörü olan Son of sevenless (Sos) ve BCR-ABL'in SH2-SH3 adaptörü gibi birçok aracı molekül görev yapar. Aktifleşen RAS yolağı, hücre zarında bulunan bir serin/treonin kinaz olan Ref molekülünün aktivasyonu sağlayarak MAP/ERK kinazlar ve MAPK'ların aktivasyonu gerçekleştirerek transkripsiyonu artırır. *BCR/ABL1* aracılı transformasyonda ve proliferasyonda Akt'ın hücrelerde ikincil haberci sistemini uyardığı, büyüme ve sağ kalımda görev yaptığı, RAC'ın (adhezyon sinyallerini yanıtlayan GTP bağlayıcı protein) motilitede görevli olduğu, PI3K yolağının da protein sentezini artırma görevi olan S6 kinaz ve RAS yolağı ile etkileşebildiği bildirilmiştir.

Anafazı ilerletici kompleks (APC), Cdc20/Cdh1 ile birlikte, mitotik hücre döngüsü kontrolünde kritik bir öneme sahip, mitoz düzenleyici proteinlerinin degradasyonu sağlayan bir ubiquitin ligazıdır. APC aktivitesi hücre döngüsü boyunca Cdc-20 ve Kadherin-1 (Cdh1) adaptör (aktivatör) tarafından kontrol edilir. Bu adaptörlerin ekspresyonunda meydana gelen anomalilerin genomik stabiliteyi etkilediği ve kanserin progresyonuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Hücre döngüsünün metafaz aşamasında kardeş kromatidlerin erken ayrılmasını önlemek için kohesin kompleksi görev yapar. Anafazın başında ise seperaz enzimi kohesini yıkar, bu da metafazdan anafaza geçişi gerçekleşir. PTTG, seperaza bağlanarak bu fonksiyonunu baskılar. PTTG'nin APC tarafından yıkılması, seperazın aktif hale dönüşmesini ve kardeş kromatidlerin ayrılmasını sağlar. PTTG'nin normal düzeylerinde ortaya çıkacak bir değişiklik kromatit segregasyonunu bozarak bölünmeden sonra oluşacak hücrelerde anöploidiye ve kromozom anomalilerine yol açacaktır. İnsan malign tümör hücreleri incelendiğinde, malign hücre hatlarında PTTG geninin ekspresyonu yüksek bulunmuştur. APC'nin adaptör proteinlerinde meydana gelebilecek farklılıklar, PTTG'nin APC tarafından yıkılmasını engelleyerek hücre içindeki artışının sebebi olabilir. Son yapılan çalışmalar *BCR/ABL1* füzyon geni PI3K aracılığı ile Cdh1'in substratı olan Skp2' ekspresyonunu indüklediğini ve böylece P27'nin degradasyonu ve G1-S hücre döngüsü geçişi sağladığı gösterilmiştir.

Wang ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada , Ph pozitif ALL ile Ph negatif ALL arasında PTTG ekspresyonunu değerlendirmiş; Ph pozitif ALL'de PTTG'nin aşırı eksprese olduğunu tespit etmişlerdir. PTTG'nin aşırı ifadesinin, Ph pozitif ALL ilerlemesi ve ortaya çıkması ile yakından ilişkili olabileceğini sonucuna varmışlardır. Bu yaklaşım ALL'nin patogenezi ve tedavisini araştırmak için yeni fikirler sunabilir.

Wang ve ark. (2010) AML'nin alt tipleri arasındaki PTTG ekspresyonunun farklılığını incelemiştir. 47 AML hastasından ve 28 normal kontrol grubundan kemik iliğinde RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. AML olan hastaların PTTG gen ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışma, KML hastalarında *BCR/ABL1* transkriptinin pozitif olduğu dönem ile *BCR/ABL1* transkriptinin negatif olduğu dönem arasında PTTG ekspresyonu açısından anlamlı fark olup olmadığını gözlemlemek amacıyla yapıldı. Bunun için

2012 ile 2014 yılları arasında KML tanısı alan ve Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda mevcut olan -80 °C'de total RNA'ları saklanan 129 örnek üzerinden değerlendirme yapıldı. Bu örneklerin 41'inin *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken, 88'inin *BCR/ABL1* transkripti negatifti. "Ho: *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan grup ile *BCR/ABL1* transkripti negatif olan grubun PTTG ekspresyonu değerleri arasında fark yoktur." yokluk hipotezinin testine ilişkin Mann Whitney U sonuçlarına göre, yokluk hipotezi Sig.=0,000< 0,01 olduğu için ret edilmiştir. Yani *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken alınan örnek ile *BCR/ABL1* transkripti negatif iken alınan örnek arasında PTTG gen ekspresyonu açısından %99 güvenle istatistiksel olarak fark vardır. Ortalama ve ortalama rank değerleri incelendiğinde, *BCR/ABL1* transkripti pozitif iken alınan örnek grubunun PTTG ekspresyon değerleri, *BCR/ABL1* transkripti negatif iken alınan örnek grubunun PTTG ekspresyon değerlerinden daha yüksektir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, KML'de *BCR/ABL1* transkripti pozitif olan örneklerin PTTG ekspresyonunun, *BCR/ABL1* transkripti negatif olan KML hastalarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu tarafımızca tespit edildi. Bu gen, daha önce birçok hematolojik malignanside çalışılmış olmasına rağmen KML'de çalışmasına literatürde rastlanmadı. Wang ve ark.'nın daha önce yaptığı çalışmalarda, ALL ve AML ekspresyonunun, bizim sonucumuz ile korele olduğu görüldü. PTTG'nin KML etiolojisinde önem arzettiği kanısına varılmıştır. Bu yaklaşım KML'nin patogenezi ve tedavisini araştırmak için yeni fikirler sunabilir.

