

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLAZMA HÜCRE FARKLILAŞMASI GÖSTEREN DÜŞÜK DERECELİ
B HÜCRELİ LENFOMALARDA MYD88 L265P
MUTASYONUNUN DAĞILIMI

Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

Ağustos
2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLAZMA HÜCRE FARKLILAŞMASI GÖSTEREN DÜŞÜK DERECELİ
B HÜCRELİ LENFOMALARDA MYD88 L265P
MUTASYONUNUN DAĞILIMI

Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Işınsu KUZU

Ağustos
2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

ONAY

Prof. Dr. Işınsu KUZU danışmanlığında Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH tarafından hazırlanan bu çalışma 07.08.2015 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Işınsu KUZU

İmza:

Üye: Yrd. Doç.Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PLAZMA HÜCRE FARKLILAŞMASI GÖSTEREN DÜŞÜK DERECELİ B HÜCRELİ LENFOMALARDA MYD88 L265P MUTASYONUNUN DAĞILIMI

Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Işımsu KUZU

MYD88 L265P nokta mutasyonu olan ~%90 Lenfoplazmasitik Lenfoma (LpL)/Waldenström Makroglobulinemi (WM) ve/veya tanı olarak belirsiz immünoglobulin M (IgM) monoklonal gamopati vakalarda (MGUS) bildirilmiştir. Bu mutasyon LpL/WM için spesifik olmamakla birlikte diğer laboratuvar ve klinik verilerle rutin uygulamalarda ayırıcı tanıda kullanılabilir. İncelenen numune içinde neoplastik hücrelerin miktarı kullanılan inceleme yöntemi bu mutasyonun saptanmasını etkilemektedir. Mutasyon saptanması ile ilgili başka bir sorun patolojik inceleme materyalinde formalin etkisi ile DNA parçalanması olabilmektedir. Farklı yöntemler mutasyon analizi için kullanılabilir. DNA dizileme metodu kullanıldığında allel yükü %20-30 daha az ise mutasyonu kaçırma olasılığı mümkündür. RT-PCR yöntemi daha duyarlı ve %1 sınırı içinde hedef nokta mutasyonları tarama özelliği vardır. Bu çalışmada amacımız, plazma hücre farklılaşması gösteren B hücreli lenfomalarda MYD88 mutasyon dağılımı, mutasyona tespiti için kullanılan arşiv preparatlarda DNA kalitesi ve doku tespit işlemlerin etkisini incelenmiştir. RT-PCR ve dizi analizleri sonuçlarını karşılaştırarak, %70 oranda RT-PCR pozitif vakalarda dizi analizi yöntemiyle yakalamak mümkün olmamıştır. MYD88 (L265P) mutasyonu (%91) 11/12 WM, (%27) 3/11 NMZL ve (%20) 2/10MZL NOS ve (%10) 2/19 SMZL hastada ile saptanmıştır. İki yöntem arasındaki mutasyon tespit farkı bulunmasının en önemli nedenlerinin DNA konsantrasyonu ($p=0.034$) ve kullanılan materyal türü (FFP/Yayma) ($p=0.008$) bulunmuştur. Bu çalışmada tümör yükü mutasyon tespiti başarısı için bağımsız bir faktör olarak bulunmamıştır. Yapılan çalışmanın sonuçlarını kullanarak güvenilir mutasyon sonuçları içindaha hassas yöntemlerin seçilmesi ve patolojik materyalin tesbit işleminin en önemli faktörler olduğu anlaşılmıştır.

2015, 89sayfa

Anahtar kelimeler: Düşük dereceli B Hücre Lenfomalar, DNA dizi analizi, RT-PCR

ABSTRACT

MScThesis

MYD88 L265P MUTATION DISTRIBUTION IN PLASMA CELL DIFFERENTIATION IN LOW GRADE B-CELL LYMPHOMA

Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor

Prof. Dr. Işınsu KUZU

MYD88 L265P single amino-acid mutation has been reported in ~90% of Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström's Macroglobulinemia (LPL/WM) and /or immunoglobulin M (IgM) monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS). Although this mutation is not specific for LPL/WM, it can be used for differential diagnosis with the other laboratory and clinical data on routine practice considering the sensitivity of detection methods. One problem effects the sensitivity is the amount of the neoplastic cells within the available sample. The other problem is the DNA fragmentation or quality which is effected by the formalin fixation of the tissues. Different methods can be performed for mutation analysis. Sanger sequencing could miss the mutation if the allele burden status is less than 20-30%. Allele specific real time PCR is more sensitive and can target safely point mutations within the limit of 1%. Our aim in this study is to see the distribution of MYD88 mutation in indolent B cell lymphoma with plasma cell differentiation in our series and also the effect of fixation and DNA quality for detecting the mutation in our archives material. We performed to compare the results of RT-PCR and DNA sequence analysis. MYD88 mutation detection was not possible by DNA sequence analysis for 70% of RT-PCR positive cases. MYD88 (L265P) was detected in (91%) 11/12 patients with WM, (27%) 3/11 NMZL and (20%) 2/10 MZL NOS and (10%) 2/19 SMZL. The most significant factors effect the difference of mutation detection between two methods are DNA concentration ($p=0.034$) and type of material (FFP/Aspiration) ($p=0.008$). we could not demonstrate the tumor burden status as an independent factor for the success in mutation detection. Our results confirmed that using more sensitive methods and protected pathological material are the most important factors for reliable mutation results.

2015, 89pages

Keywords: Low grade B Cell lymphoma, DNA sequencing analysis, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Mesleğimin ayrıntılarını öğrenmek için başladığım mastır eğitimimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Hayata ve bilime bakış açımı değiştiren bu süreçte, çok şey öğrendim ve tabiri caizse büyüdüm. Zaman zaman motivasyonum eksilere doğru kaysa da yaptığım işten her daim büyük keyif aldım. Bu tezle bilime katkım, belki binlik puzzle'ın tek bir parçasının bir zerresi bile değilse de hayatımın en doğru işini yaptığımı hissetme nedenimdir.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her türlü imkânı sağlayan, her zaman sabır ve hoşgörü ile yol gösteren, ne kadar yoğun olursa olsun değerli vaktini ayıran, öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam, danışmanım Prof. Dr. Işınso Kuzu'ya,

Laboratuvar bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Dr. Yasemin ŞAHİN'e, Uzm. Bio. Öznur ÇOŞKUN'a, Uzm. Bio. Şenay BOYACIGİL'a ve Bio. Cennet CAN SİNUP'a,

Çalışmalarda destek olan değerli Dr. Hale KİVRAK'a

Tezimin istatistik analizini gerçekleştirmesinden dolayı araştırma görevlisi Can ATEŞ'e (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi), yüksek lisans eğitime boyunca, tez resmi yazışmalarımnda emeği geçen Asuman ERZİNCAN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)

Yanımda bulunup, aramızda kilometreler de olsa yardımlarını esirgemeyip benimle beraber bu yolu yürüten Shabnam REZAPOUR, anne ve babamın bu güzel yolda yürürken yanımda olup desteklerini her an hissettirdikleri için canı gönülden haklarımı bir nebze ödeme adına bilimsel yolda attığım bu adımla

TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM.

Bu tezin yazarı olarak mastır eğitimim boyunca edindiğim bilgi ve birikimi, algılarım dâhilinde sizlere aktarmaya çalıştım. Bu birikimle bu sayfadan aşağı doğru uzayıp giden binlerce satır bulacaksınız. O satırların hepsi binlerce insanın binlerce yıllık çalışmaları sonucunda bir araya toplandı ve sizlere sunuldu. Binlerce yıl sonra da en azından binlerce yıl önce yaşayanların bildikleri olarak burada kalacaklar.

SEVGİLİ ANNEM ve BABAM İÇİN.....

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanserin Moleküler Nedenleri.....	5
2.2. Lenf Kanseri	6
2.2.1. lenfoma İstatistik Özellikleri.....	9
2.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma.....	9
2.3. B Lenfosit Hücrelerin Gelişimi	11
2.4. Lenfoplazmasitik Lenfoma (LPL)/Waldenström Makroglobulinemi (WM)	14
2.5. Marjinal Zon Lenfoma (MZL)	16
2.6. MYD88 Geni ve Özellikleri	17
2.6.1. MYD88 Geninin Konumu ve Yapısı.....	17
2.6.2. Toll Benzeri Reseptörler (TLR) Yolağı.....	19
2.7. MYD88 Mutasyon Tarama Yöntemleri ve Materyal	25
2.7.1. DNA Dizi Analizi Yöntemi.....	25
2.7.2. Kantitatif Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR (RT-PCR)).....	28
2.7.3. Materyal Özellikleri.....	32
3. GEREKCE ve AMAC	33
4. MATERYAL ve YÖNTEM	35
4.1. Materyal	35
4.2. Yöntem	35
4.2.1. DNA İzolasyonu.....	36
4.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini.....	37
4.2.3. Kalite Kontrol (size ladder) PCR.....	37
4.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	38

4.2.5. MYD88 Mutasyon Analiz Yöntemleri	39
4.2.5.1. Otomatik DNA Dizi Analizi	39
4.2.5.1.1. PCR Reaksiyonu	40
4.2.5.1.2. PCR Exosap-IT Pürifikasyonu	41
4.2.5.1.3. Dizi Analizi Zincir Sonlandırma PCR	42
4.2.5.1.4. Dizi Analizi Zincir Sonlandırma PCR Pürifikasyonu	43
4.2.5.1.5. ABI 3130 Dizi Analiz Cihazının Çalışma Protokolü	44
4.2.5.2. Allele Özel Kantitatif Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR)	45
4.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	47
<u>5. ARASTIRMA BULGULARI</u>	<u>48</u>
5.1. Demografik Bulgular	48
5.2. Moleküler Bulgular	49
5.3.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometri Analiz	49
5.3.2.1. Dizi Analizi Sonuçları	51
5.3.2.2. Allele Özel Kantitatif Eş Zamanlı PCR Sonuçları	52
5.3.2.3. Materyal Özelliğine Bağlı Dağılım Bulguları	55
<u>6. TARTISMA ve SONUC</u>	<u>59</u>
6.1. Sonuç	66
<u>KAYNAKLAR</u>	<u>67</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>73</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşüm aşamaları	4
Şekil 2.2.	DNA hasarının nedenleri, hücresel yanıtlar ve sonuçları	6
Şekil 2.3.	WHO (World health organisation) özelliklerine bağlı lenfoma gruplar şeklinde Şematik sınıflaması	7
Şekil 2.4.	Reed-Stenberg hücresi histolojik görüntüsü	8
Şekil 2.5.	Hodgkin dışı lenfomalarda (NHL) bulunan alt grupları ve istatistik olarak dağılımları.....	10
Şekil 2.6.	B lenfosit gelişimi ve farklı lenfomaların lenfosit gelişim evrelerine göre dağılımı.....	12
Şekil 2.7.	Dalak da B hücre gelişim sırası	13
Şekil 2.8.	B lenfosit alt grup gelişimi şematik görüntüsü	13
Şekil 2.9.	Lenfoplazmatik lenfoma (LPL)/Waldenström makroglobulinemi (WM) grubunun histolojik görüntüsü.....	15
Şekil 2.9.	Waldenström makroglobulinemi (WM) t (9:14) (p13:q32) kromozom anomalisi şematik görüntüsü	16
Şekil 2.10.	Marjinal zon lenfoma (MZL) grubunun histolojik görüntüsü	17
Şekil 2.11.	(A): MYD88 gen yapısı (E:Ekzon) (B): MYD88 L265P mutasyonu izlenen bölgenin amino asit dizilimi.....	18
Şekil 2.12.	(A): MYD88 protein yapısı şematik görüntüsü. (B): MYD88 proteinin uç boyutlu yapısı ve bulunan mutasyonların yerleşmesi.	19
Şekil 2.11.	TLR4 ve TLR2 da bağlayıcı proteini içeren molekül kompleksini şematik görüntüsü.....	22
Şekil 2.12.	Toll-benzeri reseptörler ve yolakları	24
Şekil 2.13.	DNA dizi analizi Sanger zincir sonlandırma metodu şematik görüntüsü	27
Şekil 2.14.	OtomatikDNA dizi analiz yönteminin genel şeması.....	28
Şekil 2.15.	SYBR Green tekniği.....	31
Şekil2.16.	Erime eğrisi analizi.....	31
Şekil 4.1.	Yapılan çalışmada temel olarak uygulanan yöntemlerin işlem sırası.....	36
Şekil 4.2.	Otomatik DNA dizi analizi/RT-PCR da yapılan işlem sırası.....	39
Şekil 4.3.	ExoSAP-IT PCR temizlik yönteminin şematik diyagram.....	42
Şekil 5.1.	DNA kalite ölçümü amaçlı yapılan size ladder temsili agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 5.2.	Amplikon MYD88 PCR sonuçları temsili agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 5.3.	Dizi analizi yöntemiyle tanı gruplarına göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı (%).....	52
Şekil 5.4.	Dizi analizi yönteminde pozitif ve negatif sonuçların görüntüsü.....	52

Şekil 5.5.	Kantitatif eş zamanlı PCR sonuç temsili görüntüsü.	53
Şekil 5.9.	Yapılan çalışmada yöntemle göre ve materyal çeşitliliğine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılım.....	55
Şekil 5.10.	Yapılan çalışmada materyal kalitesine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı.....	56
Şekil 5.7.	Her iki yöntemle ve sadece RT-PCR ile elde edilen mutasyonlu hastaların Ct değeri grafiği	56
Şekil 5.8.	Hasta gruplarında RT-PCR ve dizi analizi yöntemiyle MYD88 L265P mutasyonu dağılımı	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Lenfoma farklı sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.2.	Agresif ve sessiz (indolent) NHL lenfoma alt grup örnekleri	10
Çizelge 2.3.	TLR'nin endojen ve ekzojen ligandları ile sentezini indüklediği inflamatuvar mediatörleri	21
Çizelge 2.4.	TLR'ler, adaptör proteinleri ve yerleşim yerleri.	23
Çizelge 4.1.	Kalite kontrol PCR protokolü.....	38
Çizelge 4.2.	MYD88 ekzon 5 PCR için kullanılan primer dizileri.....	40
Çizelge 4.3.	MYD88 ekzon 5 PCR protokolü	40
Çizelge 4.5.	Exosap-IT pürifikasyon protokolü	41
Çizelge 4.6.	Exosap-IT pürifikasyon programı	41
Çizelge 4.7.	Dizi analizi yönteminde kullanılan zincir sonlandırma PCR protokolü.....	43
Çizelge 4.8.	Dizi analizi için zincir sonlandırma PCR programı	43
Çizelge 4.9.	Zincir sonlandırma PCR pürifikasyonu için kullanılan sephadex G-50 jel kromatografi protokolü.....	43
Çizelge 4.10.	MYD88 ekzon 5 L265P mutasyon bölgesine özel eş zamanlı PCR da kullanılan primer seti.....	46
Çizelge 4.11.	RT-PCR protokolü	46
Çizelge 4.12.	RT-PCR programı	47
Çizelge 5.1.	Tanı gruplarındaki hastaların yaş dağılımı. $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis)	48
Çizelge 5.2.	Hastalık gruplarında cinsiyet göre dağılımı. $P < 0,05$ (Fisher's Exact testi)	49
Çizelge 5.3.	İzole edilen DNA'lara ait spektrofotometre (Konsantrasyon) ve size ladder PCR sonuçlar sonuçlar	50
Çizelge 5.4.	Dizi yöntemiyle tanı gruplarına göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı. ($p < 0.05$ Fisher's Exact testi)	51
Çizelge 5.6.	RT-PCR yöntemine bağlı MYD88 L265P mutasyon dağılımı. ($p < 0,05$ Fisher's Exact testi)	54
Çizelge 5.7.	Her iki yöntemle MYD88 L265P mutasyonu izlenen örneklerin karşılaştırılması	54
Çizelge 5.8.	Yapılan çalışmada materyalin özelliğine göre ve materyal çeşitliliğine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılım	55
Çizelge 6.1.	Farklı literatürlerde ve bizim çalışmada yapılan WM hastalarında MYD88 L265P mutasyonu dağılımı	63

SİMGELER DİZİNİ

AS-PCR	: Allel spesifik PCR
B-CLPD	: B-cell kronik lenfoproliferatif bozuklukları
BL	: Burkitt lenfoma
°C	: Derece santigrat
ddNTP	: Dideoksinükleik asit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNTP	: Deoksiribonükleotit
dsRNA	: Çift zincirli RNA
DLBCL	: Diffüz büyük B hücre lenfoma
EDTA	: Ethylenediaminetetraaceticacid
FISH	: Flüresan in situhibridizasyon
FL	: Folikülerlenfoma
HL	: Hodgkinlenfoma
HRS	: Reed-stenberg hücre
KLL	: Kronik lenfoblastik lösemi
IRAK	: Interleukin-1 receptor-associatedkinase
IRF3	: IFN düzenleyici faktör 3
LGBCL-NOS	: Düşük dereceli B-hücreli lenfoma aksi belirtilmedi
LPL	: Lenfoplazmacitiklenfoma
LBP	: lipoprotein bağlayıcı protein
TLR	: Toll benzeri receptor
Tm	: Erime sıcaklığı
TRAM	: TRIF-related adapter molecule
MAL	: MYD88 adapter-like
mRNA	: Haberci ribonükleik asit (mesenger RNA)

MI	: Mililitre
MM	: Multiplmyelom
MCL	: Mantle hücreli lenfoma
MZL	: Marginal zon lenfoma
MYD88	: Myeloid differentiation primary response gene 88
NF-kB	: Aktif B hücre kappa hafif zincir artırıcı çekirdek faktörü (Nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
Ng	: Nanogram
NK	: Doğal öldürücü hücreler
NHL	: Hodgkin-dışı lenfoma (Non-hodgkinlymphoma)
PCR	: Polimeraz zincirleme tepkimesi
Pax-5	: Pairedbox protein
REAL	: Güncellenmiş Avrupa Amerikan Lenfoma (RevisedEuropeanAmericanLymphoma, REAL)
Rpm	: Devir/dakika
SLL	: Küçük lenfositik lenfoma
SNP	: Single nucleotide polymorphism
ssRNA	: Tek zincirli RNA
TLR	: Toll-benzeri reseptör (Toll-likereceptor)
TRIF	: TIR domain içeren adaptör uyaran interferon- β
Zap-70	: Zeta-chain bağlı protein kinse 70
WM	: Waldenströmmakroglobulinemi
WHO	: World healthorganization
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantatif Real Time PCR)
μl	: Mikrolitre

1.GİRİŞ

Kanser vücudun temel yaşam birimi olan hücrede başlayan bir grup hastalığın ortak adıdır. Günümüzün oran olarak çok görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Kanseri anlamak için normal hücrelerin nasıl kansere dönüştüğünü bilmek faydalı olacaktır. Tanısı konulan kanser tiplerinden biri de, lenfomalar yani lenfatik sistemde başlayan bir grup kan kanserinin genel adıdır. Lenfomalar lenfosit kökenli neoplastik hastalık grubudur. Bunlar köken aldıkları hücrelere ve bu hücrelerin gelişim süreçlerinin yer aldığı döneme göre farklı morfolojik, immunofenotipik ve moleküler özellikler sergilerler. Bu özelliklerine göre de farklı klinikprezentasyon gösterirler. Her yıl ortaya çıkan kan kanserlerinin yaklaşık %54'ü lenfoma tipleridir.

Lenfomalar en basit olarak Hodgkin ve Hodgkin dışı (non-Hodgkin) lenfoma olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Lenfomaların büyük çoğunluğunu non-Hodgkin lenfoma grubu oluşturmaktadır. Non-Hodgkin grubu kendi içinde köken aldıkları hücre tiplerine göre T/NK (natural killer/doğal öldürücüler) ve B hücreli olmak üzere alt gruplara ayrılırlar. T/NK ve B hücreli lenfomalar köken aldıkları hücrelerin olgun(matür) veya öncü/olgunlaşmamış hücreler olmak üzere kendi aralarında alt gruplara ayrılırlar. B hücreli lenfomaların daha sık görülmesi nedeniyle yapılan araştırmaların çoğu bu gruba odaklanmış ve bu sonucunda bağlı olarak elde edilen bilgiler sayesinde B hücresi gelişimi, patogenezi ve tedavisi alanında bilgiler elde edilmiştir. Non-Hodgkin lenfomaların sınıflandırması ilk olarak morfolojik özellikler dikkate alınarak yapılmıştır. Daha sonra 1970'li yıllarda lenfoma hücrelerinin morfolojisi yanında fenotipik özelliklerine bağlı sınıflamalar yapılmıştır. En son morfolojik, immünofenotipik, moleküler, sitogenetik veriler ile patogenezi ve klinik bulguları dikkate alarak güncellenmiş sınıflandırma sistemi olan Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 2008 sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır.

Erişkin kadın ve erkeklerde ölümlerin çok önemli bir kısmını oluşturan lenfomalar tüm dünyada olduğu gibi Türkiye de oldukça sık görülmektedir. Ancak diğer kanser tipleri gibi lenfoma grubunda da erken evrelerde tanı ve ona bağlı olarak tedavi şansı ve hastaların yaşam süresinin artması açıdan çok önemlidir. Bu nedenle lenfoma kanserlerin de erken tanı ilk adım, hücresel açıdan moleküler lezyonların tanımlanması ve etkin olan moleküler

mekanizmaların ortaya konması ve farklı moleküler mekanizmalar kullanarak oluşan öncü lezyonların bulunması ve bunlara bağlı tedavi uygulanmasıdır.

Düşük dereceli B hücre lenfomalar, olgun B hücrelerinden köken alan bir NHL olan, lymphoplasmacytic lymphoma (LPL), waldenström makroglobulinemi (WM), splenic marginal zone lymphoma (SMZL), marginal zone lymphoma (MZL) ve başka düşük dereceli B hücre lenfomalar (Küçük Lenfositik Lenfoma (SLL)/kronik Lenfositik Lösemi (CLL), multipel myeloma (MM)) en son klasifikasyon kriterlerine göre morfolojik olarak sınıflandırılmış ayırıcı tanı bulunduran bu grup lenfoproliferatif neoplazilerde moleküler süreçlerde toll like reseptör ilişkili yollarda bulunan MYD88 geni L265P mutasyonunun varlığı tahmin edilmiştir. Ancak buna rağmen klinik ve patolojik özellikleri ile bu gruptaki neoplazilerin profilini yansıtan vakaların tümünde MYD88 L265P mutasyonu saptanmamaktadır. Böylece doğru olarak tanı gruplarını oluşturmak için MYD88 geni ekzon 5, L265P mutasyon analizi yapılmıştır. Hasta gruplarına özel moleküler bulguları hastalara tanı doğruluğunu ve güvenilirliğe yükseltilmesi sağlanmıştır. Moleküler bulgular ile demografik ve klinik patolojik veriler ilişkilendirilerek, sonuçlar literatür eşliğinde değerlendirilmiştir. Ayrıca, MYD88 mutasyonlarının tespitinde kullanılabilen farklı moleküler tekniklerin güvenilirliklerinin karşılaştırılması yapılarak, daha sonraki uygulamalar için yararlı olabilecek bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır.

Seçilen hasta gruplarında plazma hücre farklılaşması bulunduran ayırıcı tanı güçlüğü gösteren düşük dereceli B hücreli hastalarının MYD88 mutasyonu ile ayırıcı tanı yapılabileceği ve dizi analizi ile RT-PCR yöntemleri arasında duyarlılık farkı bu hastalıkların tanısal yaklaşım düzeyinde önemli olduğu bilinmektedir. Ancak yöntemlerin dışında bu hastalıkların tanısı için elde edilen materyallerin diğer özelliklerinin de test sonuçlarında önem taşıyabileceğidir. Literatürde MYD88 için yapılan dizi analizi ve qRT-PCR çalışmalarının başında Rossi et al. (2013)(1), Giada Bianchi et al. (2013)(2) ve Iwatani et al. (2014)(3) yaptığı çalışmalar gelmektedir. En önemli olan çalışmalardan Rossi ve ekibinin 2013 yılında yaptığı çalışmadır. Bu çalışmaya ait verilerin temeli toll like yolağında bulunan MYD88 adaptör proteininin gen üzerinde bulunan L265P mutasyonunu farkı B hücre neoplazilerde dağılımının incelenmesidir.

Bu çalışmada seçilen plazma hücre farklılaşması bulunduran SMZL, LPL/WM, NMZL, KLL/SLL gibi düşük dereceli B hücreli lenfoma hasta gruplarına ait kemik iliği, dalak, lenf

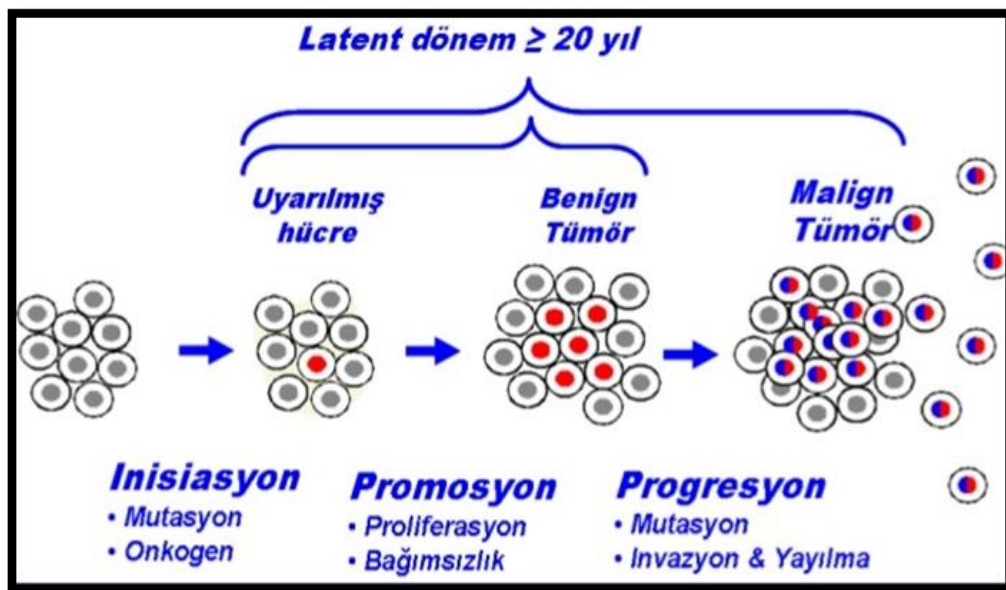
nödülü veya ektranodal tutulum gösteren doku örneklerine ait parafin bloklardan elde edilen kesitler ve/veya aspirasyon yaymalarından izole edilen DNA larında ayırıcı tanısında kullanılan toll like reseptör ilişkili yolaklarda bulunan MYD88 geni L265P mutasyonunun dağılımının gösterilmesi ve kullandığımız dizi analizi ve allel özeleş zamanlı PCR yöntemlerine bağlı olarak mutasyon dağılımı açısından farklarının göstermek ve yöntemler dışında test sonuçlarını etkileyen diğer faktörlerin etkileri belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser

Kanser önemi artan bir sağlık ve yaşam sorunudur. Kanser, bazı hayatı veya kontrol parametreleri değişime uğramış hücrelerin, gerek aynı hücrede ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalığın temel adıdır. Hücrelerin proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü kontrol eden genlerinde oluşan bozukluk sonucu izlenmektedir. Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA eşlenmesi (replikasyon) hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşmasıdır. Normal hücreden kanser hücresine dönüşüm aşamaları Şekil 2.1.'de şematik olarak verilmiştir.

Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre çoğalırlar. Genomdaki hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinde hasar oluşturması gibi nedenlerden de kaynaklanabilir. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Hücrelerin çalışmalarını kontrol eden genlerin değişime (mutasyon) uğramasıyla hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere temel de "onkogen" denilir.



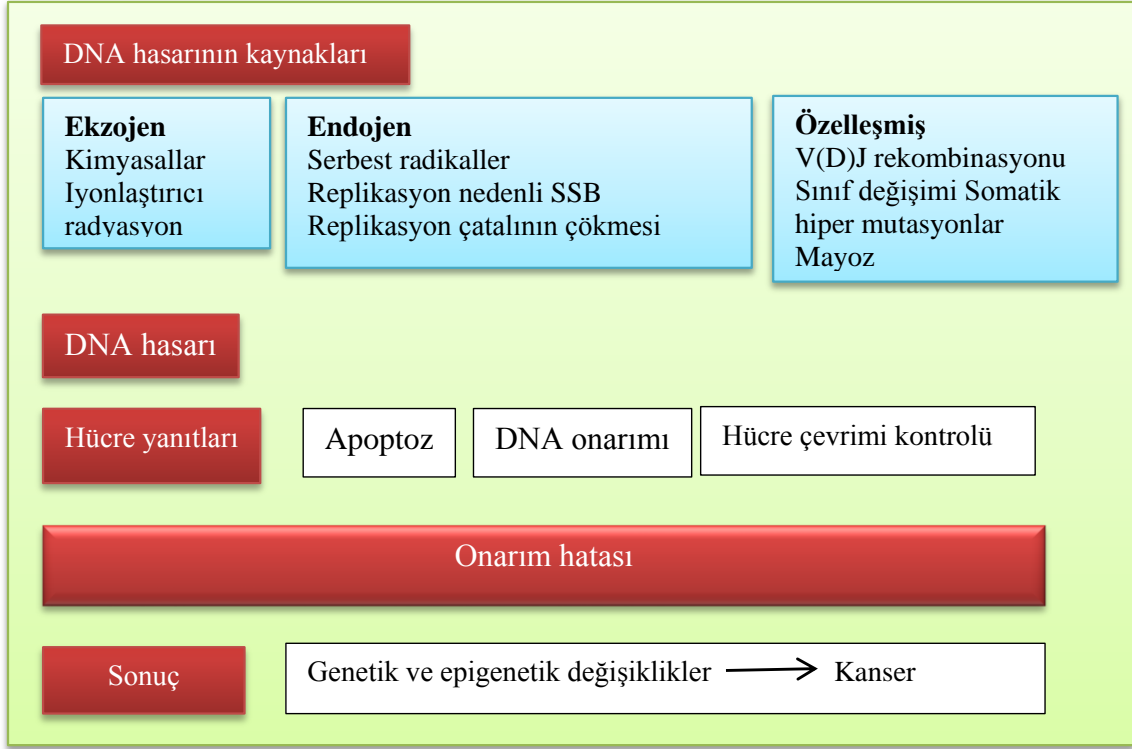
Şekil 2.1. Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşüm aşamaları

2.1.1. Kanserin Moleküler Nedenleri

Kansere neden olan, çok basamaklı bir süreç olduğu, bir birini takip eden değişen yollar sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Kanseri hücre oluşumuna iki temel mekanizma vardır; birincisi somatik mutasyonların birikimi, ikincisi genetik değişikliklerin (duplikasyon ve delesyonlar, kromozomlar arası translokasyon) ortaya çıkmasıdır. DNA lezyonlarına neden olan farklı kaynaklar ya da olgular vardır. Ekzojen kaynakları DNA bazlarında modifikasyonlara, tamamlayıcı iplikler arasında kovalent bağ oluşumuna, tek iplik kırılmalarına (SSBler) ve çift iplik kırılmalarına (DBSler) neden olurlar. Bu değişiklikler gıda, su, kimyasal ürünler, radyasyon ve benzerleri gibi kaynaklardan gelebilir. DNA hasarına yol çan endojen kaynaklarda bulunmaktadır (4). Genomik DNA, normal hücre koşullar altında bile kendiliğinden oluşan endojen değişikliklere maruz kalır. Mutasyonlara bakacak olursak, kanser hücreleri, normal hücrelere kıyas yapılarak çok daha yüksek oranda mutasyon varlığı ve kanser ilerledikçe bu mutasyonların sayısı artış göstermektedir. Bunun nedeni, DNA tamir mekanizmasında görev olan genlerin mutasyonlar uğraması ve sonucu işlev yapmamasıdır (Şekil 2.2).(5-8).

Kanser görülme sıklığının yaşla birlikte artmaktadır. Birçok kanser yıllar boyunca biriken çok sayıda anormalinin sonucu olduğunu göstermektedir.

Hücre çoğalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre kitleleri giderek büyürler ve bu kitleler diğer sağlıklı hücrelerde metastaz yapılarak, tümörün gelişmesine neden olabilir.



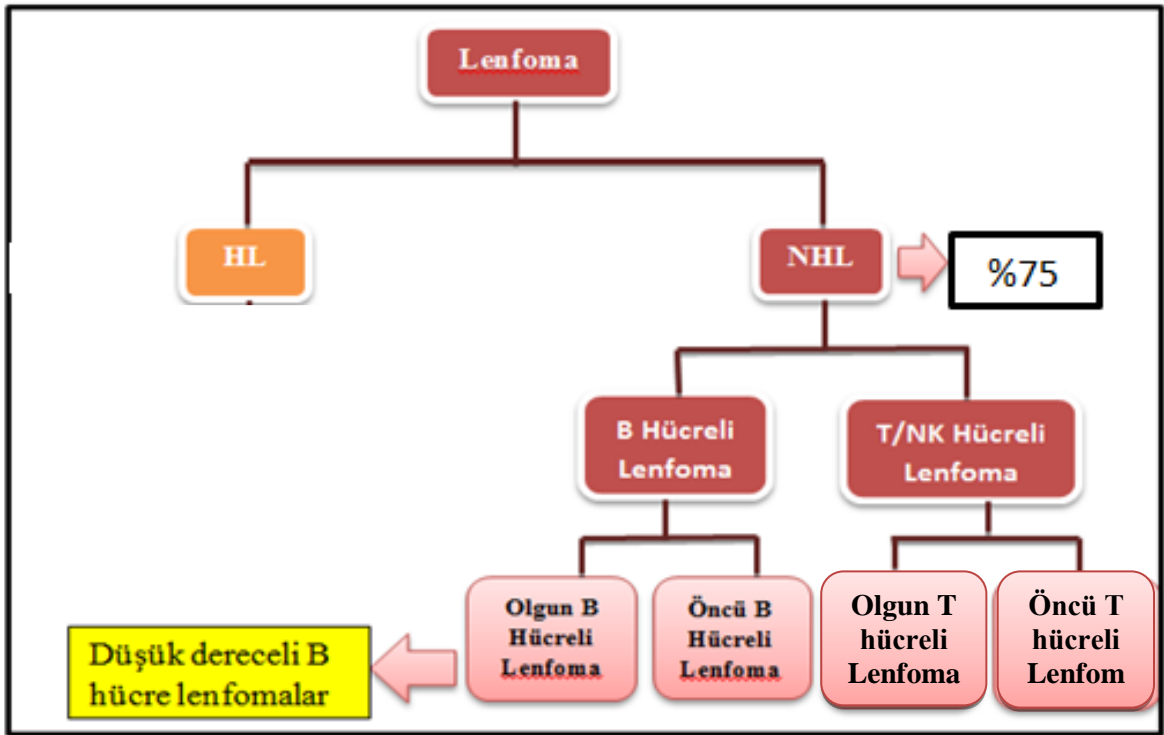
Sekil 2.2. DNA hasarının nedenleri, hücresel yanıtlar ve sonuçları

2.2. Lenf Kanseri

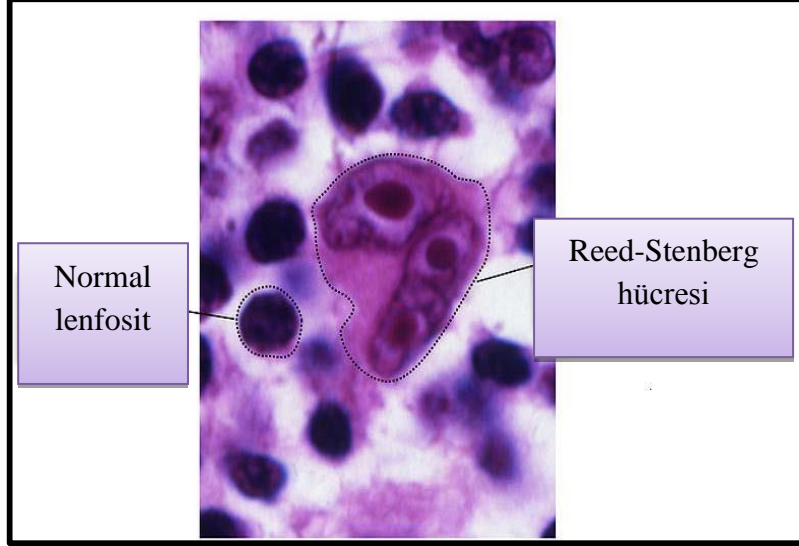
Lenfoma (lenf kanseri), immün sistem hücrelerinden olan lenfositlerin (bir çeşit beyaz kan hücresi (B hücreleri, T hücreleri veya NK)) değişikliğe uğrayıp çoğaldığında başlayan ve solid tümörler halinde veya lösemi yayılım yapabilen bir neoplastik hastalıktır. Bunlar köken aldıkları hücrelere ve bu hücrelerin lenfosit gelişim süreçlerinin yer aldığı döneme göre farklı morfolojik, immunofenotipik ve moleküler özellikler sergilerler. Bu nedenle farklı klinik özellikleri göstermektedir. Bu kötü huylu hücreler genellikle lenf nodullarından köken almaktadırlar. Kanser hücrelerin hızla çoğalması veya normal lenfositlere göre daha uzun süre yaşamaları ile meydana gelir. Malign lenfoid hücreler de normal lenfositler gibi lenf düğümü, kemik iliği, dalak, kan da çoğalır. Lenfositlerden köken alan ancak vücutta dolaşan, kanı ve kemik iliğinde görülen ve solid tümörler halinde görülmeyen lenfositler lösemiye benzerlik göstermektedir. Lenfoma ilk kez 1832 yılında Thomas Hodgkin tarafından Hodgkin lenfoma (HL) ve Hodgkin dışı lenfoma (non-Hodgkin/NHL) olarak iki alt büyük gruba ayrılır. Non-Hodgkin grubu da kendi içinde köken aldıkları hücre tiplerine göre T/NK ve B hücreli olmak üzere iki ana alt gruba ayrılırlar. T/NK ve B hücreli lenfomalar ise köken aldıkları hücrelerin matür (olgun) veya

prekürsör (olgunlaşmamış) hücreler olmasına bağlı olarak kendi aralarında alt gruplara ayrılırlar. Lenfomaların ana gruplar şeklinde şematik sınıflaması Şekil 2.3'de verilmiştir.

Hodgkin lenfoma (HL), bilinen en eski lenfoma türüdür. Bu lenfoma tipini diğer tüm lenfomalardan ayıran morfolojik ve histopatolojik özelliği Reed-Stenberg (HRS) hücresi adı verilen geniş, hafifeozinofilik sitoplazmalı, tek çekirdekli veya çok çekirdekli dev bir neoplastik hücresinin bulunmasıdır (Şekil 2.4). Reed-stenberg hücreleri CD30 ve CD15 pozitif, CD20 ve CD45 genellikle negatiftir. HL toplam lenfoma hastalarının yaklaşık %25'inde görülürken, %75'inde NHL görülmektedir. Türkiye'de bu oran %80 NHL ve %20 HL olarak izlenmektedir. Her iki grubun çok fazla alt tipi vardır. Bu alt tipler "agresif" (hızlı büyüyen) veya "sessiz" (yavaş büyüyen/indolent) olarak daha ileri sınıflandırılır. Her tipi (sessiz veya agresif olması) kendine uygun tedavi etki gösterir, bu nedenle doğru tanı çok önemlidir(9).



Şekil 2.3. WHO (World Health Organisation) özelliklerine bağlı lenfoma gruplar şeklinde şematik sınıflaması



Şekil 2.4. Reed-Stenberg hücresi histolojik görüntüsü (http://wikipedia.org/wiki/Reed-Sternberg_cell)

İlk sınıflama olan Rappaport'ta lenfomalar hücrelerin morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Sonra Kiel sınıflamasında lenfomalar ilk defa T ve B olmak üzere iki grupta incelenmiştir. Bu sınıflama nodal lenfomalar için uygun ama ektranodal lenfomaları için yeterli değildir. Working formulation sınıflaması, benzer klinik özellik ve tedavi yöntemlerine bağlı sınıflandırır. 1994 yılında REAL sınıflaması köken aldığı hücrelere göre yapılmıştır. En sık kullanılan sınıflama Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organisation) tarafından 2008 yılında düzenlenen ve hematopoietik-lenfoid dokuları tüm özelliklerini dikkate alarak sınıflandıran sistemdir (Çizelge 2.1).

DSÖ 2008 sınıflamasında lenfomalar B hücreli, T/NK hücreli ve Hodgkin lenfoma olmak üzere üç ana başlık altında incelenmektedir (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1. Lenfoma farklı sınıflandırılması

Rappaport (1956)
Lukes-Collins (1966)
Kiel (1974)
Dünya sağlık örgütü sınıflaması (1976)
Working formulation for clinical usage (1982)
REAL (Yenilenmiş Avrupa-Amerika lenfoma sınıflaması) (1994)
Dünya sağlık örgütü sınıflaması (2001)
Dünya sağlık örgütü sınıflaması (2008)

2.2.1. lenfoma İstatistik Özellikleri

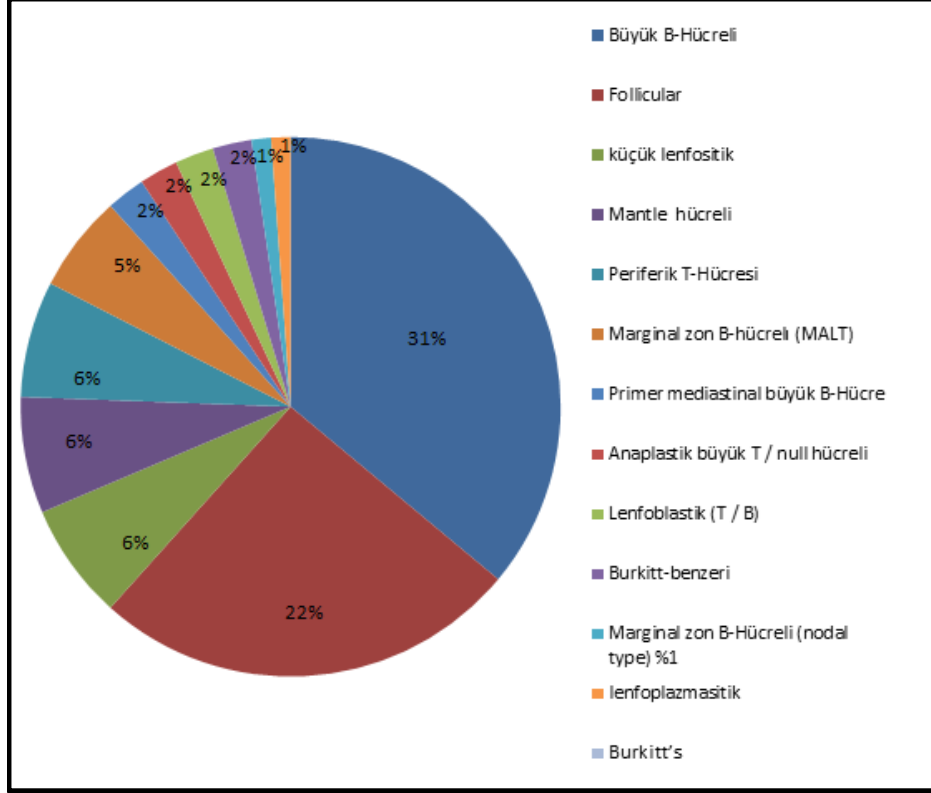
Farklı ülkelerde ve etiyolojik nedenlere göre dağılım farklılık gösterir, Kuzey Amerika ve Avrupa'da %85-%95 NHL, B-hücreli lenfomadır (10). T hücreli lenfoma (NK) Japonya'da daha sık görülmesi, onkojenik retrovirüs, HTLV 1 ile ilişkilendirilmiştir. Benzer biçimde Asya ve Afrika'da daha siktir. Kuzey Amerika'da görülen en yaygın NHL tipleri, foliküler küçük çentikli hücreli lenfoma (%20-%30) ve yaygın büyük hücreli lenfomadır (%30-%40). İlki düşük dereceli bir lenfoma, diğeri ise orta dereceli lenfomadır(10, 11). Sonuç olarak kabaca bakıldığında tüm lenfomaların yaklaşık %75'ini Hodgkin dışı,%25'ini Hodgkin lenfoma oluşturmaktadır. Türkiye için bu oranyaklaşık %80'e, %20 olarak bulunmuştur. lenfomalar hematolojik kanserler arasında yaklaşık %3'ünü oluşturanen sık rastlanılan gruptur. Dünyada önemli bir ölüm nedeni olan lenfoma kanseri erkeklerde 9. kadınlarda 6. sırada yer almaktadır. Türkiye Sağlık Bakanlığı 2008 verilerine göre Hodgkin dışı lenfoma kadınlarda 8. erkeklerde 7. en sık görülen kanserdir.Hodgkin dışı lenfoma yaş ile birlikte artış olduğu gösterilmiştir (9).Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Batı ülkelerinde hastalar genellikle60-70'li yaşlarda tanı alırken, Asya ve Ortadoğu ülkelerinde hastalık 40-50'li yaşlarda daha sık görülmektedir. Hodgkin dışı lenfoma, erkeklerdekadınlardan daha siktir; erkek/kadın oranı: 1.2-2.1 arasında değişmektedir (9).

Non-Hodgkin lenfoma gözlendiği gibi erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmektedir. Yapılan literatür çalışmalarına bağlı olarak Avrupa ve Kuzey Amerika da 60 yaş üzeri daha kötü prognostik örnekler bulunmaktadır. Genel olarak lenfoma Afrikalılarda 75-79, 80-84 yaşlarda ve Amerikalılarda 55-64 yaşlarda en sık rastlanmaktadır. Asya da daha genç yaşlarda (40-50 yaş) bildirilmektedir(12).

2.2.2. Non-Hodgkin Lenfoma

Hodgkin dışı lenfoma hücreleri, B veya T lenfositlerinin herhangi bir gelişim evresinde meydana gelen aşırı proliferasyon sonucu oluşur. En çok B hücrelerde rastlanmıştır. Böyle farklılaşma evresinde de normal olarak beklenen morfolojik/immünolojik özelliklere gösterir. NHL genel olarak büyüme hızına göre yavaş seyirli (indolent) ve hızlı seyirli (agresif) lenfoma iki alt guruba ayrılır. Yavaşseyirli lenfomalar; yaşam süresi uzun olan lenfoma tipidir. Yavaş seyirli hastalarda tedavikullanarak hastalığın seyri değişme uğramadığı için genellikledavı uygulanmaz. Bazen indolent örnekler şekil değiştirme

(transformasyon) yaparak agresif olur ve bu durumda tedavi yapılması gerekir. Agresif lenfomalar ise hızlı seyrederek ve tedavi edilmediğinde ölümlerine sebep olurlar. Genel olarak NHL alt grupları Şekil 2.5 izlenmektedir.