BCR/ABL1 füzyon geni ile PTTG'nin yollarının kesiştiği mekanizmaların varlığı literatürde yer almaya başlanmıştır. Çalışmalar arttıkça KML'de PTTG'nin rolü daha net anlaşılacaktır.

7.KAYNAKLAR

- Aladağ E, Haznedaroğlu İC. Current perspectives for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Turk J Med Sci.* 2019 Feb 11;49(1):1-10. doi: 10.3906/sag-1810-81.
- Alp HS. Kronik Myeloid Lösemi Tanılı Olgularda İmatinib Tedavi Sonuçları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2011(Tez Danışmanı: Prof. Dr. Teoman Soysal).
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391-405.
- Balcı BT. İlaç Direnci Gelişen Kronik Myeloid Lösemi Olgularında BCR-ABL1 T3151 Mutasyonları ve AHI1 Gen İfadeleme Düzeylerinin Belirlenmesi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi , Ankara, 2009 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Feride İffet Şahin).
- Ballarini F, Ottolenghi A. A model of chromosome aberration induction and chronic myeloid leukaemia incidence at low doses. *Radiat Environ Biophys.* 2004 Sep;43(3):165-71.
- Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Jan;97:263-74. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.020. Epub 2015 Aug 29.
- Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood* 86(8): 3118-3122, 1995.
- Bradshaw C, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene: an important gene in normal cellular functions and tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2007 Feb;22(2):219-26. doi: 10.14670/HH-22.219.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective *J Mol Endocrinol.* 2005 Jun;34(3):597-601.
- Chen PY, Tien HJ, Chen SF, Horng CT, Tang HL, Jung HL, Wu MJ, Yen JH. Response of Myeloid Leukemia Cells to Luteolin is Modulated by Differentially Expressed Pituitary Tumor-Transforming Gene 1 (PTTG1) Oncoprotein. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 12;19(4).
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247(4944): 824-828, 1990.
- Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* 2012 Mar-Apr;18(2):142-7
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3343-56.
- Domínguez A, Ramos-Morales F, Romero F, Rios RM, Dreyfus F, Tortolero M, Pintor-Toro JA. hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene.* 1998 Oct 29;17(17):2187-93.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344(14): 1031-1037, 2001.
- Goldman, J, Melo JV. BCR-ABL in Chronic Myelogenous Leukemia – How Does It Work? *Acta Haematologica,* 2008;119(4):212-7.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984 Jan;36(1):93-9.
- Guyton AC, Hall JE. Blood Cells, Immunity and Blood Clotting. *Textbook of Medical Physiology.* Eds: Guyton AC, Hall JE. Saunders Company. 2000, 10th Edition, ABD, p:382-401.

- Hamid T, Kakar SS. PTTG and cancer, *Histol Histopathol.* 2003 Jan;18(1):245-51.
- Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med.* 1999 Nov;5(11):1317-21.
- Heaney AP, Melmed S. Pituitary tumour transforming gene: a novel factor in tumour formation. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;13(3):367-80.
- Hidalgo M, Galan JJ, Sáez C, Ferrero E, Castilla C, Ramirez-Lorca R, Pelaez P, Ruiz A, Japón MA, Royo JL., Methylation alterations are not a major cause of PTTG1 misregulation, *BMC Cancer.* 2008 Apr 21;8:110.
- Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):867-74.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring and management. In *ASH Education Program Book 2014*;89:547-556.
- Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2002;107(2):76-94.
- Kalaycı Ş. SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri. Eds: Doç. Dr. Şeref Kalaycı. Asil Yayın Dağıtım, 2008, Ankara.
- Kaleem B, Shahab S, Ahmed N, Shamsi TS. Chronic Myeloid Leukemia--Prognostic Value of Mutations. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(17):7415-23.
- Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med.* 2006 Dec 19;145(12):913-23.
- Kara AV. Tirozin Kinaz İnhibitörü Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında Tedavi Etkinliğinin ve Prognozun Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2010 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Salih Aksu).
- Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Wilson M, Smithgall TE, Skorski T. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* 2002 Nov 1;21(21):5766-74.
- Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in Immunology. Semin Immunol.* 1995 Aug;7(4):255-66.
- Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-Positive Leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2343-55.
- Liao LJ, Hsu YH, Yu CH, Chiang CP, Jhan JR, Chang LC, Lin JJ, Lou PJ. Association of pituitary tumor transforming gene expression with early oral tumorigenesis and malignant progression of precancerous lesions. *Head Neck.* 2011 May;33(5):719-26.
- Liao YC, Ruan JW, Lua I, Li MH, Chen WL, Wang JR, Kao RH, Chen JH. Overexpressed hPTTG1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by regulating GEF-H1/RhoA signalling. *Oncogene.* 2012 Jun 21;31(25):3086-97.
- Litzow M. Imatinib Resistance, Obstacles and Opportunities. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 May;130(5):669-79.
- Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell.* 2003 Oct;4(4):257-62.
- Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004 Jun;18(3):545-68, vii-viii.
- Noll JE, Vandyke K, Hewett DR, Mrozik KM, Bala RJ, Williams SA, Kok CH, Zannettino AC. PTTG1 expression is associated with hyperproliferative disease and poor prognosis in multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2015 Oct 6;8:106.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960.