Şekil 2.5. Hodgkin dışı lenfomalarda (NHL) bulunan alt grupları ve istatistik olarak dağılımları

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından en son NHL indolent ve agresif lenfoma sınıflandırılması böyledir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Agresif ve sessiz (indolent) NHL lenfoma alt grup örnekleri

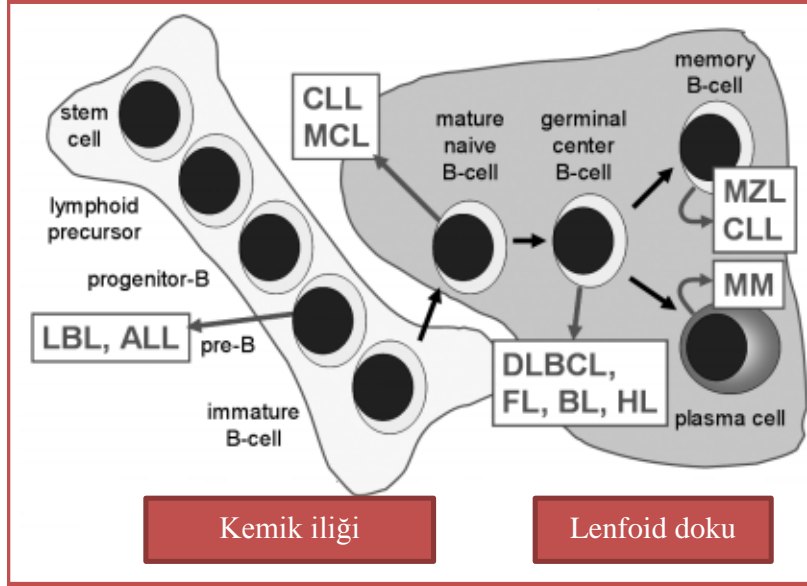
Sessiz alt grup (Indolent)	Agresif alt grup
Nodal marjinal zon B hücreli lenfoma (MZL)	Diffüz büyük B-hücreli lenfoma (En yaygın)
Lenfoplazmatik lenfoma (LPL) Waldenström makroglobulinemi (WM)	Mantle hücreli lenfoma
Küçük hücreli lenfositik lenfoma (SLL) kronik lenfositik lösemi (KLL)	Burkit lenfoma
Mukozayla-ilişkili lenfoid dokulenfoma (MALT)	Santral sinir sistemi lenfoma
Foliküler lenfoma (En yaygın)	AIDS'le-ilişkili lenfoma
Kutanöz T-hücreli lenfoma (Mycosis fungoides ve sézary sendromu)	Anaplastik büyük hücreli lenfoma
	Akut erişkin T-hücreli lenfoma
	Lenfoblastik lenfoma

Lenfomalar köken aldığı hücre serisine göre %80-%85'i B hücre, %15'i kadarı T hücre kökenli, nadir olarak doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücrelerinden köken aldığı izlenmiştir. NHL'leri B ve T lenfositlerin herhangi bir farklılaşma aşamasında gelişebilirler. Bazı lenfomalar olgun ve bazıları öncü lenfositlerden köken alabilirler. Tümör hücrelerinin kökeni onların fenotipik ve moleküler özelliklerine göre saptanmaktadır. En yaygın tanıma belirteci (marker) olan, özgün antijenlerin (yüzey belirteci) varlığıyla hangi hücreden köken aldığı anlaşılabilir. Örnek olarak CD3 (cluster of differentiation 3), CD4, CD7, CD8T hücrelerinin, CD10, CD19, CD20 B hücrelerinin, CD16, CD56 ise NK hücrelerinde bulunurlar.

2.3. B Lenfosit Hücrelerin Gelişimi

B hücre lenfomaların daha iyi anlaşılması için en önemli yollardan biri B hücrelerin gelişim süresidir. Farklı B hücre lenfomaları, gelişim basamaklarında olan B hücrelerinde oluşan bir çeşit mutasyonlara uğramalarıyla meydana gelirler. B hücre gelişimi ve matürasyonu antijenden bağımsız olarak kemik iliğinde gerçekleşir. Tüm lenfoid hücreler kemik iliğinde hematopoetik progenitör kök hücrelerden (Hematopoietic stem cells/HSCs) gelişmekte, hematopoietic progenitör hücreler lenfoid ve myeloid öncü hücreleri oluşturmak üzere iki ana gruba ayrılır. Lenfoid ata (progenitor) hücreleri T, B ve NK hücrelerine dönüşürler. B hücrelerinin gelişim aşamasında antijene bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki faz dikkat çeker. Antijene bağımlı olmayan B hücre gelişimi kemik iliğinde gerçekleşir ve sonunda matür B hücre oluşumuna kadar tüm aşamaları kapsar. Antijene bağımlı aşama matür B hücrelerinin antijenle karşılaşma sonunda memory B hücreleri ve plazma hücre oluşumu ve Ig sınıf (class) değişimi ile sonlanır bu işlem lenf bezleri, dalak gibi lenfoid organlarda gerçekleşir. Her bir hücre yüzey membranında immunoglobulin (Ig) ve farklılaşma antijenleri (CD) gibi moleküller oluşur. B hücrelerinin antijen reseptörlerinin gelişimleri sırasında antijen reseptörlerini kodlayan DNA parçaları rasgele somatik rekombinasyonu (rearranmanı) ve bunlara nükleik asit seğmenlerinin eklenmesiyle oluşur. Bu hücreler kemik iliğinde karmaşık bir matürasyon sürecinden geçerler (pro-B hücre, pre-B hücre, immatür B hücre ve matür B hücre). Bu süreçte yüzey antijen reseptörleri eksprese edilir. Kemik iliğinde gelişmiş matür naif B hücreler periferik lenfoid dokulara göçerler ve antijen ile karşılaşmayı beklerler. Humoral immün yanıt periferik lenfoid dokularda antijene özgü B hücrelerinin antijenle karşılaşması ile başlar. Şekil 2.6 da

B lenfosit gelişimi ve farklı lenfomaların lenfosit gelişim evrelerine göre dağılımı şematik olarak izlenmektedir (13).

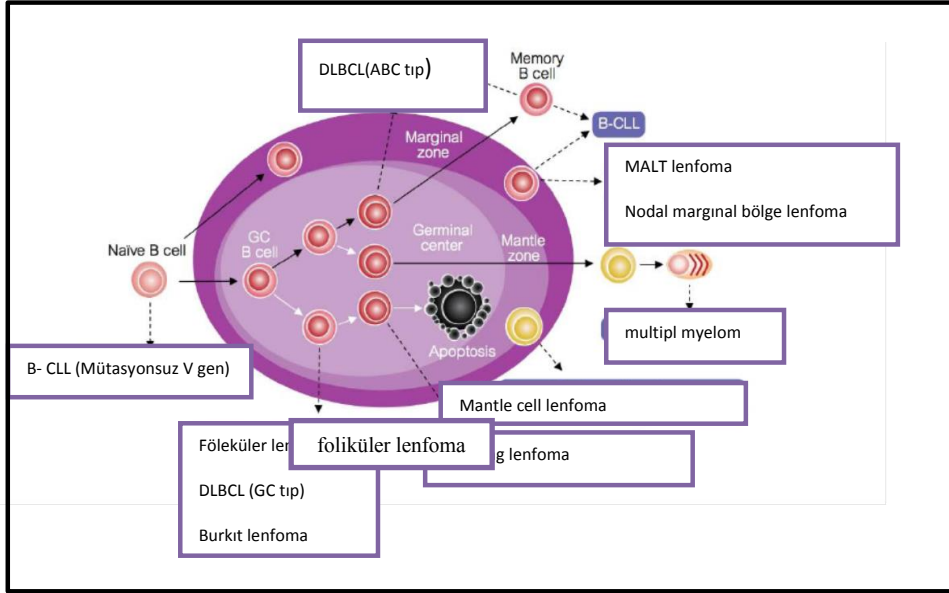


Şekil 2.6. B lenfosit gelişimi ve farklı lenfomaların lenfosit gelişim evrelerine göre dağılımı. **LBL:** Lenfoblastik lenfoma, **ALL:** Akut Lenfoblastik lösemi, **CLL:** Kronik lenfositik lösemi, **MCL:** Mantle zone lenfoma, **DLBCL:** Diffüz büyük B hücreli lenfoma, **FL:** Foliküler lenfoma, **BL:** Burkitt lenfoma, **HL:** Tüylü hücreli lösemi, **MZL:** Marginal zone lenfoma, **MM:** Multipl myeloma

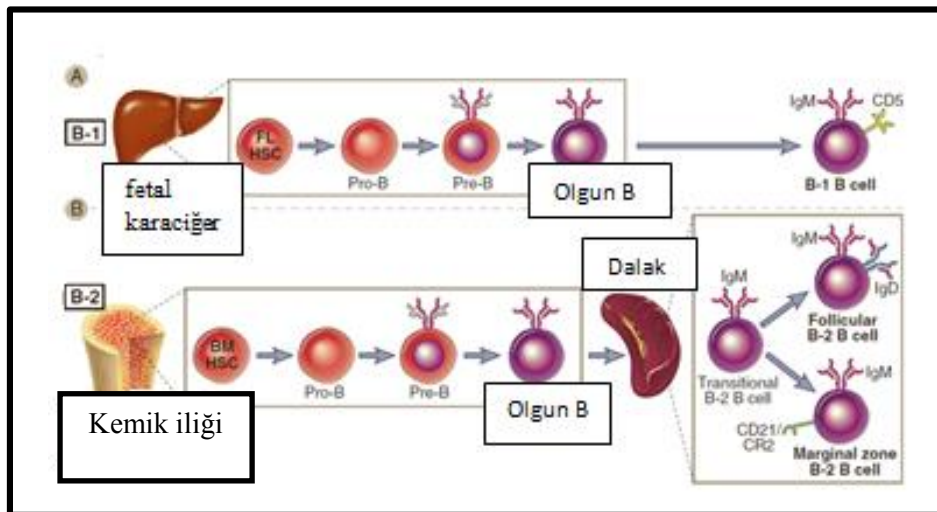
Dalağa giden kemik iliği HSC kökenli B hücreleri (B-2), dalakta bulunan farklı bölgelerinde kendilerinden farklı özellikler göstermektedirler. Bu farklılaşma süresinde, izlenen değişimler sonunda farklı çeşit lenfomaların meydana gelmesine sebep olur. Dalak yapısında 3 temel bölge görünmektedir: Germinal merkezi, Marjinal bölgesi, Mantel bölgesi. Bu bölgelerde bulunan farklı B hücrelere farklılaşma sırasında, farklı lenfomalara neden olabilirler (Şekil 2.7).

B hücrelerin maksimum foleküler B hücre (IgM ve IgD pozitif) halinde bulunmaktadır. Bu hücreler başka lenf organlarına taşınabilirler. Kemik iliği HSC kökenli B hücreleri (B-2), dalağın marjinal bölgesinde kendine özel bir yeteneğe sahipler, bu bölgedeki B hücreleri az çeşitli ve polisakkarit antijenlere doğal immün cevap verme yeteneği vardır. Marjinal B hücreleri IgM ve CD21 pozitifler ve bu hücreler lenf düğümlerinde de izlenmektedirler. Bu hücreler t hücre bağımsız immün cevabında önemli rol oynamaktadır.

Karaciğer HSC kökenli B hücreleri (B-1), IgM ve CD5 pozitifler ve polisakkarit veya lipid antijenlere, IgM üretmektedir. Bunlara bazen doğal antibody adı verilir (Şekil 2.8)(13).



Şekil 2.7. Dalak da B hücre gelişim sırası (Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, eds. hücresel ve moleküler immünoloji.7th düzenleme). **CLL**: Kronik lenfositik lösemi, **MCL**: Mantle zone lenfoma, **DLBCL**: Diffuz büyük B hücreli lenfoma, **FL**: Foliküler lenfoma, **BL**: Burkitt lenfoma, **HL**: Tüylü hüceli lösemi, **MZL**: Marginal zone lenfoma, **MM**: Multipl myeloma.



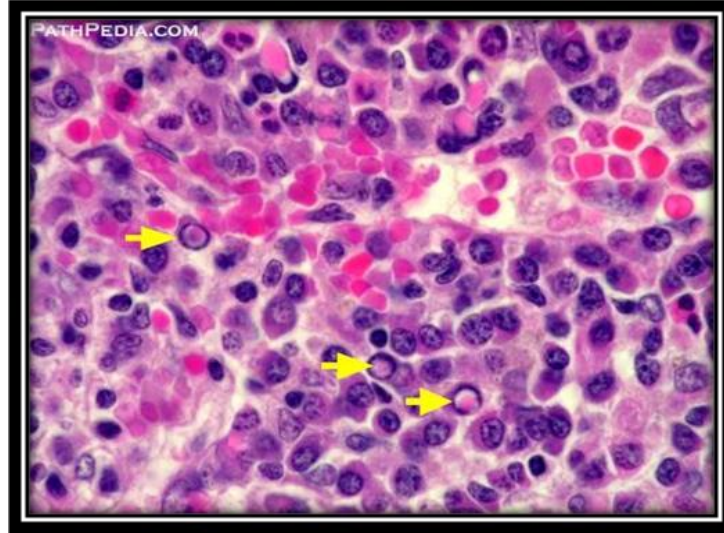
Şekil 2.8. B lenfosit alt grup gelişimi şematik görüntüsü (Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, eds hücresel ve moleküler immünoloji.7th düzenleme)

2.4. Lenfoplazmasitik Lenfoma(LPL)/Waldenström Makroglobulinemi (WM)

Lenfoplazmasitik lenfoma (LPL), küçük B lenfositleri ve plazma hücrelerinin neoplazmidir. B-lenfosit prekürsöründen köken alan ve yavaş büyüyen lenfoma tipleridir. Çok az görülen bir hematolojik neoplazmidir. Erkeklerde rastlama sıklığı kadınlara kıyas daha yüksektir. Genellikle kemik iliğini, dalak, bazen lenf düğümde görünür. Kemik iliğinde ve immüno globulin M (IgM) monoklonal gammapativariği ile “Waldenström makroglobulinemisi (WM)” olarak isimlendirilir. Plazma hücreleri, B hücrelerinden üretilen bir hücre tipidir. Bu yolda bulunan bileşenlerin her hangi biri mutasyona uğrarken, IgM makroglobulin sentezi yükselir, çöknadır IgA ve IgG yükselişi izlenmektedir. LPL’ların çoğu WM olup, %5’in altında bir grubu IgA, IgG olanlar teşkil eder. Monoklonal IgM proteini varlığı, hiperviskozite sendromu, periferik, hemolitik anemi gibi durumlara da yol açabilir (Şekil 2.9)(14).

Patolojik ve klinik özelliklerine baktığında, lenfoproliferatif neoplazmi ve plazma hücreleri neoplazmalarında bir belirteçler görünür. Klinik bulguları çok geniş bir yelpazeye yayılır. Tümör infiltrasyonu ve monoklonal serum proteini ana tanı belirteçleridir. WM hastalığın moleküler patolojisi çok belirgin değil, buna rağmen aktif edilmiş B hücrelerinin hafif zincir, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), tümör hücrelerin oluşumunda önemlidir.

Morfolojik ve immüno fenotipik özelliklerine bakarken, tipik olarak CD19, CD20, CD22 ve CD79a’yı eksprese ederken, CD5, CD10 ve CD23’ü ekspresyonu izlenmemektedir; bu da foliküler lenfoma, kronik lenfosit lösemi (KLL) ve mantle hücreli lenfomadan ayırımını sağlar. WM en önemli tanısı kemik iliğinin plazmasitoid/plazma hücre farklılaşması bulguları olan küçük lenfositlerle tutulumunun biyopsi ile gösterilmesi oluşturur(15).

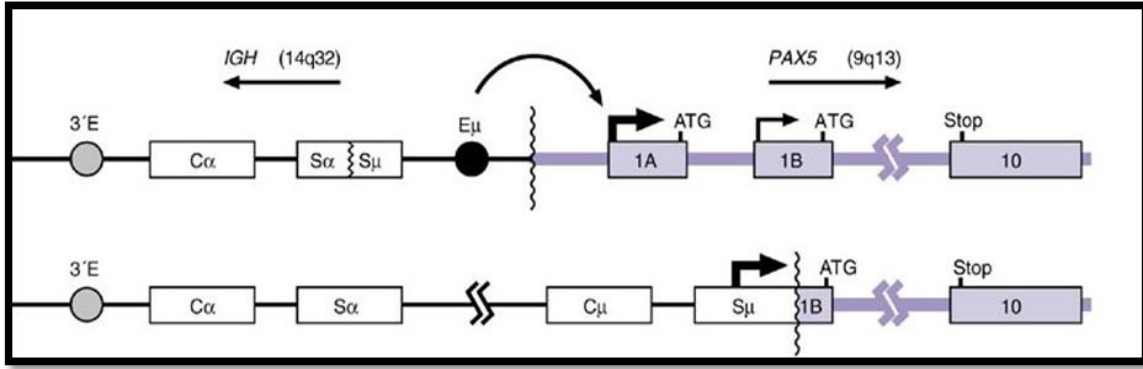


Şekil 2.9. Lenfoplazmatik lenfoma (LPL)/Waldenström makroglobulinemi (WM) grubunun histolojik görüntüsü.

Sitogenetik/Genetik incelemelerinde en önemli olanlar, t (9:14) (p13:q32) ve MYD88 geni (Myeloid differentiation primary response gene 88) mutasyonudur.

t (9:14) (p13:q32) anormal ısı %35 hastalarda izlenir. Translokasyon sonunda kromozom 9-p13 üzerindeki Pax-5 genin bulunduğu bölge (PAX transkripsiyon faktörleri ailesi) ve kromozom 14-q32 üzerindeki IgH gen bölgesinde bir değişiklik meydana gelir bu işlemin sonunda IgH geninde bulunan özel hızlandırıcı (enhancer), PAX-5 bölgesinde bulunan promotörlerine yaklaşır ve PAX5 genin yazılımı azalır ve hızlandırıcı etkisi altında IGH yazılımı artış görülmektedir (Şekil 2.9)(2, 16).

PAX5 geni, Pax-5 proteinini (Paired box protein) kodlayan bir gendir. PAX-5 geni B-hücrelerde özel bir aktivatör protein (BSAP) kodlama işlemini yapar, ancak B-hücrelerinde erken farklılaşma evrelerinde değil, geç aşamalarında kodlama işlemi yapılır. Bu nedenle, PAX5 gen ürünü, B-hücresi farklılaşmasında önemli bir rol oynayabilir, ancak aynı zamanda nöral gelişim ve spermatogenezde ve testis gelişmesinde tespit edilmiştir.



Şekil 2.9. Waldenström makroglobulinemi (WM) t (9:14) (p13;q32) kromozom anomalisi şematik görüntüsü

MYD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) mutasyonunu, Waldenström makroglobulinemi (WM) hastalığının bir önemli nedanıdır. MYD88 adaptör proteini olarak, toll benzeri reseptörler (Toll-like reseptörleri (TLR)) yolağında önemli bir işlem yapan parametredir. Toll-like reseptörleri (TLR), birçok patojene karşı doğal immün sistemde cevap oluşmasını sağlayan bir grup transmembran proteinleridir(17).

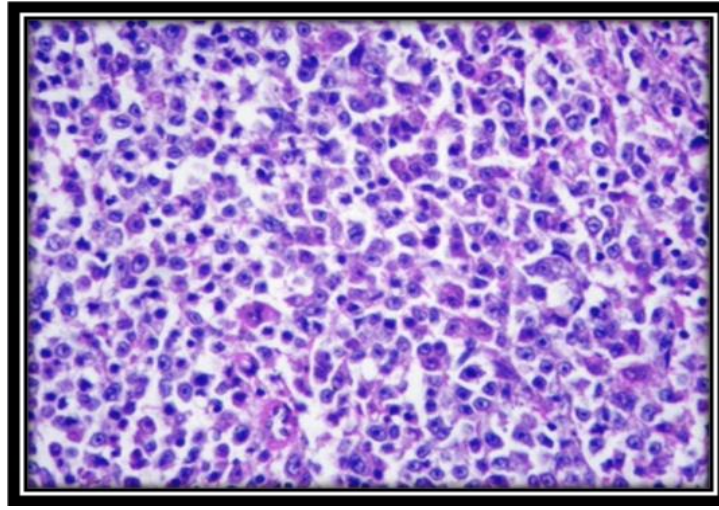
WM için ortalama yaşam süresi 5-6 yıl, hastalığa özgü ortalama yaşam süresi ise yaklaşık 11 yıldır. Hastalığın agresif tabiatına rağmen prognozu belirli faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterir. WM'li hastaların büyük çoğunda tedaviye direnç oluşması sonucunda progresif hastalık grubu olarak tanı alırlar. Bazı hastalarda diffüz büyük B hücreli lenfomalara (DBBHL)dönüşüm görülebilir (Richter sendromu). Bu hastalarda, hastalık seyri kötüdür ve agresif belirtileri kendilerinden göstermektedirler.

2.5. Marjinal Zon Lenfoma(MZL)

Marjinal zon lenfomalar (MZL) B lenfositlerinin sekonder lenfoid foliküllerinmarjinal bölgesinden köken alan düşük dereceli lenfoma çeşitlidir(Şekil 2.10). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün sınıflandırmasına göre marjinal zon lenfomalar, ektranodal marjinal zone lenfoma (EMZL), splenik marjinal zone lenfoma (SPMZL) ve nodal marjinal zone lenfoma (NMZL) olmak üzere 3 alt gruba ayırmak mümkündür. Her 3 grup ta kromozomal, genetik ve immüfenotipik yönden birbirine benzerlik izlenmektedir. EMZL'ları kemik iliği ve periferik lenf düğünlerinde izlenmesi çok nadir rastlanmakta, lokalize bir kitle olarak, mukoza ile ilişkili lenfoid dokularda (MALT) izlenen ve yavaş seyirli lenfoma türüdür. Hastaların yaşam süreleri uzunve tedaviye cevap verme oranı yüksektir. SPMZL sıklıkla

periferik kan ve kemik iliğinde bir lenfoma çeşitlidir. Ekstranodal periferik lenfodüğülerinde görünmesi çok nadirdir. NMZL yaygın olarak periferik ve kemik iliği tutuluşu nedeniyle sıklıkla ileri evrede bulunan yavaş seyirli düşük dereceli lenfoma tipidir.

Immunfenotipik özelliklerini inceleme sonunda bu grup lenfomalarda IgM ve IgG proteinlerinin sentezi yapılır ve CD20, CD79a eksprese olurken CD5, CD10 CD43, CD23, Bcl-1 (Cyclin D-1) ekspresi rastlanmıyor. Sitogenetik/Genetik incelemelerinde en önemli lezyonlardan Del7 (q21q31) ve MYD88 genin mutasyonu (MYD88 L265P) izlenmektedir(18).



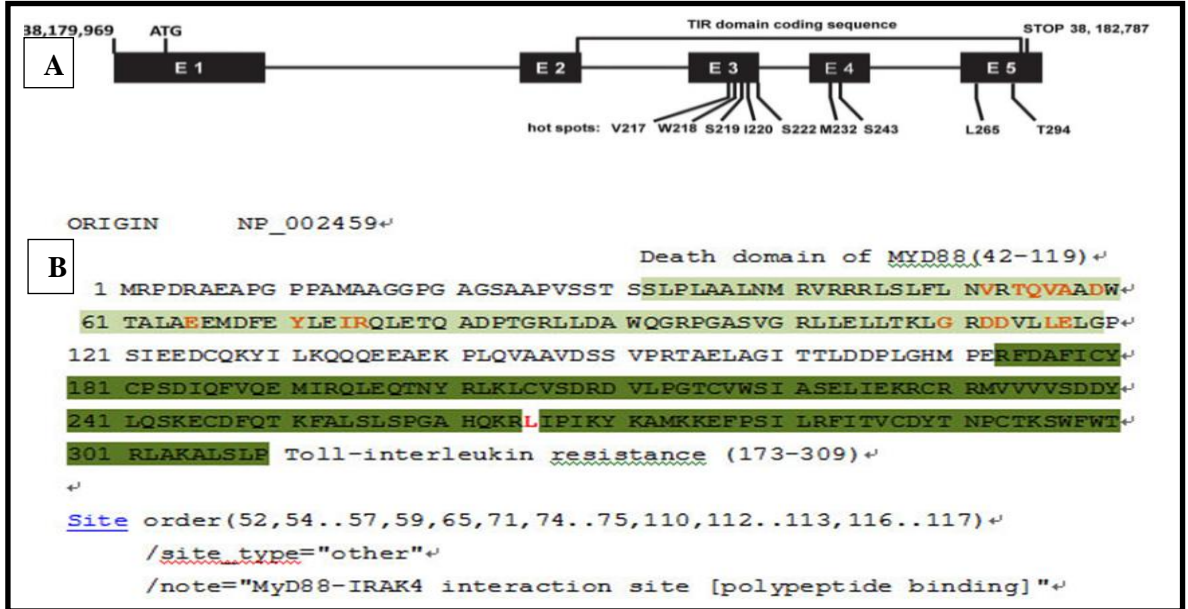
Şekil 2.10.Marjinal zon lenfoma (MZL) grubunun histolojik görüntüsü

2.6. MYD88 Geni ve Özellikleri

2.6.1. MYD88 Geninin Konumu ve Yapısı

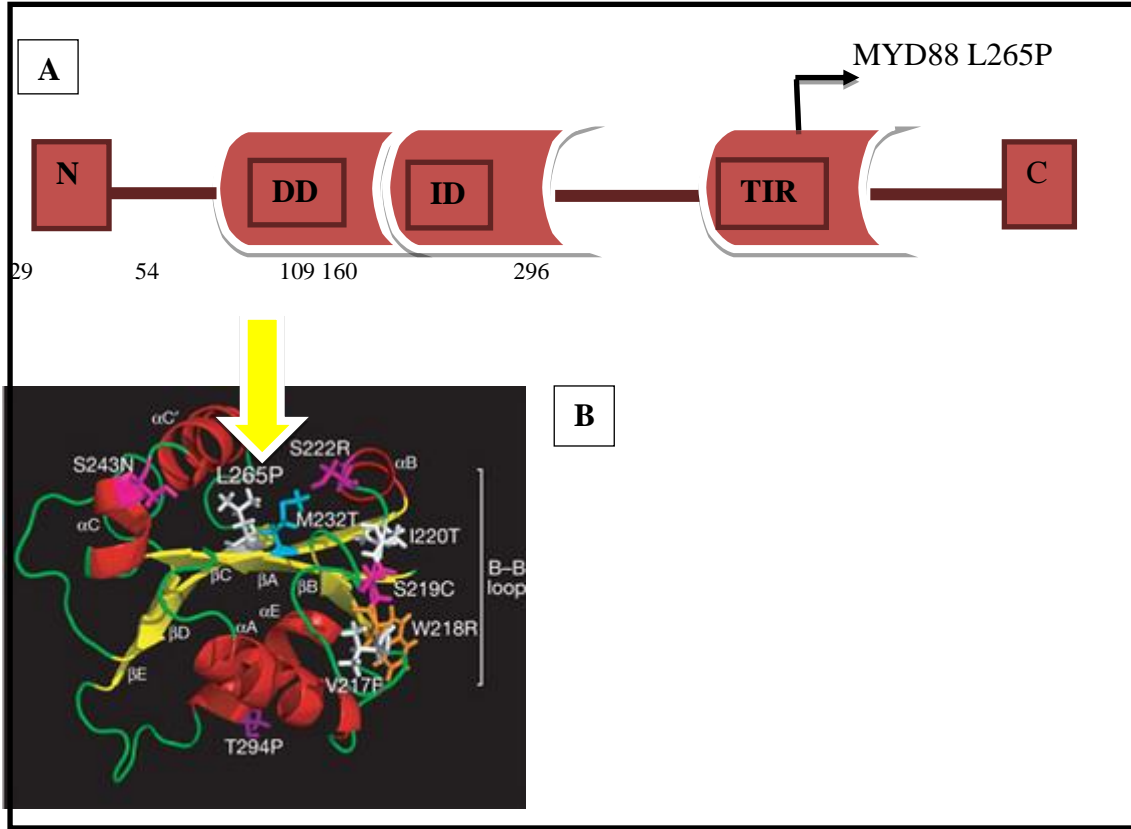
MYD88 geni, üçüncü kromozomun kolunun 22.bölgesinde (3p22.2) yer alan, 5 ekzon ve 4 intron ve 4545 bp uzunluğunda bir bölgeye sahiptir (NC_000003.11 (38179969-38184513)). Birinci ekzon DD alan (death domain) ve ikinci ekzon ID alan (intermediate domain), üçüncü ekzon TIR alanın (Toll-interleukin-1 receptor) kodlama işlemini yaparlar. Toplamda 296 aminoasitten oluşan bir protein kodlamaktadır (Ensembl:ENSG00000172936) (Şekil 2.11).MYD88 geni, spesifik olmayan (doğal/innate), spesifik immün yanıtında (edinsel/adaptif) merkezi rol oynayan bir

sitozolik adaptör protein kodlama işi yapar. Bu adaptör protein interlökin-1 (interleukin-1 receptor) ve Toll-benzeri (Toll-like receptor) reseptörlerinin sinyal iletim yolunda önemli bir sinyal dönüştürücü olarak fonksiyon göstermektedir (19). Bu yollar, çok sayıda pro-inflamatuar genlerinin aktivasyonunu düzenlemesinde rol oynar. Kodlanan MYD88 protein yapısında, N-terminalde yaklaşık 90 amino asitlik bir motifi ölüm alanı (DD (apoptoz destekleyici proteinlerinde ilk olarak tespit edilmiş buna rağmen çeşitli DD içeren proteinler apoptotik işlevi yok ve DD genel olarak protein-protein etkileşiminde işlev yapar)) ve C-terminali toll-interlökin 1 bağlanma bölgesini bulunmaktadır. TIR domainin hemofilik etkileşimlerde (kalıntılar 155-296) ve DD (kalıntılar 1-109) MYD88TLR/IL-1R yolağı üyeleri ve IRAK gibi sinyal iletişimi alt grubu proteinlerinin arasında etkileşimi sağlamaktadır (Şekil 2.12)(20, 21).



Şekil 2.11. (A):MYD88 gen yapısı (E: Ekzon) (B): MYD88 L265P mutasyonu izlenen bölgenin amino asit dizilimi.

MYD88 (Myeloid differensiyasyon faktör 88) ilk kez 1990 yılında tespit edilmiştir. İlk olarak 1991 yılında *Drosophila melanogaster*'de hücre içi bölgelerinde c terminalde bulundu 200 amino asit ve immün sistem cevabında önemli işlevi olduğuna söylenmiş "Toll geni" ne olan benzerliğinden dolayı "Toll" adı verilmiştir (22, 23).



Şekil 2.12. (A): MYD88 protein yapısının şematik görüntüsü. **(B):**MYD88 proteinin uç boyutlu yapısı ve bulunan mutasyonların yerleşmesi.

2.6.2. Toll Benzeri reseptörler (TLR) Yolağı

Toll benzeri reseptörler (Toll-like receptor, TLR) doğal immün (innate immunity) sistemin patojenler ile ilk karşılaşma aşamasında önemli rol oynayan protein yapılarıdır. Doğal immün sistem bu reseptörlere bağlı olarak patojenlerin yapısını tanır ve inflamatuvar yanıtı başlatır aynı zamanda bu reseptörler doğal immün sistem ile edilmiş immün (adaptive immunity) sistem arasında köprü görevini yaparlar. Protein yapısında olan TLR'leri, Toll genleri tarafından kodlanır. Toll geni ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından meyve sineği de (*Drosophila Melanogaster*) tanımlanmıştır (24, 25). Bu genin ürettiği transmembran proteinlerinin homologları daha sonradan memelilerde tespit edilmiş ve bu proteinler, Toll benzeri reseptörler (TLR) olarak adlandırılmıştır (26). İnsanlarda TLR ilk Nomura ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır ve bu reseptörün memelilerin gelişiminde rol oynadığı düşünülmüştür (27, 28).

TLR'ler doğal immünite de rolü olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleridir. Bu reseptörler ligandların tanınmasından sorumlu olan 3 bölümden oluşmaktadır: ekstraselüler bölüm, transmembran heliks bölümü ve sinyal yolaklarının başlangıcı olan intraselüler toll-like/interlökin-1 reseptör (TIR) bölümü, sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve bu nedenle TIR olarak adlandırılır (7). Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ekstraselüler bölümü bir hücre dışı leucine zengin tekrar bölgesi (LRR) olan ve ligandların mesela "patojenle ilişkili moleküler patternler (PAMP)" tanınması için gerekli olan ve sitoplazmik (TIR) olan domainle hücre içi sinyalleri için gereklidir. Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasında sorumlu olduğu düşünülür(29). İnsanlarda 12 adet fonksiyonel TLR mevcuttur. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 çoğunlukla hücre yüzeyinde ve TLR 3, 7, 8 ve 9 ise sitoplazmada özellikle endozomlarda intraselüler organellerin içinde lokalize olurlar (8).Toll ailesinin bütün üyeleri TLR1-TLR9 arası ve TLR11'in ligandları belirlenmiş, TLR10, TLR12 ve TLR13'ün ligandları ise belirlenmemiş transmembran proteinleridir. TLR ailesinden TLR2 ve TLR4'ün PAMPs dışında farklı endojen molekülleri de ligand olarak tanıyabildikleri tespit edilmiş. Bu ligandlar arasında "tehlike ilişkili moleküler kalıplar" (danger associated molecular patterns, DAMP) da izlenmektedir. TLR ilişkili sinyal yolaklarının aktif olması sonucunda interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin moleküllerinin yapılırken bu işlemle birlikte edinilmiş immün sistemin aktive olmasında rol oynayan "eş zamanlı uyarı (costimulatory) moleküllerinin"ekspresyonu da gerçekleşmektedir. TLR'nin endojen ve ekzojen ligandları ile sentezini indüklediği inflamatuvar mediatörleri Çizelge 2.3gösterilmektedir(30-36).

TLR'ler immün sisteminin ilk basamağında rol oynarlar. Patojenlerde konak hücrelerinde bulunmayan ve "patojen ilişkili moleküler kalıplar" (pathogen associated moleküler patterns, PAMPs) olarak adlandırılan bileşenler bulunmaktadır (37,38).Enfeksiyon sonrası makrofajlar TLR'ler aracılığıyla endojen veya ekzojen patojenlerde bulunan PAMPs'ı tanırlar. TLR aktivasyonu sonucu patojenlere karşı konakçı cevabı ve otoimmün yanıt oluşur. TLR sinyal mekanizması ile proinflamatuvar sitokin ve nitrik oksit gibi antimikrobiyal küçük moleküllerin üretimi yapılır ve makrofaj aktivasyonu ortaya çıkar. Sonunda TLR'lerin uyarılması, perifer dokular ile lenfoid dokular arasındaki iletişimi sağlayan dendritik hücre aktif olur ve bu olaylar sonunda edinilmiş immün sistemin en önemli parçası olan T-hücre aktivasyonu sağlanmıştır.

Çizelge 2.3. TLR'nin endojen ve ekzojen ligandları ile sentezini indüklediği inflamatuvar mediatörleri

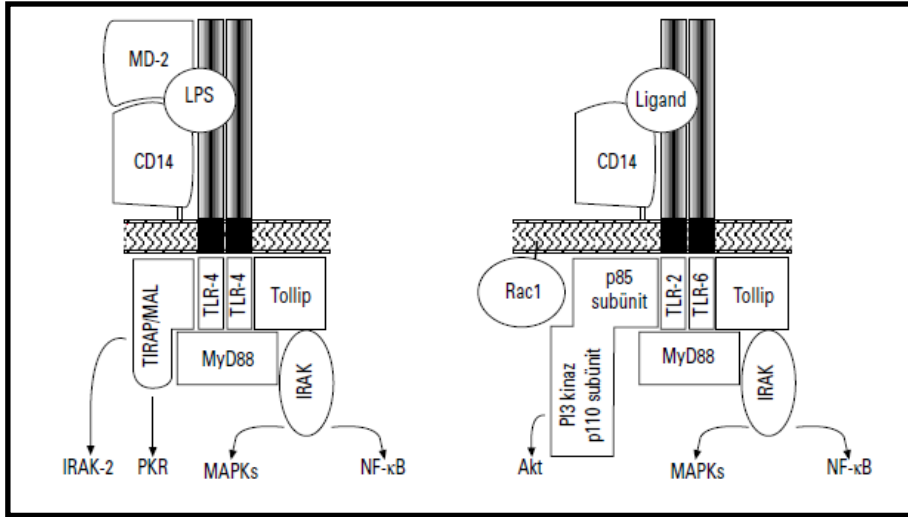
Reseptör	Endojen ligandlar	Ekzojen ligandlar	Başlıca sentezlenen inflamatuvar sitokin ve kemokinler
TLR1		Triasil lipopeptitler 6 Soluble faktörler (N.meningitidis) 7	IL-6, IL-10, TNF-alfa
TLR2	HSP 70 HMGB1 HSP 60 Nekrotik hücreler Apolipoprotein CIII	Bakteriyel Lipoproteinler Zymosan (mantar) Viral zarf glikoproteinleri Sentetik bileşikler	IL-6, TNF-alfa, IL-1beta, IL-10
TLR3	mRNA	Viral dsRNA Sentetik bileşikler	IFN-gama
TLR4	HSP60 HSP70 Fibronektin Hyaluronan Heparan Sulfat FibrinojenBeta- Defensin 2	Lipopolisakkaritler Viral zarf glikoproteinleri Sentetikbileşikler (Monophosphoryl lipid)	IFN-gama, IL-1beta
TLR5		Bakterial flagellin	IL-6, TNF-alfa, IL-10
TLR6		Diasil lipopeptitler (Mycolpasma)	IL-1beta
TLR7	ssRNA	ssRNA (Virus) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline, RNA, loxoribine, bropirimin)	IFN-gama
TLR1	ssRNA	ssRNA (Virus) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline	IFN-gama
TLR1	CpG DNA	CpG DNA (bakteri ve virus) Sentetik bileşikler (CpG Oligonukleotidler)	IFN-gama

HSP: Heat shock protein, **ssRNA:** Tek zincirli RNA, **dsRNA:** Çift zincirli RNA, **HMGB1:** High Mobility Group Box 1 Protein, **CpG DNA:** Sitozin fosfat guanin DNA)

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR olan TLR-4 tür. TLR-4'ün bir lipopolisakkaridler (LPS) reseptörü olduğu gösterilmiştir (39). TLR-4 fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD-2 ve LPS bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini

oluşturmakta ve bu moleküllerden herhangi birisi eksik olduğunda LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmektedir (Şekil 2.11). TLR4 diğer TLR'lerden farklı olarak ligandlarına doğrudan bağlanmaz. TLR4 ekstraselüler kısmın da eksprese olan MD2 adı verilen molekül, TLR4'ün ligandları ile etkileşime girmesini kolaylaştırır (40, 41).

CD14, LPS'i hücre yüzeyinde bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) protein tanımlanmıştır. Yardımcı molekül olan lipid bağlayıcı protein (LBP) ve CD14, LPS'leri bakteri membranından ayırarak, ligandın MD2'ye transferini ve TLR4 bağlanmasını sağlarlar. TLR'ler, kendi özel ligandları ile etkileşerek sinyal kaskadını aktive eder ve sonuçta immün yanıtında sorumlu olan genlerin ekspresyonunu başlatılır.



Şekil 2.11. TLR4 ve TLR2 da bağlayıcı proteini içeren molekül kompleksini şematik görüntüsü.

TLR2 ve TLR4'ün kendi ligandları (LPS veya DAMPS) ile etkileşimi "Miyeloid diferansiye edici faktör 88" (Myeloid differentiation primary response 88/MYD88) ve MYD88 adapter-like (Mal) moleküllerini içeren ortak bir intraselüler hücresel yolların aktivasyonuna neden olur. Bir sitoplazmik protein (adaptör protein), olan MYD88 tüm IL-1R ve TLR (TLR3 hariç) ailesi ile etkileşime geçebilir ve TLR ailesinin sinyal mekanizması için MYD88'in gerekli olduğu gösterilmiştir (42, 43).

Çizelge 2.4 de farklı TLR'ler de işlem sırasında kullanılan adaptör proteinleri ve yerleşim yerleri gösterilmektedir. TLR2 ve TLR1 veya TLR2 ve TLR6 heterodimer olarak lipopeptidler algılar ve TLR5 flagellin ve çift zincirli RNA, TLR3 ve küçük moleküller

mesela imidazokinolin R848 TLR8 bağlanırlar ve bu reseptörler tarafından algılanırlar(21, 44).

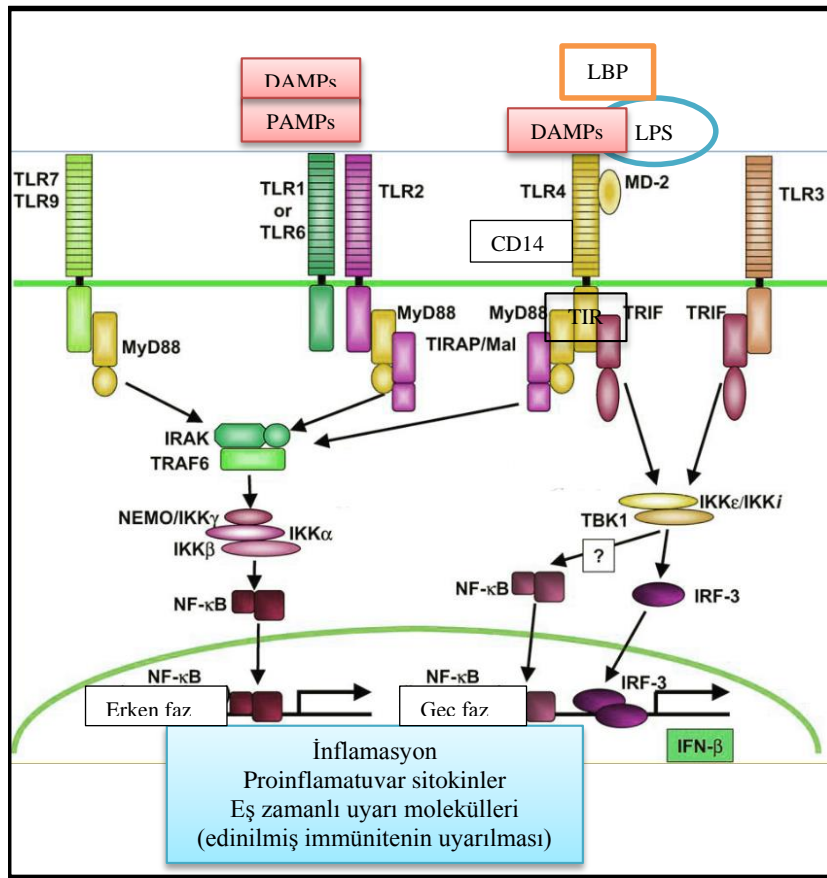
Çizelge 2.4. TLR'ler, adaptör proteinleri ve yerleşim yerleri.

Reseptör	Adaptör (Ler)	Yerleşim Yeri
TLR1	MYD88/MAL	Hücre Yüzeyi
TLR2	MYD88/MAL	Hücre Yüzeyi
TLR3	TRIF	Hücre Kompartmanı
TLR4	MYD88/MAL/TRIF/TRAM	Hücre Yüzeyi
TLR5	MYD88	Hücre Yüzeyi
TLR6	MYD88/MAL	Hücre Yüzeyi
TLR7	MYD88	Hücre Kompartmanı
TLR8	MYD88	Hücre Kompartmanı
TLR9	MYD88	Hücre Kompartmanı
TLR10	Bilinmiyor	Hücre Yüzeyi
TLR11	MYD88	Hücre Yüzeyi
TLR12	Bilinmiyor	?
TLR13	Bilinmiyor	?

MYD88: Miyeloid diferansiyasyon edici faktör 88, **MAL:** MyD88 adapter-lik, **TRAM:** TRIF-related adapter molecule, **TRIF:** TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TLR4 homodimerinin veya TLR2/TLR1 veya TLR2/TLR6 heterodimerinin ligandları ile etkileşimi intraselüler sinyal yollarının aktivasyonunu sağlar. Bu aşamadan sonra hücrel aktivasyon iki farklı yol ile gerçekleşebilir. Myeloid differansiyasyon faktör 88'e (MYD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere iki yol tanımlanmıştır. TIR, MYD88 ve MAL üzerinden gerçekleşen yolda IRAK ve TRAF6 aktivasyonu sonunda NIK ve IKK fosforilasyonuna neden olur. Burada toll benzeri/interlökin 1 reseptör (TIR), MYD88 ve "MYD88 adapter like" (Mal) moleküllerinin etkileşimi ve I κ B α kinaz (IKK) kompleksinin aktivasyonu sonucunda proteozomda bulunan 26S, NF- κ B sitoplazmada bağlı bulunan inhibitör proteini olan I κ B α parçalanır(45-47). I κ B α proteinin sitoplazmada bulunan miktarının azalması ile NF- κ B sitoplazmadan nükleusa geçerek, κ B bağımlı genleri aktive ederek proinflamatuvar sitokinler ve inflamatuvar ve immün yanıtların diğer mediatörlerinin salgılanmasını sağlayarak edinilmiş immün sistemin uyarılmasına neden olur (45-48).Bu sinyal yollunda dört adaptör molekül rol gösterir: MYD88, TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör proteini (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP)(49)(22).

Alternatif bir yol olarak (MYD88 bağımsız sinyal yolu) TLR4 ve TLR3, LPS liganda bağlanma sonrası TIR, TRAM (TRIF-related adapter molecule) ve TRIF (TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) aktivasyon sonucu IRF3 (interferon regulatory factor 3) dimerleşir. Dimer halinde olan IRF3 sitoplazmadan nükleusa geçer ve ISRE (interferon sensitive response element) ile bağlanır ve benzer etkileri olan genlerin transkripsiyonunu başlatır. MYD88 bağımsız sinyal yolu ise TLR 3 ve TLR4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR3 de TRIF üzerinden TRAF ve IRF3 (IFN düzenleyicifaktör 3) aktive ederek tip 1 interferon cevabına neden olur iken, TLR4 TRAM üzerinden TRIF'ı uyarak bu cevaba neden olur (Şekil 2.12)(24).



Şekil 2.12. Toll-benzeri reseptörler ve yolları. **TLR:** toll-like receptor; **LBP:** lipoprotein binding protein; **LPS:** lipopolisakkarit; **DAMP:** danger-associated molecular patterns; **TIR:** toll-like/interleukin-1 receptor; **MyD88:** myeloid differentiation primary response gene 88; **MAL:** MyD88 adapter-like; **IRAK:** interleukin-1 receptor associated kinase; **TRAF6:** TNF receptor associated factor 6; **IKK:** I κ -B kinase; **TRIF:** TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; **TRAM:** TRIF-related adapter molecule; **IRF3:** interferon regulatory factor 3; **PAMP:** pathogen-associated molecular pattern.

2.7. MYD88 Mutasyon Tarama Yöntemleri ve Materyal

2.7.1. DNADizi Analizi Yöntemi

DNA dizileme teknolojileri biyoloji ve sağlık alanında, moleküler incelemelerde, patojenik genlerin bulunması, genetik kontrol mekanizmaları, metilasyon analizleri, gen yapısı hakkında çalışmaları gibi çok çeşitli uygulamalarda yardımcı olmaktadır. DNA dizileme teknolojilerinin hızlı, kesin, kolay uygulanabilir ve az maliyetli olması gerekmektedir.