- Oğuz E. Aktivasyonla İndüklenen Sitidin Deaminazın Gen Ekspresyon Düzeyi ile Kronik Myeloid Löseminin Progresyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Akif Selim Yavuz).
- O'Hare T, Deininger MW, Eide CA, Clackson T, Druker BJ. Targeting the BCR/ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome positive leukemia. *Clin Cancer Res.* 2011 Jan 15;17(2):212-21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3314. Epub 2010 Nov 22.
- Panguluri SK, Kakar SS. Effect of PTTG on endogenous gene expression in HEK 293 cells, *BMC Genomics.* 2009 Dec 3;10:577.
- Passamonti F, Maffioli M. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 Dec 2;2016(1):534-542.
- Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1997 Apr;11(4):433-41.
- Rabinowitz I, Larson RS. Chronic Myeloid Leukemia. *Wintrobe's Clinical Hematology* Eds: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Lippincott Williams & Wilkins.2004, 11th Edition Vol. 2, Philadelphia, p:2235-2258.
- Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2183-9.
- Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(4): 237-242.
- Sáez C, Pereda T, Borrero JJ, Espina A, Romero F, Tortolero M, Pintor-Toro JA, Segura DI, Japón MA. Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias, *Oncogene.* 2002 Nov 21;21(53):8173-7.
- Savage DG, Antman KH. Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *N Engl J Med.* 2002 Feb 28;346(9):683-93.
- Sawyers CL. Disabling Abl—Perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2002 Feb;1(1):13-5.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985 Jun 13-19;315(6020):550-4.
- Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*2003;200-224.
- Syed NN, Usman M, Adil S, Khurshid M. Additional Chromosomal Abnormalities in Philadelphia-Positive Chronic Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2008 Jul-Sep;1(3):166-170.
- Thapa B, Rogers HJ. Cancer, Myeloproliferative Neoplasms. 2019 May 18.
- Tohami T, Nagler A, Amariglio N.,Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia, *Isr Med Assoc J.* 2012 Aug;14(8):501-7.
- Tong Y, Eigler T. Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol.* 2009 Nov;43(5):179-85.
- Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev.* 2007 Apr;28(2):165-86.
- Yan T, Shi X, Fu J. Identification of peptide-mediated interactions between human PTTG and SH3 domains in pALL gene expression profile. *J Mol Graph Model.*2017 Sep;76:11-16.
- Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology.*2003 Nov;144(11):4991-8.
- Xie S, Wang Y, Liu J, Sun T, Wilson MB, Smithgall TE, Arlinghaus RB. Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene.* 2001 Sep 27;20(43):6188-95.
- Wang Z, Lu QY, Niu XQ, Zhang P, Zhao JN, Zhang KJ, Li P, Hu JS. Expression of pituitary tumor transforming gene in patients with AML. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010 Dec;18(6):1427-30.

Wang Z, Lu QY, Niu XQ, Zhang P, Zhang KJ. Expression of pituitary tumor transforming gene in patients with acute lymphoblastic leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2013 Aug;21(4):835-8.

Wongergem B, Zhang Z, Huang D, Ong CK, Koeman J, Hof DV, Petillo D, Ooi A, Anema J, Lane B, Kahnoski RJ, Furge KA, Teh BT. Expression of the PTTG1 Oncogene Is Associated with Aggressive Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *Cancer Res*. 2012 Sep 1;72(17):4361-71.

Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):761-7.

Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*. 1999 Jul 16;285(5426):418-22.

PTTG1 regulator of sister chromatid separation, securin [*Homo sapiens* (human)], Gene ID: 9232, updated on 12-May-2019

https://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/project_info/index_eng.html

https://slideplayer.biz.tr/slide/12065739/https://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/project_info/index_eng.html

8.ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Merve GENÇER ÇELİKEL

Doğum Tarihi:01.08.1986

E-mail: mervegencercelikel@gmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2004-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Genetik AD	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2011-2019