1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi yıllar içinde gelişmiştir. 1965 yılında Robert HOLLEY tarafından 74 nükleotid olan bir tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. 1977 yılında Allan MAXAM-Walter GİLBERT DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve Frederick SANGER zincir sonlanma esasına dayanan DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur (50, 51). Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniğidir. Dizi analizi yöntemi yüksek verimliliği ve düşük radyoaktivitesinden dolayı laboratuvar ve ticari dizileme uygulamalarında birincil yöntem olarak kabul görmüştür. Geçtiğimiz yıllarda, DNA dizileme teknolojileri konusunda çok önemli gelişmeler elde edilmiştir. Büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda analiz gerektiren nükleotid sayısının artması, daha fazla zaman ve yüksek iş gücü ihtiyacı gerekmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojileri, otomatik DNA dizi analizleri zaman kazandırmaları yanı sıra, düşük maliyet, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve güvenilirliği sağlamıştır (52-54). Otomatik DNA dizi analizi zincir sonlandırma PCR ve elektroforez temeline dayalıdır.

Bu çalışmada, ABI 3130 DNA dizi analizi sistemi kullanılmıştır. Bu sistem önceki sistemlerden (ABI Prism 310) farklı olarak poliakrilamid jel matris sistemine karşı, kapiler yapıları içine doldurulan polimer jel matris bulundurulur (50). Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen zincir sonlandırma yöntemi daha kolay ve güvenilir olmasından dolayı en tercih edilen yöntem olmuştur. Otomatik DNA dizi analizi tekniği, Sanger zincir sonlanma esasına dayanmaktadır. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra

deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon hazırlanır. Her bir reaksiyonda kalıp DNA zinciri, bir primer çifti, dNTP'lerin dördü ve az miktarda ddNTP'lerden birini içerir (Şekil 2.13).

Primerler: Dizi analiz yönteminde istenilen DNA kalıbının çoğaltılması için gerekiyor. Dizi analiz için özgül oligonükleotitlere yani primerlere ihtiyaç vardır. Primer çiftleri kullanılacak kalıp DNA'nın genomik DNA'dan eldesinde, çoğaltılmasında kullanılır. primerler yöntemin son aşaması olan sonlanma reaksiyonunda polimeraz enzimi için uygun 3' ucu sağlar. Her iki reaksiyondaki primer çifti aynı olabileceği gibi farklı primerler de kullanılabilir. Sekanslama reaksiyonunda tek bir primer kullanılır ve böylece reaksiyon yönü tayin edilmiş olur.

Kalıp DNA: Dizi analizi zincir sonlanma yönteminde hem çift, hem de tek zincirli DNA kullanılabilir. Yöntemin ilk aşamasında polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile elde edilen ve çoğaltılan DNA parçası kalıp DNA olarak adlandırılır.

Enzimler: Dizi analizi zincir sonlanma yönteminde birçok tip DNA polimeraz enzimi kullanılabilir. Bu enzimlerin ortak özellikleri özgül ve hassas olmalarıdır.

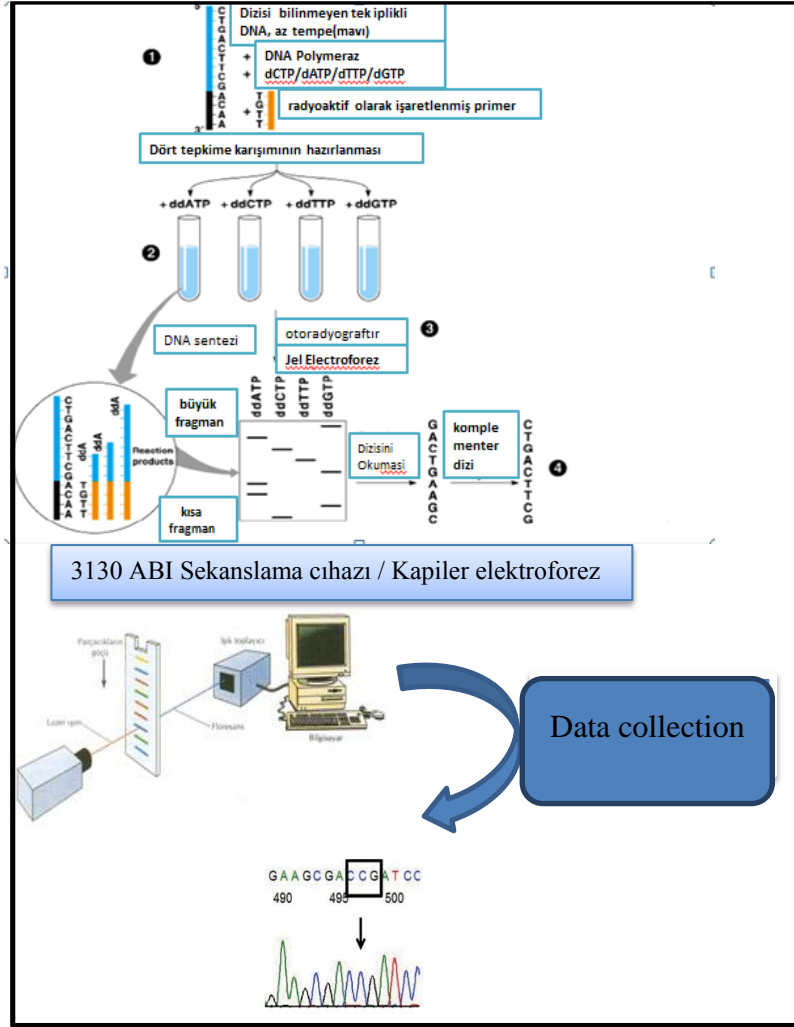
Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA parçaları (DNA fragments) meydana gelir.



Şekil 2.13. DNA dizi analizi Sanger zincir sonlandırma metodu şematik görüntüsü

Otomatik DNA dizi analiz cihazları kapılar elektroforez sistemi mevcuttur. Kapılar elektroforez son on yılda genetik, mikrobiyoloji, biyokimya, klinik, protein, ilaç, adli tıp ve nükleik asit vb gibi birçok alanda moleküllerin ayırımında ekonomik bir yöntem olarak geniş kullanım alanı bulmuştur.

Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık deneti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Otomatik DNA dizi analiz yönteminin genel işlemsirasi şematik görüntüsü

2.7.2. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR (RT-PCR))

1993 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarında, oluşan PCR ürünlerinin tarayan bir sistem düzenlenmiş. PCR ürünlerinde kinetiğini ölçen bir eş zamanlı sistem ve her reaksiyon ürünü tespit için etüdüyüm bromür ve ultraviyole ışığı karşı floresans ışımaya kullanarak ve sonuçları toplayacak bir kamera eşliğinde ve bilgisayar sistemiyle incelenir. Real-time PCR yöntemi çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin niteleyici (kalitatif) özelliğini saptanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Real-time PCR yöntemi, daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden ayıran özelliği vardır. Real-time PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sistemin kullanılmaktadır (55). Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyal kullanan çalışmalarda çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç

duyulur. "Real-time PCR" metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, niceleyici (kantitatif) sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir (56). Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır.

Hasta örneklerinden elde edilen DNA'lari, hedef gen bölgesine uygun iki çeşit primer kullanarak (yabancı (wide)-mutant tip) kantitatif real time PCR yöntemini çalışılmıştır. Bu yöntemle nicel ve nitel ölçüm yapılmaktadır. Real time PCR' da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli yöntemlerle yapılabilir.

MYD88 geninin, L265P mutasyonunu saptamak için ikinci yöntem olarak kantitatif real time PCR tekniği kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PCR sistemi, polimeriz zincir reaksiyonlarında bulunan sonuçlarına ulaşmak için fazla işlem yapmadan, hem zaman kazanarak yapılmaktadır. PCR amplifikasyonunu eş zamanlı olarak görüntülemesini sağlarken, tek bir reaksiyon bilgilerini çok iyi bir seviyede elde etmek üzeri geliştirilmiş bir sistemdir. Real-time PCR işlemi ile çoğaltılmış olan hedef dizilerin görüntülenebilmesi amacıyla kullanılan çeşitli problar ve boyalar mevcuttur. Buradaki temel amaç, çoğaltılmış olan PCR ürünleriyle, kullanılan prob/boya etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. Bunun sonucunda hedef DNA'ya floresan veren boyaların bağlanmasıyla DNA kantitasyonu ölçmek mümkün olabilmektedir. Bu yöntem çok yüksek duyarlılık ve hassasiyete sahiptir. PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir. Bunlardan birincisi özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu yöntemde, çift zincirli DNA'ya özgül olmadan bağlanan özel boyalar ve DNA'ya özgül problar kullanılmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan boya molekülleri "SYBR Green I" ve "SYBR Gold"dur. Bu boyaların çift zincirli DNA arasına

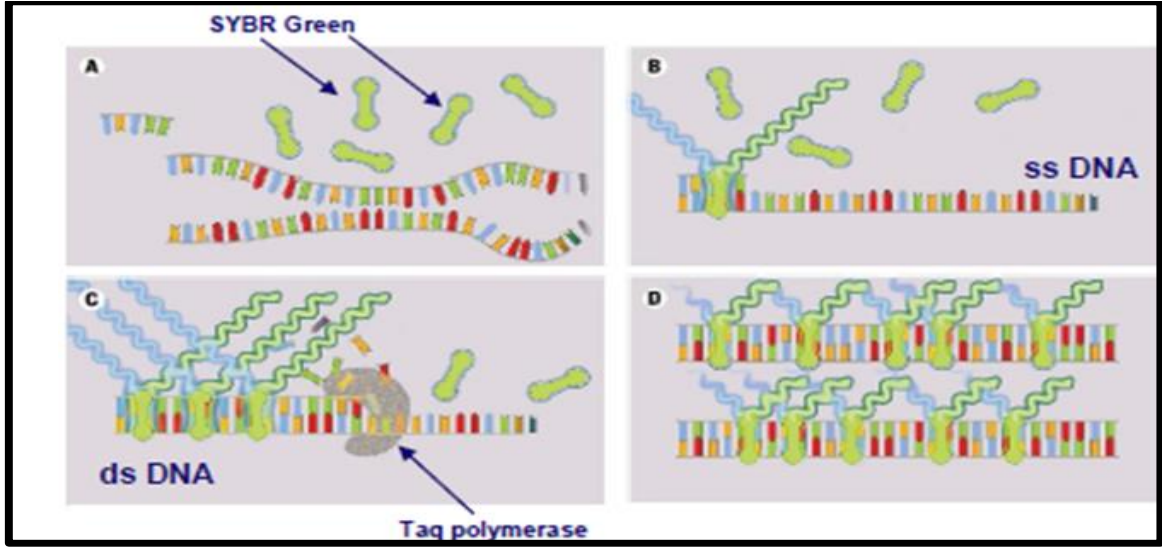
girerek bağlanması sonucunda 20-100 katlık bir floresan ışımaya artışı olur ve bu ışımaya real-time PCR cihazı tarafından algılanır (57).

Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR Green" miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir. "SYBR Green", yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan veren bir boyadır. Ancak floresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermeyebilir (Şekil 2.15). Çünkü ortamda hedef DNA bulunmadığı durumlarda "SYBR Green", primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda bu yapılara katılarak floresan oluşumuna neden olabilmektedir. Böyle durumlarda elde edilen floresan ışımının istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır (Şekil 2.16). Her çift sarmal DNA kendine özgü "melting temperature, T_m" (çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir(58). PCR amplifikasyonu sonrasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresan miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başlayınca "SYBR Green" boyası serbest kalır ve floresan miktarı azalmaya başlar. Erime eğrisinden yararlanılarak T_m derecesi hesaplanır. Klinik örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak PCR sonucu elde edilen ürünün özgül ürün olup olmadığına karar verilir. T_m dereceleri aynı ise, aranan hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş demektir. Farklı T_m dereceleri saptanması durumunda, elde edilen amplifikasyonun özgül olmayan bir ürüne ait olduğu sonucuna varılır.

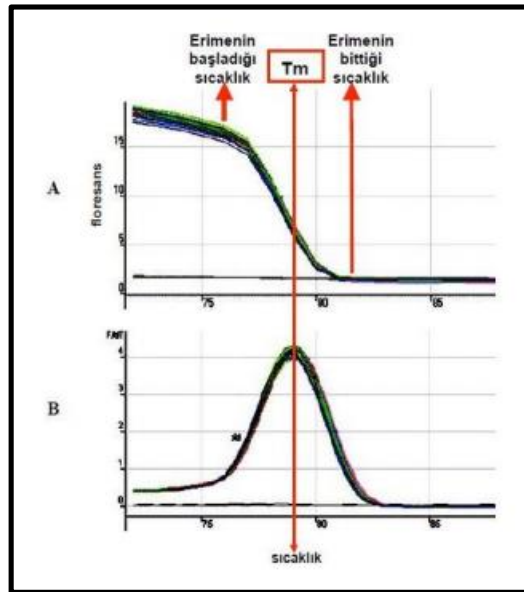
Bu sistem gen ekspresyonunun miktarını belirlemekte ve tek nükleotid polimorfizmlerinin tayini, patojenlerin tespitinde, metilasyon tespitlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde erime eğrisi analiz programları kullanarak, daha önceki sistemlerle karşılaştırarak daha zengin ve güvenilir bilgi elde etmemizi sağlamaktadır. Real time sistemlerinde hızlı ısı döngüsü kullanılmıştır bu nedenle PCR daha kısa sürede tamamlanır. PCR uygulanmalarında optimum performansa ulaşabilmek için gelişmiştir.

Real time PCR da 4 farklı tarama yöntemi vardır. Bu sistemler PCR ürünü oligonükleotidlerin eklenmesi sırasında floresans ışımaya ölçmek için kullanılır.

Amlifikasyon başlangıç noktasında tüp içinde "SYBR Green", DNA, primerler var. Primerler hedef gen bölgesine bağlanmasıyla ve çift sarmal DNA yapısına katılmakla floresan miktarı artmaktadır.



Şekil 2.15. SYBR Green tekniği. **A:**Başlangıç aşaması: bu aşamada reaksiyonda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresan ışınma yoktur. **B:**Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'da az miktarda floresan sinyal yapar. **C:**Primer uzaması: Amplifikasyon miktarına bağlı olarak çift zincirli DNA'ya fazla boya ilave ederek floresan sinyal artar



Şekil2.16. Erime eğrisi analizi. **Tm:** Erime sıcaklığı

2.7.3. Materyal Özellikleri

MYD88 L265P mutasyonunun, plazma hücre farklılaşması gösteren düşük dereceli B hücreli lenfomalarında bu grup hastalıklarda tanı için ve onun ardından uygun tedavi yapılması için çok önemli rolü vardır. Bu nedenle bu mutasyonu tanı için güvenilir bir materyal tıpi (FFP/yayma) ve hastalardan alınan doku (lenf nodu/kemik iliği/dalak) seçilmesi lazım.

Çoğunlukla patoloji laboratuvarında kullanılan standart fiksatif %10'luk formalindir. Formalin formaldehitin sudaki %40'lik çözeltisidir. Dolayısı ile %10'luk formalin dendiğinde aslında %4 formaldehit anlaşılmalıdır. Formalin her türlü materyalin rutin fiksasyonu için kullanılabilir. Ucuz olup, doku bozulmaksızın uzun süre saklanabilir. Formalinde tespit edilen dokulara birçok özel boya ve immünohistokimya uygulanabilir. Genel olarak, cerrahi materyalden elde edilen doku örneklerinin en uygun tespiti için 24 saat kadar (ya da en azından bir gece) formalinde kalması önerilmekte ise de, küçük doku örnekleri için 24 saatlik bir süre pratik değildir. Bir başka doku fiksasyonu için kullanılan materyal hollande solüsyonudur. Bizim yaptığımız çalışmada formalin ve hollande kıymamalarında fikseeden örnekleri kullanıldı. Hollanda dokuları kırılğan hale getirir ve eritrositler lizize uğratar ve içindeki pikrik asit deneyiyle DNA degradasyonuna yol açabildiğinden, intakt DNA gerektiren çalışmalarda kullanılmasıyla çelişebilir.

Doku çalışmalarda en yaygın olarak iki tip materyal kullanılır. Yayma şeklinde preparatlar ve parafinde gömülmüş dokular. Bu işlemin amacı dokularda bulunan fazla sumiktarını dengelemektir. Alkole bu suyun çıkarılmasına yardımcı olarak yanısıra erimiş parafin doku parçalarının boşluklarına girerek, böylelikle dokular büzülmeden sudan kurtarılır. Bu işlemler sırasında dokular yüksek sıcaklığa maruz kalarak dokulara zarar vererek yapılan moleküler çalışmalarda DNA kalitesinin düşmesine neden olur.

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Bu tez kapsamında düşük dereceli B hücre lenfomalar incelenmiştir. Olgun B hücrelerden köken alan bu grup lenfomalar arasında lymphoplasmacytic lymphoma (LPL), Waldenström makroglobulinemi (WM), splenic marginal zone lymphoma (SMZL), marginal zone lymphoma (MZL) ve çok az sayıda başka düşük dereceli B hücre lenfomalar (küçük lenfositik lenfoma (SLL)/kronik lenfositik lösemi (CLL), multipl myeloma (MM)) plazma hücrelerinin eşlik edebildiği ve ayırıcı tanı güçlüğü bulunduran B hücreli lenfomalardır. Morfolojik olarak sınıflandırılmış ayırıcı tanı bulunduran bu grup lenfoproliferatif neoplazilerde moleküler süreçlerde Toll like reseptör ilişkili yollarda bulunan MYD88 geni L265P mutasyonunun varlığı gösterilmiştir. Ancak buna rağmen klinik ve patolojik özellikleri ile bu gruptaki neoplazilerin profilini yansıtan vakaların tümünde MYD88 L265P mutasyonu bulunmaz. Bu negatif sonuçların bir kısmının gerçek negatiflik mi yoksa incelenen materyalin uygun bulunmamasından mı kaynaklandığı tartışılmalıdır. Patolojik değerlendirmede kullanılan materyalin niteliği ve saklanma koşulları elde edilen DNA kalitesi ve PCR başarısını değiştirebilmektedir. Testlerde güvenilir sonuç elde edebilmek için bu faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Bu çalışmayı planlarken hipotezlerimiz:

- 1- Plazma hücre farklılaşması bulunduran ayırıcı tanı güçlüğü gösteren düşük dereceli B hücreli lenfoma hastalarının örneklerinde MYD88 L265P mutasyonunun tesbitinde kullanılan yöntemlerin duyarlılığı ile ilişkili farklılıklar bulunmaktadır.
- 2- Yöntemlerin duyarlılık farkı yanında bu hastalıkların tanısı için elde edilen materyallerin saklanma ve işlem koşullarının, materyal içerisinde bulunan tümör hücre oranlarının da mutasyon tesbitinde rolü bulunmaktadır.

Bu çalışmada amaçlarımız:

- 1- Serimizde Plazma hücre farklılaşması bulunduran SMZL, LPL/WM, NMZL, KLL/SLL gibi düşük dereceli B hücreli lenfomaların ayırıcı tanısında Toll like reseptör ilişkili yollarda bulunan MYD88 geni L265P mutasyonunun dağılımının gösterilmesi.

- 2- MYD88 geni L265P mutasyonunun incelenmesinde kullandığımız dizi analizi ve RT-PCR yöntemlerinin mutasyon gösterimi açısından farklarının gösterilmesi.
- 3- Yöntemler dışında lenfoid hücre oranı ve test sonuçlarını etkileyen diğer faktörlerin etkilerini değerlendirmek şeklinde belirlenmiştir.

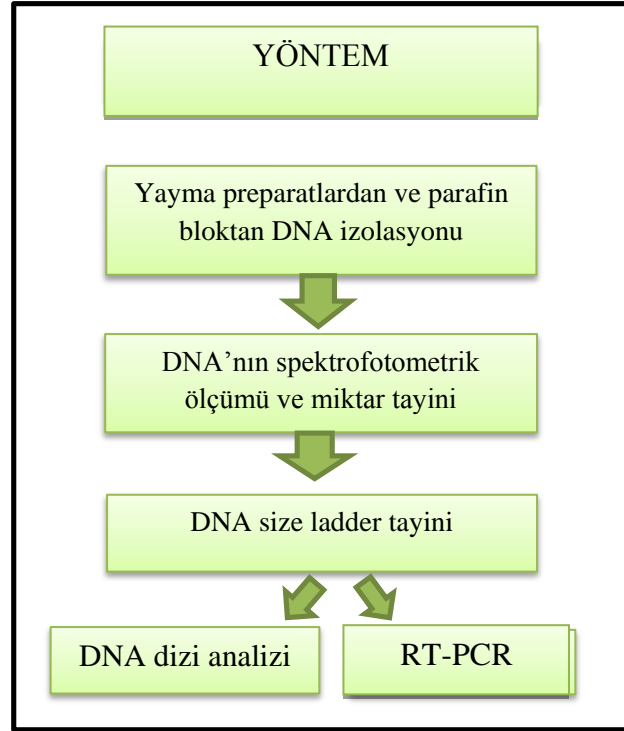
4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

Geriye dönük olarak 2008-2014 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD arşivinde bulunan 13 lenfoplazmasitik lenfoma (LPL), 9 marginal zon lenfoma (MZLNOS), 17 splenic marginal zone lenfoma (SMZL) ve 23 farklı plazma hücre farklılaşması ve/veya paraproteinemi bulguları olan düşük dereceli B hücreli lenfoma tanısı almış toplam 63 hastaya ait, dalak, lenf nodulu veya ektranodal tutulum gösteren doku örneklerine ait parafin bloklardan elde edilen kesitler ve/veya kemik iliği aspirasyon yaymaları çalışmada kullanılan materyali oluşturmaktadır. Kemik iliği biyopsilerinin tesbit ve takibine bağlı PCR başarısını negatif yönde etkileyen faktörler nedeniyle hastaların biyopsi ile birlikte gönderilen aspirasyon yaymaları kullanılmıştır. Hastaların tanısal özelliklerinin belirlenmesinde ve kullanılan materyalin sınıflandırılmasında, neoplastik hücre oranının belirlenmesinde immunhistokimyasal inceleme sonuçları ve/veya hastahane bilgi sisteminden alınan akımsitometri, bulguları gibi diğer laboratuvar verileri kullanılmıştır. Bu şekilde patoloji arşivinde bulunan düşük dereceli B hücreli lenfoma tanılı hastalara ait kemik iliği yayma örneklerinden uygun olanları ve parafin doku örneklerinden yapılan kesitler DNA elde etmek için kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

Çalışma kapsamında incelenen olgular histopatolojik olarak yeniden değerlendirilerek gruplandırılmıştır. Yöntem sıralaması Şekil 4.1'de belirtildiği sıra ile yapılmıştır.



Şekil 4.1. Yapılan çalışmada temel olarak uygulanan yöntemlerin işlem sırası

4.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen örneklerin Qiagen, QiaAmp DNA FFPE Tissue Kit (katalog no: 6404) kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için aşağıdaki protokol izlenmiştir:

- 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne alınan 10 mg'dan az doku örneğinin üzerine 180 µl buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenir. 15 saniye vortekslenir.
- Tüp çalkalamalı inkübatöre yerleştirilir ve 56°C'de gece boyu inkübe edilir.
- 90°C'de 1 saat inkübe edilir.
- 200 µl buffer AL eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
- 200 µl soğuk saf etanol eklenir. Dikkatlice karıştırılıp 15 saniye vortekslenir. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir, spin yapılır.
- Lizat, membrana değmeden "QIAamp minElute Coloumn"a aktarılır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

- 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolon temiz tüpe aktarılır.
- Membrana değmeden 500 µl buffer AW1 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolon temiz tüpe aktarılır.
- Membrana değmeden 500 µl buffer AW2 eklenir. 8000 rpm (6000g)'de 1 dakika santrifüj edilir. Collection tüpünün içindeki sıvı dökülür ve tekrar kolona yerleştirilir.
- Membranın tamamen kuruması için 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Membrana değmeden tam merkezine 20-100 µl buffer ATE veya distile su eklenir.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Son iki basamağı tekrarlanır. Kolonlar atılıp tüplerin kapakları kapatılır.

4.2.2. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini

Spektrofotometrik olarak DNA'nın saflığının ve konsantrasyonu belirlenmesi için nanodrop kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Spektrofotometrik analizi ve miktar tayini sırasında DNA'nın saflığı değerlendirilirken A 260/280 ve A 230/280 oranları dikkate alınmıştır. Saf DNA için A260/280 oranı 1.8 ve A260/230 oranı 2.2 değerleri sınır kabul edilmiştir. Bu çalışmada da bu prensipleruygulanarak DNA saflık ve miktar analizi yapılmış ve her vaka için kaydedilmiştir.

4.2.3. Kalite Kontrol (Size Ladder) PCR

Preparatlarından elde edilen DNA örneklerinden, izole edilen DNA'ların, formalin fiksasyonu ve parafin takibi sırasında gerçekleşebilecek DNA parçalanmasının düzeyinin anlaşılması için farklı boyutlarda "house keeping" genlerini çoğaltan primerler ile multipleks PCR yöntemi yöntemi kullanılmıştır. Bu genler insan thromboxane synthase gene (TBXAS1, exon 9; GenBank accession no. D34621), insan recombination activating gene (RAG1, exon 2; GenBank accession no. M29474), insan promyelocytic leukemia zinc-finger gene (PLZF, exon 1; GenBank accession no. AF060568), insan AF4 geni (exon

3; GenBank accession no. Z83679, and exon 11; GenBank accession no. Z83687). 100, 200, 300, 400 ve 600 baz boyutlarında olan gen bölgelerini çoğaltmak için tasarlanmış 5 farklı primer çiftleri, hot start PCR enzimi bulunmaktadır. Size Ladder PCR için Invivoscribe (katalog no: 01-456-7) kiti kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kalite kontrol PCR protokolü

Malzeme	1 örnek için miktar
Mix	22.5 µl
DNA	2.5 µl
Thermostart Taq polimeraz	0.125 µl

Amplifikasyon Programı

95°C'de 7 dk
95°C'de 45 sn
60°C'de 45 sn
92°C'de 90 sn
72°C'de 10 dk
12°C'de bekletilir.

} 35 döngü

4.2.4. Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen DNAların bütünlüğünü kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmiştir. Size ladder PCR'ı yapılan DNA'ların PCR ürünlerinin kalite ve boyutunu kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmiştir. Görüntüleme için Viber Lourmat sistemi kullanılmıştır.

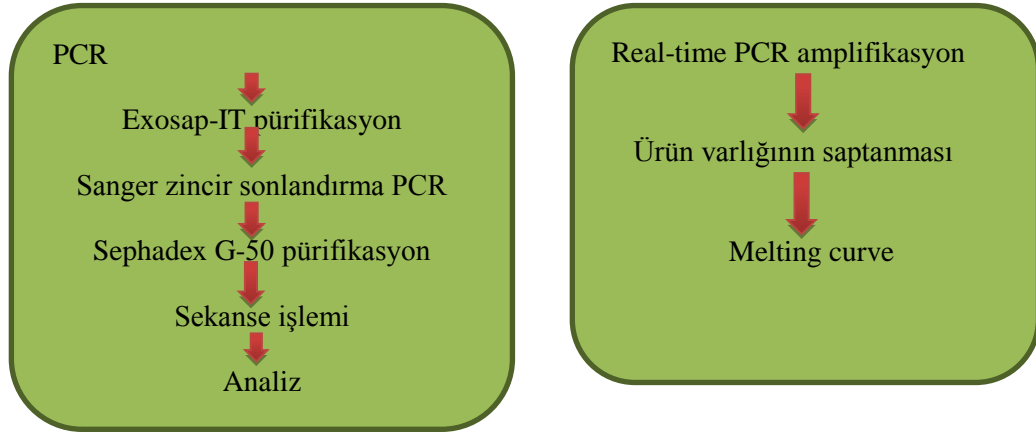
Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonların hazırlanışında aşağıdaki protokol izlenmiştir:

- Etidyum bromür son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılır.
- 5X TBE (Tris-HCL, Borik Asit, EDTA) hazırlanması için 54 gr Tris Base (Tris-HCL (katalog no:77-86-1)), 27.5 gr Borik asit (katalog no: 10043-35-3) ve 20 ml 0.5 M EDTA (katalog no: 6381-92-6) deiyonize su ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.

- 5X TBE'nin iyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması ile 1X TBE hazırlanır.
- Agaroz; %2'lik jel için 2gr/100 ml olacak şekilde hassas terazide tartılır. Üzerine 100 ml 1X TBE eklenip mikrodalgada agarozun çözünmesi sağlanana kadarısıdır. Sıcaklığı akan su altında 40°-50°C'ye düştükten sonra, 3-4 µl ETBR eklenir iyi homojen olduktan sonra jel trayine dökülüp katılaşması için 40 dk beklenir.
- %2'lik agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirilir. 10 µl DNA ve 3 µl boyayla ile karıştırılarak jelin kuyucuklarına yüklenir. Örnekler, 110 voltta 20 dakika yürütülür. Jel, UV görüntüleme cihazı ile görüntülenerek fotoğraflanır.

4.2.5. MYD88 Mutasyon Analiz Yöntemleri

Otomatik DNA dizi analizi/RT-PCR



Şekil 4.2. Otomatik DNA dizi analizi/RT-PCR da yapılan işlem sırası.

4.2.5.1. Otomatik DNA Dizi Analizi

MYD88 geni ekzon 5 L265P mutasyonunu saptamak için birinci yöntem olarak otomatik dizileme tekniği kullanılmıştır. DNA örnekleri hedef gen bölgesine uygun Çizelge 4.2 de verilen primerler ile PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü, 3130 ABI kapiler elektroforez temelli DNA dizileme sistemi kullanılarak hedef mutasyon incelenmiştir.

4.2.5.1.1. PCR Reaksiyonu

ABI PCR kiti (katalog no: 306702) kullanılarak MYD88 ekzon 5 L265P mutasyonuna özel tasarlanmış primerler ve optimize edilmiş PCR protokolü, PCR reaksiyonları hazırlanmıştır. Master mix hazırlanır. Her örneğin her amplikonu için bir PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Bu aşamada Çizelge 4.2’de bulunan primerler ve Çizelge 4.3’de belirtilen protokol takip edilmiştir.

Çizelge 4.2. MYD88 ekzon 5 PCR için kullanılan primer dizileri

MYD88 ekzon 5 forward primer
5'-GGATGGCTGTTGTTAACCC-3'
MYD88 ekzon 5 reverse primer
5'-GAATTGAGAGGTAAGTAGAGCAC-3'
Amplikon uzunluğu 342 baz çifti

DNA örnekleri moleküler biyoloji grade su ile 100 ng/μl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Liyofilize halde sentezlenen primerler, son konsantrasyonları 15 pmol/μl olacak şekilde deiyonize su ile sulandırılmıştır. Stok primerin 10x sulandırılması suretiyle 15.5 pmol/μl konsantrasyonda primerler hazırlanıp, PCR master mix 22.5 μl olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve her tüpe 100 ng/μl konsantrasyonda 2.5 μl’e DNA konulmuştur.

BİO-RAD termal cycler’da Çizelge 4.4’de belirtilen protokollerle PCR yapılmıştır.

Çizelge 4.3. MYD88 ekzon 5 PCR protokolü

Malzeme	Örnek İçin miktar	Stok Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
Moleküler biyoloji grade su	15.5 μl	15.5 μl	
Fast start buffer	2.5 μl	10X	1X
d NTP mix	2.5 μl	10 mM	0.2 mM
Forward/Reverse primer	0.5μl	10 pmol	0.4 pmol
Hot start polimeraz	0.25μl	5 U/μl	0.05 U
DNA	2.5μl	25 ng/μl	50ng/μl
Mgcl2	2 μl	5 U/μl	
Toplam	25μl		

Çizelge 4.4. MYD88 ekzon 5 PCR programı

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık (°C)
Başlangıç denatürasyonu	1	7 dk	95°c
Denatürasyon	35	30 S	95°c
Annealing		30 S	61°c
Uzama		10 dk	72°c
Son uzama	1	10 dk	72°c

4.2.5.1.2. PCR Exosap-IT Pürifikasyonu

Exosap-IT hızlı ve etkili, polimeraz zincir reaksiyon (PCR) ürünleri, alt grup uygulamalar için mesela dizi analizi, genotipleme (SNP analizi), klonlama gibi işlemlerde kullanılmaları için bir saflaştırma yöntemidir. Exosap-IT iki hidrolitik enzim den oluşmaktadır. Exonuclease I (Tek iplik primerler ve PCR ürünleri indirmek) ve shrimp alkaline phosphatase (PCR miksinden kalan dNTPleri indirmek (SAP)) ve bir özel formül tampon içerir ki istenmeyen primerler ve dNTP leri PCR ürünü karışımından uzaklaştırılması ve sonraki uygulamalara katılmasını engellemek için kullanılır (Şekil 4.3) (Çizelge 4.5).

GML Exosap-IT pürifikasyon kiti (katalog no:1306102) kullanılarak Pürifikasyon reaksiyonları hazırlanmıştır. Her örnek için bir reaksiyon hazırlanmıştır.

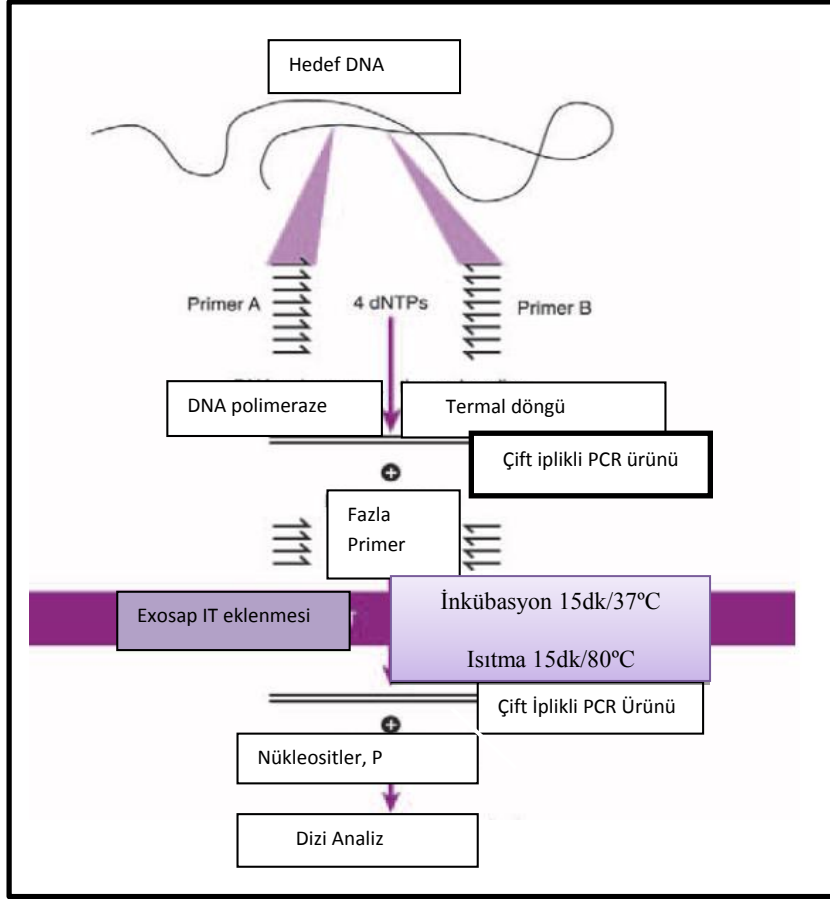
BİO-RAD termal cycler'da aşağıdaki protokolü kullanılarak pürifikasyon reaksiyonu yapılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Exosap-IT pürifikasyon protokolü

Malzeme	1 örnek için miktar
Exosap-IT mix	2µl
PCR ürünü	5µl
Toplam	7µl

Çizelge 4.6. Exosap-IT pürifikasyon programı

Basamak	Döngü	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
İnkübasyon	12	30 dk	37°C
Isıtma	10	15 dk	80°C



Şekil4.3. ExoSAP-IT PCR temizlik yönteminin şematik diyagramı (<http://www.iwai-chem.co.jp/products/usb/exosap-it.html>)

4.2.5.1.3. Dizi Analizi Zincir Sonlandırma PCR

Enzimatik DNA sentezine dayalı dizi analizi tekniği olan otomatik dizi analizi yöntemi, olan zincir sonlanma prensibi kullanılmıştır.

BIO-RAD termal cyclus cihazında aşağıdaki protokol kullanılarak zincir sonlandırma PCR yapılmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Dizi analizi yönteminde kullanılan zincir sonlandırma PCR protokolü

Malzeme	1 örnek için miktar	Stok Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
Moleküle biyoloji grade su	2µl	15.5 µl	
Dye terminatör mix	2µl	10X	1X
Sequence buffer	2µl	10 mM	0.2 mM
Forward/Reverse primer	2µl	10 pmol	0.4 pmol
PCR ürünü	2µl	5 U/µl	0.05 U
Toplam	10µl	25 ng/µl	50ng/µl

ABI dizi analiz zincir sonlandırma PCR kiti (katalog no:88563) kullanılarak sekans reaksiyonları hazırlanmıştır. Her örnek için bir forward ve bir reverse reaksiyonu tüpü hazırlanmıştır. BİO-RAD termal cyler cihazında aşağıdaki protokol izlenerek zincir sonlandırma PCR reaksiyonu yapılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Dizi analizi için zincir sonlandırma PCR programı

Basamak	Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	1	95°C	1 dk
Denatürasyon		96°C	10 s
Annealing	24	58°C	4 dk
Uzama		60°C	4 dk
Son uzama	1	72°C	10 dk

4.2.5.1.4. Dizi Analizi Zincir Sonlandırma PCR Pürifikasyonu

Sephadex G-25 ve G-50 jel proteinleri, dizi analizi zincir sonlandırma PCR pürifikasyonu için kullanılmıştır

Çizelge 4.9. Zincir sonlandırma PCR pürifikasyonu için kullanılan sephadex G-50 jelkromatografi protokolü

Malzeme	1 örnek için miktar
Sephadex	2.5 µl
ddH2O	2.5 µl
Toplam	5µl

Protokola bağı, GML sephadex G-50 materyali (katalog no: 10054) kullanılarak jel hazırlanmış (Çizelge 4.9), her örnek için bir forward ve bir reverse kolon hazırlanmış ve jel klonlara dağıtılarak 5000 rpm de 1 dk santifuje yapılmıştır. Kolonda oluşan plate üzerine zincir sonlandırma PCR amplikonunu tamamı ilave ederek yeniden 5000 rpm de 1dk santrifuje yapılmıştır. Bu sayede plate deterjanlar, radyoaktif veya floresan etiketler ve DNA saflaştırma sırasında fenol gibi büyük biyomoleküllerin, uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Bu aşama sonunda saf dizi analizi ürün elde etmesi amaçlanmıştır.

4.2.5.1.5. ABI 3130 Dizi Analiz Cihazının Çalışma Protokolü

Örnek hazırlandıktan sonra cihazda bulunan örnek tepsisine yerleştirilir ve cihaza başlama komutu verilir. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır:

- Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığı elektroforez için uygun sıcaklık olan 50°C' ye çıkması sağlanır.
- Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin çubuğunun serbest ucu örnek yüklü ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.
- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsi üzerine hareket ederek örnek içerisine girer.
- Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alan tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.
- Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
- Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.

- Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V' ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder.
- Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları (sequence analysis) ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır.

4.2.5.2. Allele Özel Eş Zamanlı PCR (RT-PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Gena firması tarafından üretilen ligh cyclers cihazında yapılmıştır. Bizim yaptığımız RT-PCR çalışmasında farklı heterozigot bilinen bir MYD88 L265 mutasyonu taşıyan bir örnek DNA ları farklı oranlarda (%60, %30, %15, %10, %5, %2.5, %1, %0.05) seyreltilmiş olarak denenmiştir. %1 konsantrasyonun da beklenen sonuç izlenmiştir. Daha önceden otomatik dizi analizi olarak çalışan 63 hasta sonuçlarını kontrol ve karşılaştırmak amacıyla RT-PCR yapılmıştır. Eş zamanlı PCR sonuçlarını pozitif kontrolü erime sıcaklarına göre karşılaştırmıştır.

MYD88 geni ekzon 5, L265P mutasyonunu saptamak için ikinci yöntem olarak PCR ürünlerinde kinetiğini ölçen bir eş zamanlı sistem ve her reaksiyon ürünü tespit için etüdüyüm bromür ve ultraviyole ışığı karşı flüoresans ışığa kullanarak ve sonuçları toplayacak bir kamera eşliğinde ve bilgisayar sistemiyle incelenmesini temel alankantitatif eş zamanlı PCR tekniği kullanılmıştır. Termal eş zamanlı PCR kit sistemi (Katalog no:66508) kullanılarak MYD88 ekzon5 L265P mutasyonuna özel tasarlanmış primerler (forward primer, mutant ters primer, yabanıl ters primer) ve optimize edilmiş PCR protokolü, PCR reaksiyonları hazırlanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. MYD88 ekzon 5L265P mutasyon bölgesine özeleş zamanlı PCR dakullanılan primer seti

Forward primer
5'-ACTTAGATGGGGGATGGCTG-3'
Mutant ters primer
5'-CCTTGTACTIONGATGGGGATGG-3'
Vahşi ters primer
5'-CCTTGTACTIONGATGGGGATCA-3'
Amplikon uzunluğu 146 baz çifti

DNA örnekleri moleküler biyoloji grade su ile 100 ng/μl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Liyofilize halde sentezlenen primerler, son konsantrasyonları 20 pmol/μl olacak şekilde iyonize su ile sulandırılmıştır. Stok primerin 10x sulandırılması suretiyle 2pmol/μl primer hazırlanmıştır. PCR master mix 22.5 μl olacak şekilde tüplere dağıtılıp ve her tüpe 2.5μl'e dilüe edilmiş DNA eklenmiştir.

BİO-RAD termal cyclus cihazlarında aşağıdaki protokole bağılı olarak PCR yapılmıştır (Çizelge 4.11).

Hazırlanan mix vortexlenip spin yapılıp. 96 plate'e her bir kuyuya 15 μl olacak şekilde dağıtılmıştır. 5 μl DNA eklenerek son hacim 20 μl'ye tamamlanmıştır. Plate Gena light cyclus cihazına yüklenerek aşağıdaki PCR programı uygulanmıştır (Çizelge 4.12). Sonuçlar, erime eğrisi (melting curve) bağılı olarak analiz edilerek genotipler belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. RT-PCR protokolü

Malzeme	Örnek İçin miktar	Stok Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
Moleküle biyoloji grade su	15.5 μl	15.5 μl	
DyNAm HS SYBR green mix	2.5 μl	10X	1X
Forward/Reverse primer	2.5 μl	10 mM	0.2 mM
PCR ürünü	0.5μl	10 pmol	0.4 pmol
Buffer	0.25μl	5 U/μl	0.05 U
Toplam	21.25μl		

MYD88 geni, ekzon 5, L265P mutasyonu için tasarlanmış özel primerler ve PCR termal kit kullanılarak 146 baz çifti uzunluğunda fragmentlerin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hibridizasyon "SYBR Green I" işaretlenen fragmanlar erime eğrisi analizine tabi tutulmuş ve genotipler belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. RT-PCR programı

Parametreler	Denatürasyon	Döngü(Cycling)				Erime(Melting)				Soğuma (Cooling)
Analize modu	None	Kantifikasyon				Melting curves				None
Döngü sayısı	1	50				1				1
Segment	1	1	2	3	4	1	2	3	2	1
Sıcaklık (°c)	95	95	58	58	72	95	58	40	85	40
Süre (sn)	10	10	5	10	10	20	20	20	0	30
Ramp oranı (°c/s)	20	20	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Acquisition mode	None	None	Single	None	None	None	None	None	Conti	None

4.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda geriye dönük elde edilen verilerin grup kategorilerine göre demografik ve diğer değişkenler bakımından karşılaştırılması amacıyla öncelikle Kolmogorov Smirnov ve Shapiro Wilk normallik testleri uygulanmış denek sayısı ve dağılımlar incelenerek parametrik olmayan test yöntemlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Yaş, Ct değeri, size ladder, konsantrasyon gibi sürekli değişkenlerin bağımsız iki grup arasında karşılaştırılması için Mann Whitney U testi, ikiden fazla sayıda bağımsız grup bakımından kıyaslanması amacıyla ise Kruskal Wallis Varyans Analizi testleri uygulanmıştır. Kruskal Wallis test sonucu anlamlı bulunduğu, farklılığı yaratan grupların tespiti için posthoc çoklu karşılaştırma test sonuçları verilmiştir. Kategorik verilerin gruplara göre karşılaştırılmasında ki-kare testi ve/veya Fisher'in exact testi kullanılmış, söz konusu grup karşılaştırmalarına ilişkin sonuçlar, sürekli değişkenler için, ortanca (minimum–maksimum), kategorik değişkenler için ise frekans dağılımları ve yüzdeler kullanılarak özetlenmiştir. Ayrıca çalışmada (RT-PCR ve dizi analizi) test yöntemlerinin tanı koyma kabiliyetleri de, duyarlılık, seçicilik, pozitif olabilirlik oranı, negatif olabilirlik oranı, yanlış pozitif/negatif oranları gibi istatistikler ve bu kestirime ilişkin %95 güven aralıkları verilerek yorumlanmıştır. Çalışmada istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0.05 kullanılmış ve analizler SPSS 11.5 paket programı ile gerçekleştirilmiştir.

5.ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1.DEMOGRAFİK BULGULAR

Tez çalışmasına katılan olguların yaş dağılımı 21-80 arasındadır, ortalama yaş 57 bulunmuştur. SMZL tanılı olguların yaş dağılımı 48-82 arasında değişirken, ortalama yaş 61.95 dur. LPL tanılı olguların yaş dağılımı 48-82 arasında değişirken ortalama yaş 63'dir. NMZLtanısı alanlarda ise olguların yaş dağılımı 39-85, yaş ortalama 60.80 bulunmuştur (Çizelge 5.1). İstatistiksel olarak gruplar arasında yaş dağılımı bakımından anlamlı fark olmadığı görülmüştür (P=0.315 Kruskal- Wallis).

Çizelge5.1.Tanı gruplarındaki hastaların yaş dağılımı. P* < 0.05 (Kruskal-Wallis)

Tanı	N	Ortalama	Standart sapma	WHO sınıflamasında Yaş dağılımı
SMZL	19	61.95	10.47	>50
LPL	12	63	12.417	60
MZL NOS	10	62.20	12.218	>50
NMZL	11	60.80	12.515	60
FL	3	31.67	9.713	>60
EMZL	3	33.67	12.014	61
MM	5	59.20	15.515	-
Total	63	58.89	14.506	

P*= 0.315

Hastaların cinsiyet dağılımı incelendiğinde; 63 hastadan %54 ü (n=34) erkek, %46'sı (n=29) ise kadındır. SMZL tanılı hastaların %52.6 (n=10) kadın, %47.4 (n=9) erkektir. LPL Tanılı hastaların %42 (n=4) kadın, %58 (n=8) erkektir. NMZL tanılı hastaların %60 (n=6) kadın, %40 (n=4) erkektir. Tanı gruplarına göre cinsiyetin dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür (P=0.985, Fisher's Exact testi) (Çizelge 5.2).

Hastaların hastalık gruplarında cinsiyet dağılımlarına bakıldığından SMZL, LPL, WHO sınıflamasında tanımlanan sınırlar içerisinde bulunduğu, az sayıdaki FL, EMZL hastalarının daha gençyaşta olduğu gözlenmektedir.

Çizelge5.2. Hastalık gruplarında cinsiyet göredağılımı. $P^* < 0,05$ (Fisher's Exact testi)

Tanı	Kadın % (N)	Erkek% (N)
SMZL (n=19)	52.6 (10)	47.4 (9)
LPL (n=12)	42 (4)	58 (8)
MZL NOS (n=10)	40 (4)	60 (6)
NMZL (n=11)	54.5(7)	45.5 (4)
FL (n=3)	33.3 (1)	66.7 (2)
EMZL (n=3)	33.3 (1)	66.7 (2)
MM (n=5)	40 (2)	60 (3)

$P^*=0.985$

5.2. MOLEKÜLER BULGULAR

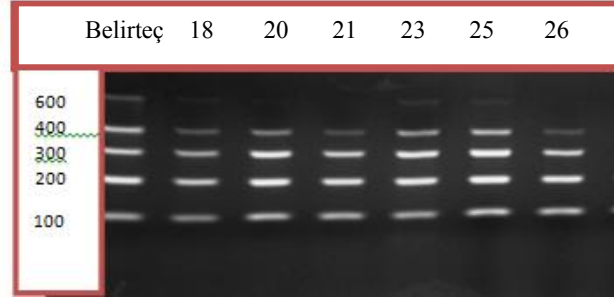
5.3.1. DNA İzolasyonu ve Spektrofotometri Analiz

Çalıştığımız örneklerden izole edilen DNA'ların yoğunluğu (konsantrasyon) ve kaliteleri spektrofotometrik nanodrop cihazı ile analiz sonuçları tüm DNAkonsantrasyonve kalite değerlerinin mutasyon analiz çalışmalarına uygun (5-20 ng/μl) bulunduğu gözlenmiştir. Ölçüm sonuçları DNA nın geniş bir aralığa sahipken (9-2130 ng/μl) en düşük olan konsantrasyon miktarı bile çalışmamıza dahil olabilecek sınırlar içerisinde bulunmuştur. Örnekler de DNA konsantrasyon farklılığı, yayma veya parafin blok preparatlarında bulunan hücre sayısının değişken olmasından kaynaklanabilmektedir (Çizelge 5.3).

Size ladder PCR ürünlerini agaroz jel elektroforezinde yürütülerek size ladder PCR sonuçlarını 100–600 bç aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu soncularlabağlı olarak, hedef gen için, DNA uygunluğu PCR ve dizi analizi başarısı için tahmin edilmiştir (Çizelge 5.3) (Şekil 5.1).

Çizelge 5.3. İzole edilen DNA'lara ait spektrofotometre (konsantrasyon)ve size ladder PCR sonuçlar sonuçlar

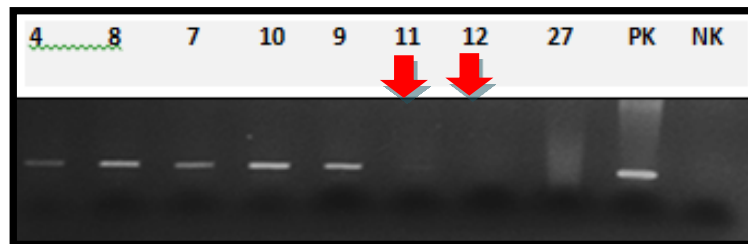
	Ortalama	Standart sapma	Ortanca	Max	Min
SL (baz)	282.5	143.16	300	600	100
Konsantrasyon (ng/μl)	361.9	285.5	312	1350	9
RT- PCR Ct	27.37	4.78	26.88	38.74	20.92



Şekil 5.1.DNA kalite ölçümü amaçlı yapılan “size ladder” temsili agaroz jel görüntüsü

5.3.2. Mutasyon Analizi Sonuçları

PCR aşamasında kullanılan gen bölgesine özel primerler ile o gen bölgesinin çoğalma işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda her DNA örneğinin hedef gene özel amplifikasyon ürünü elde edilmesini sağlanmıştır. Dört örnekte jel üzerinde çok zayıf bantgörölmüş, bunlar için çift (double) PCR yaparak ikinci bir amplifikasyon yapılmıştır. Bu vakalardaDNA fragmentasyonu açısından yapılan size ladder PCR ile 200, 200, 100, 300 bazlık fragmentasyon bulundurduğu izlenmiştir. İlk 3 vakada FFP ve son vakada yayma preparatları kullanılmıştır. İki örnekte elde edilen DNA'ların kaliteleri de iyi olmasına rağmen PCR aşamasında başarısız sonuç alınmıştır ve dizi analizi aşamasına dâhil edilememişlerdir. Bu vakalardan, birincisinde FFP preparatı kullanılmış ve elde edilen DNA size ladder 100 baz ve konsantrasyon 123 (ng/μl) bulunmuştur. İkinci vakada yayma preparatı kullanılmış ve elde edilen DNA size ladder 100baz ve konsantrasyon 470 (ng/μl) bulunmuştur (11. numaralı hasta double PCR yapılan vakalardan, 12. numaralı hasta PCR çalışmayan vakalardan örnek)(Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Amplikon MYD88 PCR sonuçları temsili agaroz jel görüntüsü

Bu çalışmada, yapılan dizi analizi ve RT-PCR sonuçlarını inceleme yapıldığında dizi analizi sonucu ile %7.35 ve RT-PCR yöntemiyle %26.47 oranda MYD88 L265P mutasyonuna rastlanmıştır, 63 hastanın 18 inde RT-PCR yöntemi ile 5 hastada ise her iki yöntemle mutasyon saptanmıştır. Hastaların 13'ündesekans negatif sadece RT PCR ile pozitif sonuçlanmıştır. Verilerin daha ayrıntılı değerlendirilmesi ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

5.3.2.1. Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmamızdaki 63 vaka örneğinin MYD88 genin ekson 5 bölgesi için dizi analizi yapılmıştır. Toplam 23115 bazokunmuştur. Tüm olguların %7.9 unde (n=5) MYD88 L265P mutasyonu bulunduğu ve %92.1 olgunun (n=58) yabancı tip olduğu saptanmıştır (Şekil 5.4).NMZL hastalarındabulunan MYD88 L265P mutasyonu %9 (n=1) oranda mevcuttur. LPL hastada MYD88 L265P mutasyonu% 25 (n=3) oranda mevcuttur. MZL NOS hastada MYD88 L265P mutasyonu %10 (n=1) oranda mevcuttur. Diğer düşük dereceli B hücre lenfoma hastalarında MYD88 L265P mutasyonu bulunmamıştır. Amplifikasyon aşamasında iki örnekte başarısız sonuç alınmıştır. Bu olgular için mutasyon incelemesi çalışma dışı bırakılmıştır (Çizelge 5.4) (Şekil 5.3).

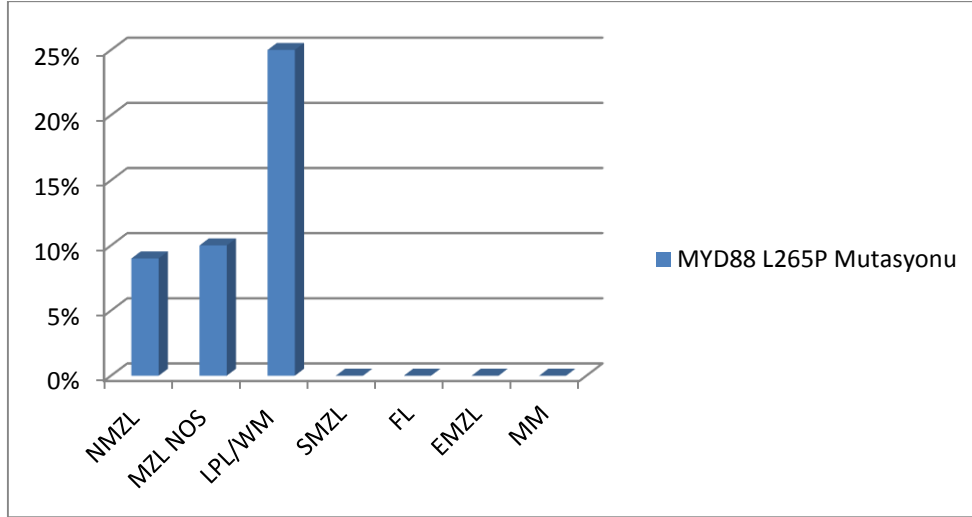
Pozitif vakalarda 300 bazın sadece bir vaka altında ve bu vakada dabalunan DNA konsantrasyonu ve lenfosit ve plazma hücre miktarıDNA kalitesi yanında PCR başarısını negatif yönde etkileyenfaktörler bulunmasına rağmen sonuç pozitif bulunmuştur.

Çizelge5.4. Dizi yöntemiyle tanı gruplarına göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı. (*p< 0.05 Fisher's Exact testi)

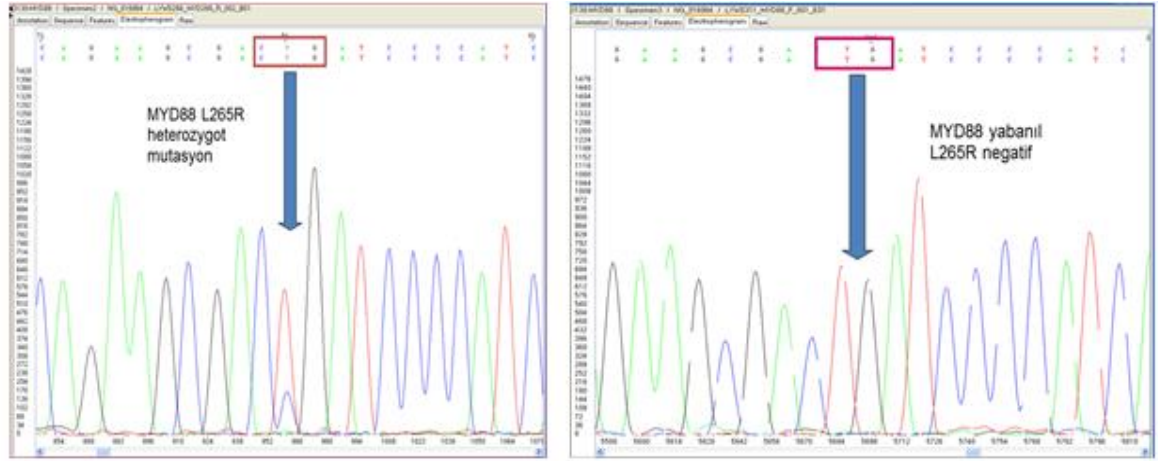
Tani	MYD88 L265P Mutasyonu n (%)	SL (baz) Ortalama	Kons (ng/µl) Ortalama	Materyal	Lenfosit +plz Ortalama
NMZL (n=11)	1 (9)	300	162	FFP	60
MZL NOS (n=10)	1 (10)	600	833	YKI	40
LPL/WM (n= 12)	3 (25)	400	312	YKI	49
SMZL (n=19)	0 (0)	230	483	YKI / FFP	40
FL (n=3)	0 (0)	133	334	FFP	Bilgi yok
EMZL (n=3)	0 (0)	166	511	FFP	Bilgi yok
MM (n=5)	0 (0)	360	295	YKI / FFP	Bilgi yok

P*= 0.279

FFP LN: Formalin fikse parafin doku Lenf nodülü. YKİ: yayma kemil iliği



Şekil 5.3. Dizi analizi yöntemiyle tanı gruplarına göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı (%)

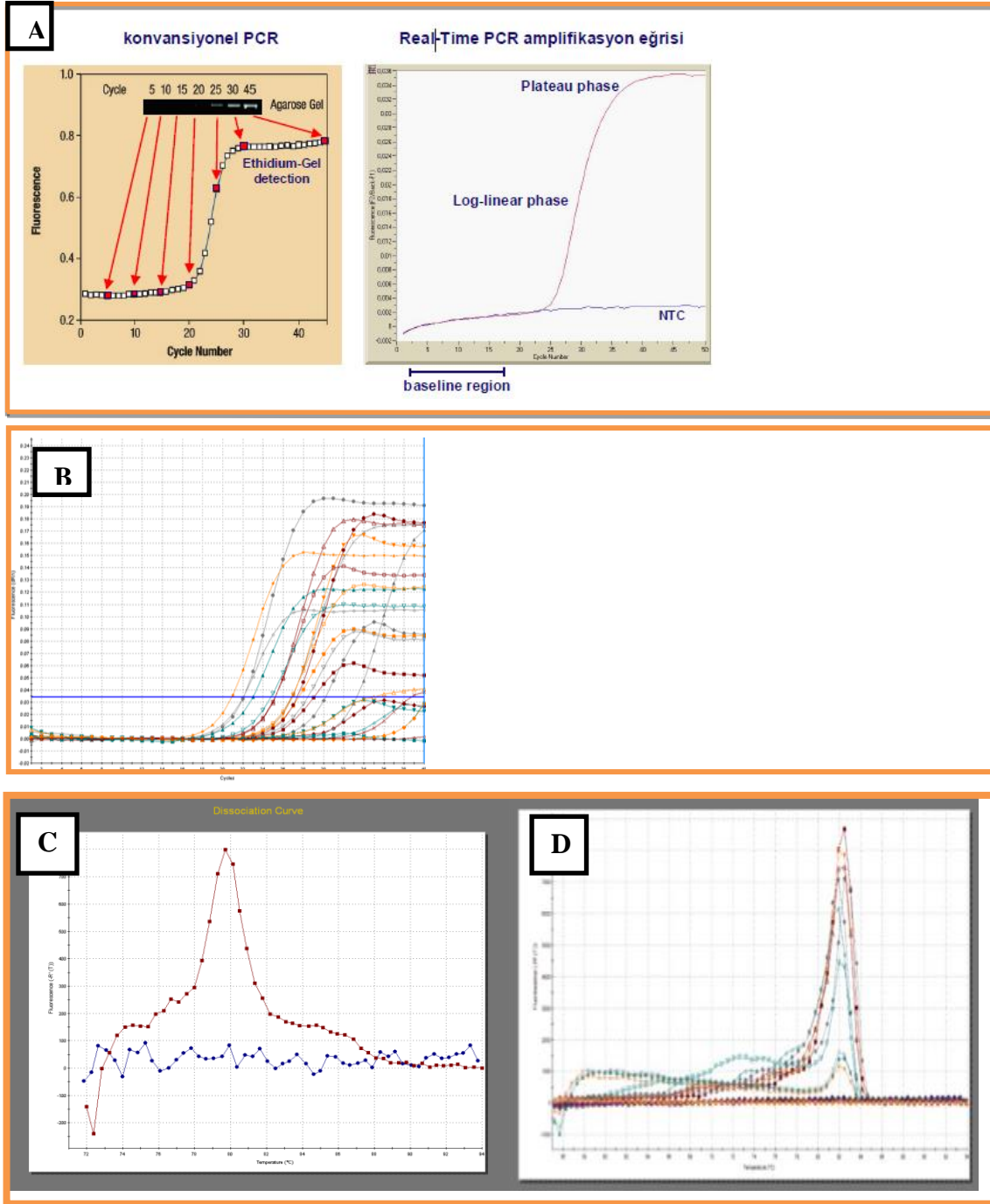


Şekil 5.4. Dizi analizi yönteminde pozitif ve negatif sonuçların görüntüsü

5.3.2.2. Allele Özel Eş Zamanlı PCR Sonuçları

Duyarlık açısından %1 bulunan kullandığımız RT-PCR ile örneklerde Ct değerleri incelemesiyle ve "melting curve" sonuçlarına göre çalışmamızdaki 63 vaka örneğinde MYD88 genin ekson 5 bölgesi için tüm olguların %27 sinde (n=17) MYD88 L265P mutasyonu bulunduğu ve %73 olgunun (n=46) yabanıl tip olduğu saptanmıştır (şekil 5.5). MYD88 L265P bölgesinde mutasyon varlığı ve oranı istatistiksel olarak değerlendirilebilecek nitelikte olduğundan bu sonuçların dağılımı araştırılmıştır. SMZL hastalarında bulunan MYD88 L265P mutasyonu %10.5 (n=2) oranda mevcuttur. MZL NOS hasta grubunda MYD88 L265P mutasyonu %20 (n=2) oranda mevcuttur. WM/LPL

hastada MYD88 L265P mutasyonu %90 (n=9) oranda mevcuttur. NMZL hastalarında bulunan MYD88 L265P mutasyonu %20 (n=2) oranda mevcuttur. (Çizelge 5.6).



Şekil 5.5. Eş zamanlı PCR sonuç temsili görüntüsü. (A) Konvansiyonel PCR ve eş zamanlı PCR amplifikasyon eğrisi. (B) Bu çalışmada izlenen amplifikasyon eğrileri. (C) Bu çalışmada MYD88 L265P mutasyonu izlenmeyen örneklerde erime eğrileri.(D) Bu çalışmada MYD88 L265P mutasyonu izlenen örneklerde erime eğrileri.

Çizelge 5.6. RT-PCR yöntemine bağlıMYD88 L265Pmutasyon dağılımı. (p< 0,05 Fisher's Exact testi)

Tani	MYD88 L265P Mutasyonu n (%)	SL (baz) Ortalama	Kons (ng/µl) Ortalama	Materyal	Lenfosit+Plazma hücresi Ortalama	CT Ortalama
NMZL (n=11)	3 (27)	300	113	FFP	70	27.2
MZL NOS (n=10)	2 (20)	500	473	YKİ	29	23
LPL/WM (n= 12)	11 (91.7)	400	237	YKİ	41.7	25.7
SMZL (n=19)	2 (10.5)	100	838	FFP	65	29.5
FL (n=3)	0 (0)	133	334	FFP	Bilgi yok	>50
EMZL (n=3)	0 (0)	166-	511	FFP	Bilgi yok	>50
MM (n=5)	0 (0)	360	295	YKİ/FFP	Bilgi yok	>50

P*= 0.00

FFP LN: Formalin fikse parafin doku lenf nodülü. **YKİ:** yayma kemil iliği

Hastalık gruplarına göre en fazla oranda LPL grubunda mutasyon bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada her iki yöntemleMYD88 L265P mutasyonu izlenen örneklerde bulunanmateryal değeri elde edilmiştir (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7. Her iki yöntemle MYD88 L265P mutasyonu izlenen örneklerin karşılaştırılması

Hasta No	SS	RT-PCR	Ct	SL(baz)	Kons(ng/µl)	Materyal	Lenfosit +Plazma hücresi (%)	Tanı
21	1	1	29,03	600	27	YKİ	50	LPL
24	1	1	20,92	600	833	YKİ	40	MZL NOS
39	1	1	22,05	400	558	YKİ	57	LPL
41	1	1	34,93	100	35	YKİ	39	LPL
52	1	1	26,84	300	162	FFP/LN	60	NMZL
2	0	1	29,03	100	1350	FFP/LN	90	SPMZL
11	0	1	30,22	100	372	FFP/DA	40	SPMZL
19	0	1	26,93	300	535	YKİ	20	LPL
20	0	1	25,26	400	62.5	YKİ	43	LPL
22	0	1	22,99	400	628	YKİ	30	LPL
25	0	1	25,25	400	113	YKİ	18	MZL NOS
30	0	1	26,88	200	57.5	YKİ	38	LPL
33	0	1	24,82	400	215	YKİ	9	LPL
34	0	1	27,57	300	65	FFP/LN	80	NMZL
43	0	1	27,42	400	9	FFP/LN	90	LPL
49	0	1	33,35	300	248	FFP/LN	50	LPL
57	0	1	38,74	600	363	FFP/LN	80	LPL

FFP LN: Formalin fikse parafin doku lenf nodülü. **YKİ:** yayma kemik iliği,

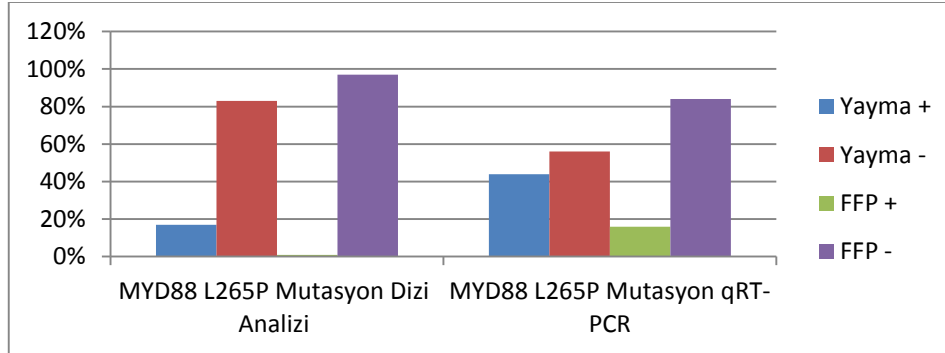
(0): MYD88 L265P negatif, **(1):** MYD88 L265P pozitif

5.3.2.3. Materyal özelliğine bağlı dağılım bulguları

Düşük dereceli B hücreli lenfomalarında bu grup hastalıklarda tanı için ve hedeflenmiş tedavi için kullanılan MYD88 L265P mutasyonunun incelenmesi için kullanılan yöntemin mutasyon saptamadaki performansının materyal tipi ve özellikleri (FFP/yayma) ve buna bağlı DNA kalitesi açısından değerlendirilmesinde vaka sayısı az olmasına rağmen Direkt sekanslama yönteminde DNA'nın daha az parçalandığı vakalarda pozitif sonuç verdiği görülmüştür. RT-PCR yönteminde çoğaltılan gen bölgesinin daha küçük olması ve yöntem duyarlılığı nedenleriyle FFP örneklerinde de mutasyon saptama açısından daha verimli sonuç alındığı görülmüştür (Şekil 5.9) (Çizelge 5.8).

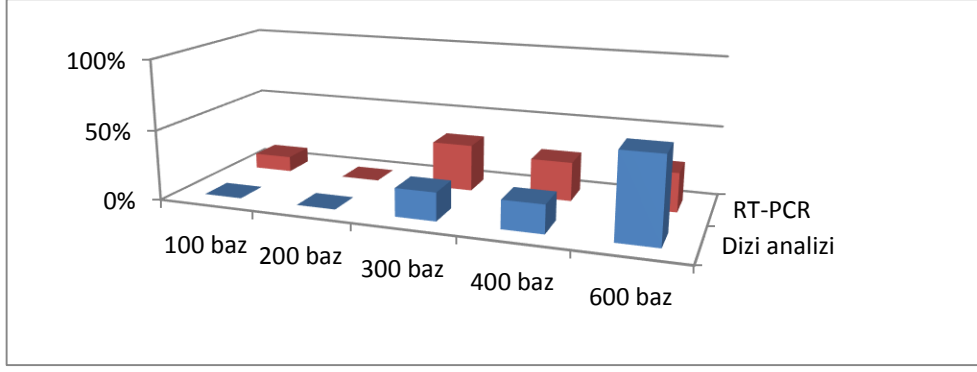
Çizelge 5.8. Yapılan çalışmada materyalin özelliğine göre ve materyal çeşitliliğine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı

Materyal	MYD88 L265P mutasyon Dizi analizi n (%)		MYD88 L265P mutasyon RT-PCR n (%)	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Yayma (23)	4 (17)	19 (83)	10 (43.5)	13 (56.5)
FFP (44)	1 (2.2)	43 (97.8)	7 (16)	37 (84)



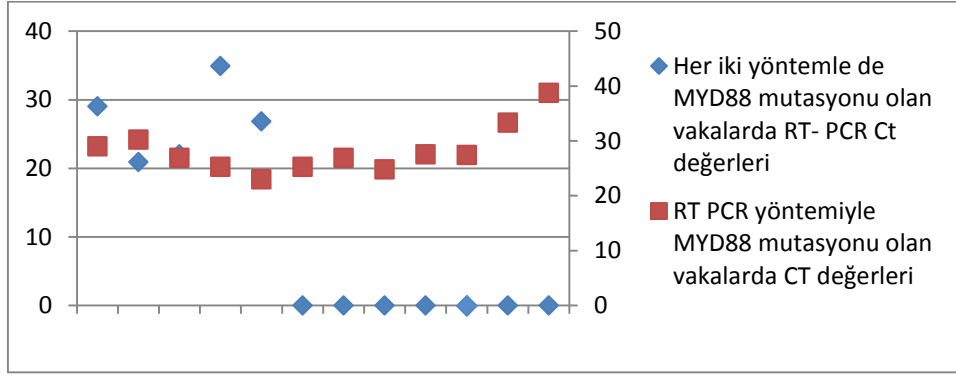
Şekil 5.9. Yapılan çalışmada yöntemlere göre ve materyal çeşitliliğine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı

Yapılan çalışmada materyal kalitesini (SL) sonuçları tetikleyen bir parametre olarak belirlenmektedir (Şekil 5.10).



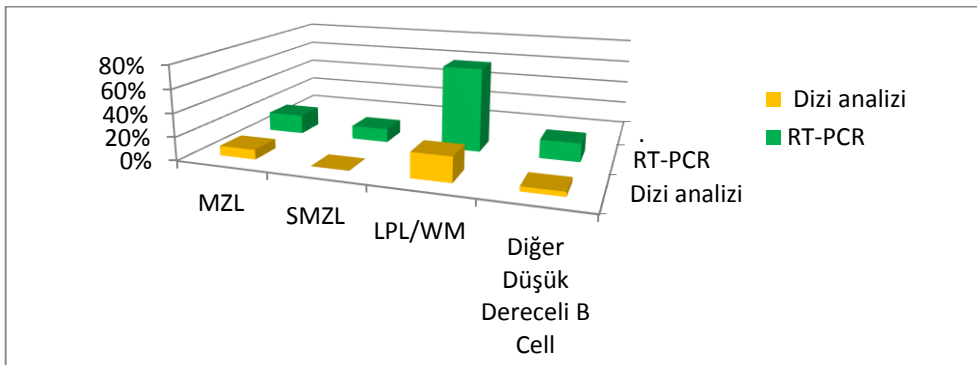
Şekil 5.10. Yapılan çalışmada materyal kalitesine göre MYD88 L265P mutasyonu dağılımı

Yaptığımız çalışmada Her iki yöntemle ve sadece RT-PCR ile MYD88 L265P mutasyonu izlenen örneklerde bulunan Ct değeri (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Her iki yöntemle ve sadece RT-PCR ile elde edilen mutasyonlu hastaların Ct değeri grafiği

RT-PCR ve dizi analizi yöntemiyle MYD88 L265P mutasyonu kullanılan hasta grupları arası farklılık göstermektedir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. Hasta gruplarında RT-PCR ve dizi analizi yöntemiyle MYD88 L265P mutasyonu dağılımı

Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinden RT-PCR dizi analizinden yüksek duyarlılıkta olduğundan referans kabul edilmiştir. Dizi analizi yöntemiyle negatif RT-PCR ile pozitif bulunan vakaların materyal ve DNA özellikleri değerlendirildiğinde dizi analizi pozitif olguların büyük çoğunluğunu (%80) yayma preparatlar oluşturmaktadır. Size ladder ile daha az fragmente vakalarda dizi analizi başarısı olduğu görülmüş ancak SL 100 olan bir yayma prepartta da dizi analizi başarılı bulunmuştur. Bütün örnekler arasında SL 100 bulunan 3 vakadan biri yayma, 2 si FFP'dir. Bunlar arasında FFP örneklerde dizi analizi sonucunegatif RT-PCR pozitif bulunmuştur. Aynı vakalarda DNA konsantrasyonları çok değişken ve örneklerdeki lenfosit, plazma hücresi oranları %39 üzerindedir. Dizi analizi negatif 12 örneğin DNA konsantrasyonları 1350-9 (ng/μl) arasında ve SL değerleri 100-600 baz arasında değişmektedir. Bunların dizi analizi pozitif olanlarla istatistiksel olarak Fisher's Exact testiyöntemi ile karşılaştırılmasında p=0.222 anlamlı bulunmamıştır.

Kullandığımız 147 bazlık bir bölge çoğaltılan ve mutasyonun %1 duyarlılıkla saptandığı RT-PCR ile istatistik incelemeler sonucu Ct değeri ile materyallerin yayma/FFP olması arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (p=0.008 Fisher's Exact testi)

MYD88 L265 mutasyonu pozitif bulunan vakalarda elde edilen Ct değerleri 20.92 -34 arasında bulunmuştur. Ct değerleri etkileyen lenfosit ve plazma hücre oranları incelendiğinde. 3 vakada Ct değerleri 27-38 olmasına rağmen lenfosit ve plazma hücre oranları ile 80-90 olarak bulunmuştur. Ct ve lenfosit ve plazma hücre oranları arasında yapılan istatistiksel incelemelerde anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.190Mann Whitney U testi)

MYD88 L265P mutasyonu pozitif bulunan vakalarda DNA kalitesini gösteren SL değerleri 100-600 baz arasında değişken bulunmuş ve Ct değerleri (20-38) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak Ct değerleri ile SL boyutları arasında istatistiksel olarak anlamlı ters ilişki saptanmıştır (P=0.033 Kruskal-Wallis testi)

Kullandığımız materyallerden elde edilen DNA konsantrasyonları 9-1350 (ng/μl) arasında değişmektedir. Ct değerleri ile Ct DNA konsantrasyonu arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.586 Kruskal-Wallis testi).

MYD88 L265P mutasyon tesbitini etkileyeceğini düşündüğümüz faktörlerden materyal tipi (Yayma ve FFP) Ct değerleri ile karşılaştırdığında, yayma preparatlarda Ct değerlerinin 20-34 arasında bulunurken FFP örneklerde 26-38 arasında olduğu anlaşılmıştır. Yapılan istatistiksel incelemelerde yaymalarda Ct değerlerinin FFP örneklerden anlamlı şekilde düşük bulunduğu saptanmıştır (P=0.008 Fisher's Exact testi)

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Düşük dereceli B hücreli lenfomalar arasında bulunan, Lenfoplazmasitik Lenfoma (LPL)-Waldernstrom makroglobulinemisi (WM),KLL/SLL, marginal zon lenfoma, folliküler lenfoma gibi birbirleri ile ayırıcı tanı güçlüğü bulundurabilenlenfoproliferatifneoplazilerde tanısal veya tedavide yönlendirici moleküler belirteçlerin güvenilir bir şekilde tesbitine büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Burada kullanılacak güvenilir materyal özellikleri ne olmalıdır? Yanlış negatif sonuçları etkileyebilen faktörlerin gündelik uygulamada karşılaştığımız örneklerdeki durumunun kendi küçük serimizde araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada histopatolojik olarak seçilen MZL, SPMZL, LPL/WM ve farklı düşük dereceli B hücre lenfomaları ve histopatolojik olarak bulunmayan örneklerden, mutasyon tanımı için kullanılan moleküler yöntemlerinden, dizi analizine RT-PCR kullanılarak MYD88 L265P mutasyonunu bu grup hastalıklarda araştırılması ve bu yöntemlerin hassasiyeti bu hasta gruplarında tanı olarak önem taşıyanMYD88 L265Pmutasyonu incelenmiştir.

Patoloji çalışmalarında uygulanan doku hazırlama ön basamaklarından dokuyu hücresel enzimlerin neden olduğu otoliz ve bakteri ya da mantarlarca oluşturan infeksiyöz ajanları inaktive eden ya da öldüren, dokuyu sonraki işlemler için sertleştiren ve doku komponentlerini stabilize eden tesbit işlemi ve dokunun suyunu alıp yerine parafin koyarak ince kesite hazırlayan doku takibi ile kesitlerin boyama işlemleri sonucunda kullanılan kimyasallar (alkol serileri, ksilol serileri, parafin seriler) ve farklı sıcaklıklar DNA kırılmasına neden olabilir. Bütün bu işlemler sırasında moleküler çalışmalarda kullanılacak dokuların kalitesi çok değişmeden korunması ve ona bağlı olarak hücrelerin korunması çok önemlidir.

Mutasyon tesbitinde patolojide kullanılacak doku örneklerinin büyük çoğunluğu FFP örneklerdir. Bunlarda formaldehitin DNA üzerine hasarlayıcı etkileri nedeniyle PCR başarısı düşmektedir. PCR başarısızlığının sebebinin belirlenmesinde DNA fragmantasyonu ile ilgili bilgi veren SL PCR önerilmektedir (59).

Hematopatolojide kullanılan diğer önemli bir materyal ise özellikle kemik iliği incelemeleri için aspirasyon yaymalarıdır. Bunlarda FFP etkisi bulunmadığından DNA parçalanması daha az olmakta ancak arşiv süresi uzun ise DNA etkilenmektedir.

Bu çalışmada kullanılan iki mutasyon analiz yöntemlerinin farklı tarama hassasiyetine sahipler. Literatür incelemelerinden bilindiği gibi RT-PCR yöntemi sanger dizi analizine karşı daha yüksek duyarlığa sahip bir yöntemdir. Yaptığımız çalışma da sonuç olarak size ladder parametresini göz önüne alarak incelendiğinde dizi analizi ile mutasyon pozitif örneklerde size ladder daha yüksek bulunmuştur (ortalama olarak 420 baz) bu sonuca ek olarak RT-PCR kullanarak izlenen pozitif örneklerde daha düşük size ladder değerleri bulunmaktadır (ortalama olarak 350 baz). Her iki yöntemle pozitif bulunan hastalarda sadece RT PCR sonuçları arasında DNA size ladder açısından anlamlılık sınırında bir fark izlenmiştir ($P=0.062$). Bu sınırdan anlamlılığın istatistik olarak denek sayısının gruplar arasında az olmasından ileri gelebileceği yorumlanmıştır. Size ladder değerlerini göz önüne alarak incelendiğinde RT-PCR moleküler yöntemi daha yüksek hassasiyete sahip olduğundan dolayı kısa ve kırılmış düşük kaliteli DNA örneklerinde MYD88 L265P mutasyonuna rastlanmıştır. Sadece bir hasta (41. hasta) düşük (100 baz) size ladder sahip olmasına rağmen sanger dizi analizi yöntemiyle MYD88 L265P mutasyon rastlanmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak, düşük kaliteli DNA örneklerde MYD88 L265P mutasyonu taramak için hassasiyeti yüksek olan RT-PCR tercih edilmelidir.

Yayma preparatlarda kullanılan yöntemin duyarlılığı ve tümör hücrelerinin oranının önemi bulunmaktadır. Bu bilgiler teorik olarak %20 duyarlılıkta dizi analizi yöntemi ile pozitif sonuç alınması için en az %20 oranında mutant tümör hücresi varlığı beklenmesi şeklinde bir nitelik ortaya koymaktadır. Bu nedenle de incelenen tümör örneklerinde dizi analizi kullanılıyorsa tümör hücre zenginleştirilmesi için mikroskopik diseksiyon uygulanmaktadır. Kullanılan her yöntem kendine özel farklı avantajları ve dezavantajları bulundurmaktadır. Bu çalışmanın en önemli hedeflerinden biri MYD88 L265P mutasyon taramasında kullanılan farklı moleküler yöntemler ve kullanılan materyallerin özelliklerini incelenmesi ve bu grup hastalarda en güvenilir ve laboratuvar koşullarında kullanımı kolay olan ve maliyet olarak düşük olan seçeneklerin seçilmesidir.

Literatürü moleküler çalışmaları incelendiğinde, materyal olarak yayma preparatlar daha fazla tercih edilmektedir (14, 60-64). Çalışmamız kapsamında yapılan moleküler

çalışmalar için farklı oranda FFP (%66) ve yayma preparatları (%34) kullanılmıştır. Mutasyon analizleri sonucunda MYD88 L265P mutasyonu daha yüksek miktarda yayma preparatlarında oran olarak az olmalarına rağmen elde edilmiştir. Elde edilen DNA'ların konsantrasyon parametresi dokuda yüksek oranda hücre bulunduğunu ifade eden bir parametredir. Ancak PCR reaksiyonu için kullanılacak optimum DNA ya göre hesaplanarak bu elde edilen DNA örnekleri sulandırılmaktadır. Materyalde tümör hücre oranı düşük olduğunda PCR reaksiyonuna konacak template DNA içinde tümörü temsil edenlerin oranı azalmaktadır. Sonuçlarımız konsantrasyon açısından tanı grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığını ortaya koymuştur (P=0.833). Bu parametre dizi analizi ve RT-PCR yöntemiyle elde edilen mutasyonlu örneklerin arasında anlamlı fark bulunmadığını göstermektedir (sırasıyla 323 -334 ng/μl)(p=0.473). Mutasyon dağılımına bakıldığında 21. ve 41. hastada bu miktardan çok düşük olmasına rağmen (27-35 ng/μl) her iki yöntemle ve 43. hastada 9 ng/μl olmasına rağmen RT-PCR yöntemiyle mutasyon pozitif bulunmuştur.

21. 43. hastada konsantrasyonunun düşük olmasına rağmen size ladder (600-400) ve kullanılan materyalde lenfosit oranı (%50-%90) yüksek bulunmuştur. Sonuçta DNA kalitesi ile tümör yükünün birlikte önemi test başarısını arttırmaktadır.

Mutasyon dağılımı yayma preparatlarında daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle eğer iyi bir şekilde dokuyu temsil ediyorsa, yapılan moleküler çalışmalarda yayma preparatlar daha güvenilir ve iyi sonuçlar elde etmesinden dolayı tercih edilir.

Kullanılan yöntemlerin hassasiyetinin yanında ek olarak patoloji çalışmalarında önemi olan diğer bir faktör incelenen materyal veya doku örneklerinde bulunan tümör hücre sayısı/tumor burden/tümör yüküdür. Bu çalışmada kullanılan lenfomalar B hücreli ve plazma hücreli neoplaziler burada tümör yükü ve materyaldeki B lenfoid hücre ve plazma hücre oranları olarak verilebilir. Ancak çalışmamız sonucunda tümör yükü ile RT-PCRCt değerleri ile tümör hücre yükü arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu sonucun sebepleri arasında tanımlanan lenfomalarda neoplastik hücreler yanında zeminde non neoplastik lenfositlerin de bulunması sayılabilir.

Serimizde dizi analizi sonucu %7.9 ve RT-PCR sonuç %26.9 oranda MYD88 L265P mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon saptanan toplam 17 hasta örneğinin ve sadece 5 inde her iki yöntemle de mutasyona rastlanmıştır.

RT-PCR yönteminde en önemli incelenen faktörlerden biri olan Ct (cycle threshold) değeridir. Ct değeri, hedef hücre sayısı arasında bir ters orantı vardır. Mutasyon olmayan hücrelerde Ctdeğeri>50 bulunmaktadır. Çalışmaya dâhil tüm hastalarda her iki yöntemle mutasyon pozitif bulunan örneklerde Ct değeri ortalama olarak 26.73 ve sadece RT-PCR yöntemiyle mutasyon pozitif bulunan örneklerde ortalama olarak 28 bulunmuştur. Bu oranlar, RT-PCR yönteminin yüksek hassasiyete sahip olduğunu ve düşük tümör burden örneklerde bu yöntemle güvenilir sonuçlar elde etmek mümkün olduğunu göstermektedir.

Dizi analizi ve RT-PCR yöntemini karşılaştırdığında hassasiyeti daha düşük ve her iki yöntemle MYD88 L265P mutasyonu pozitif olan örneklerde Ctdeğeri (20-25) düşük olması tahmin ediliyorsa sadece 41 numaralı hastada bu kuraldan farklı sonuç görülmüştür ve Ct değerleri yüksek olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmada Ct değerleri kullanılan doku tipiyle karşılaştırarak, yüksek Ctdeğeri genelde FFP preparatlarında rastlanmıştır. Bu sonuca bağlı olarak kullanılan FFP preparatlarında daha az oranda hedefe özel DNA bulunması ve daha yüksek hassasiyetli mutasyon tarama metotlaincelenmesi gerekmektedir.

Moleküler çalışmalarda en önemli faktörlerden olan DNA kalitesi, konsantrasyonu ve tümör burden miktarlarına göz önüne alarak uygun yöntem seçilmesi gerekmektedir.

MYD88 L265P Mutasyon Değerlendirilmesi

Morfolojik ve immünofenotipik olarak kemik iliği incelemelerinde ve IgM paraproteini LPL grubuna özel olmasından dolayı, WM/LPL ve diğer plazmasitik olgunlaşma gösteren indolent lenfomalar arasında ayırıcı tanı güçlüğü bulunmaktadır. MYD88 geninde bir onkogen fonksiyonu kazanan L265P, yüksek oranda WM/LPL olgularda rastlanmasına rağmen diğer B hücreli kronik lenfoproliferatif olgularda rastlanma oranı daha düşük bulunmuştur.

MYD88 L265P mutasyonu ilk kez DLBCL saptanmıştır (21). Sonra yapılan çalışmalarda LPL/WM hastalarda bu mutasyon %95 oranında rastlanmıştır ve bu mutasyonu bir tanı marker olarak kullanılmaktadır (16). Çok az oranda başka düşük dereceli B hücre lenfomalarda (SMZL/MZL/FL ve CLL ve histopatolojik olarak tanı koyulmayan ve WM hastaları gibi yüksek seviyede IgM üreten lenfomalarda (MGUS)) rastlanır (63).

Çalışmamızda incelediğimiz materyale uygun farklı 6 çalışmaları bizim verilerimizle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda farklı mutasyon tarama yöntemleri kullanılmıştır. Seriler arasında mutasyon görülme oranları yönünden literatürdeki çalışmalara benzer sonuçlar izlenmiştir. Bu farklı sonuçların nedenleri yapılan moleküler çalışmaların benzer olmasına rağmen farklı koşullarda hazırlanan örneklerin kullanılması ve koşulların DNA üzerinde gösterdiği etki ile kullanılan cihazların farklı hassasiyete olmasıdır (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1. Farklı literatürlerde ve bizim çalışmada yapılan WM hastalarında MYD88 L265P mutasyonu dağılımı

Yazar	Referans	Doku	Yöntem	MYD88 L265P n/N (%) (Dizi analizi)	MYD88 L265P n/N (%) (RT-PCR)
Treonet al.	(16)	BM CD19+	WGS* Dizi analizi	49/54 (91%)	-----
Gachardetal.	(65)	BM	Dizi analizi	21/31 (67%)	-----
Xu et al	(61)	BMCD19+	RT-PCR Dizi analizi	13/104 (12.5%)	97/104 (93%)
Varettoni et al.	(62)	BM	RT-PCR Dizi analizi	9/58 (15.5%)	58/58 (100%)
Jimenez et al.	(60)	BM	RT-PCR Dizi analizi	18/117 (15.38%)	100/117 (86%)
Ansell et al.	(66)	BM	WGS* Dizi analizi RT-PCR	7/39 (12.82%)	38/39 (97%)
Poulainet al.	(17)	BMCD19+	Dizi analizi	54/67 (80%)	-----
Bu tez çalışmasında		BM* LN /Dalak	RT-PCR Dizi analizi	3/12 (30%)	11/12(91%)

*WGS: Tüm genom sekanslaması / *LN: Lenf nodu / *BM: Kemik iliği

Marzia Varettoni arkadaşları 2013 yılında(62) yaptıkları çalışmada toplam 271 hastada (58 WM, 77 IgM-MGUS, 84 SMZL ve 52 B-cell kronik lenfoproliferatif bozuklukları olan (B-CLPD)) MYD88 L265P mutasyonu iki farklı yöntemle incelenmiştir. Dizi analizi dizileme yöntemi kullanarak MYD88 L265P mutasyonu yaklaşık %90 oranda WM, %10 IgM-

MGUS, %6 SMZLda izlenmektedir. Aynı hasta grubu, yüksek hassasiyete sahip olan RT-PCR yöntemiyle incelendiğinde ve dizi analizi yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırma yapıldığında WM tüm hastalarda MYD88 L265P mutasyonu iki semptomatik veya asemptomatik hastalarda tespit etmiştir. MYD88 L265P mutasyonu WM için bir tanı belirteci olarak tanımlanır. Yöntem olarak bakıldığında RT-PCR yöntemiyle, dizi analizi yöntemine karşı daha hassas ve güvenilir sonuçlar elde etmek mümkündür.

Yapılan çoğu çalışmada genellikle kemikiliği kullanılmıştır. Xu L ve arkadaşları 2013 yaptıkları bir farklı çalışmada (61), örneklerin periferik kanlarında (PB) RT-PCR yöntemiyle MYD88 L265P mutasyonu için tarama yaptılar. %96.6 tedavi edilmeyen WM, %61.8 daha önce tedavi yapılan WM, %41.7 IgM MGUS MYD88 L265P mutasyonu bulunduğunu saptamışlardır. Bu çalışmanın en önemli sonucu, RT-PCR yöntemin de önemli olan Ct miktarı, yapılan PB örnekleri ve BM örneklerle çok benzerlik bulunmuş olmasıdır. Bu çalışma duyarlı yöntemlerle MYD88 L265P mutasyon tarama işlemi için periferik kanı kullanarak da güvenilir sonuçlar elde etmek mümkün olduğunu göstermiştir.

Literatürde de yapılan farklı çalışmalarda (14, 60, 61, 63, 67)(68) farklı hastalık grupları, doku tipi ve mutasyon analiz yöntemleri sonucunda, MYD88 mutasyonunu çeşitli olgun B hücre tümörlerinde saptanmıştır. Birçok farklı MYD88 mutasyonları mevcut olmasına rağmen, en yaygın L265P missense mutasyonudur. Genelde L265P MYD88 mutasyon ~% 90 WM, ~ %50 IgM salgılayan MGUS, ~ %30 ABC DBBHL, ~ %10 SMZL ve %3 'lük KLL oluşur. Bizim yaptığımız çalışmada incelenen plazma hücre farklılaşması bulduran düşük dereceli B hücreli lenfomalar da toplamda dizi analizi yöntemiyle %7.9 ve RT-PCR %26,9'inde MYD88 L265P mutasyonu saptanmıştır. WM/LPL grubunda bu oran sırasıyla %27 (3/12) ve %91 (11/12) bulunmuştur. Moleküler bulguları dizi analizi sonuçlarıyla karşılaştırarak bu sonucun standart orandan daha düşük olmadığı ve mutasyon tesbiti beklenen örneklerde elde edilen DNA ların kalitesinin (size ladder miktarları) düşük olması ve bu yöntemin hassasiyeti yüksel olmamasından dolayı negatif mutasyon sonucu elde edilebilecektir.

Başka dikkat etmemiz gereken parametre, kullanılan örneklerde bulunan lenfosit oranıdır. Dizi analizi yöntemi için en uygun lenfosit oranı %30 ve üstüdür. Bizim çalışmada negatif olan örneklerde çoğunlukla bu oran %30 yakın ya düşük bulunmuştu, %30 oranında

yüksek olan ama negatif bulunan örneklerde genelde DNA kalitesi ya konsantrasyon düşük bulunmuş.

Aynı hasta grubunda RT-PCR sonucu ve Moleküler bulguları karşılaştırarak bu sonucun standart orandan daha düşük olmasının nedenlerine ek olarak en önemli faktör olan Ct değerlerinin dikate alınması gerekmektedir. Bu yöntemle 13 hastadan sadece 4 hastada negatif sonuç izlenmiş. Bu 4 hastada en önemli olan Ct değerlerinin yüksek olması ve iki hastada lenfosit oranının (en uygun lenfosit oranı %15 ve üstü) en önemli negatif nedenlerinden biri olabilir.

Diğer hasta grubu olarak SPMZL da dizi analizi ile mutasyon bulunmazken, RT-PCR yöntemleriyle MYD88 L265P mutasyonu %11.7 (2/17) bulunmuştur. Yapılan dizi analiziyle sonunda mutasyon bulunmamasının nedenlerinden en önemli olarak kullanılan örneklerde size ladder miktarlarının çok düşük (çoğunlukla 100 bc) olmasıdır. Elde edilen DNA ların kalitesinin düşük olması RT-PCR sonucularını da etkilemiş. Bu grup hastalarda sadece bir hastada DNA kalitesi (600 bc) ve konsantrasyonu yüksek olmasına rağmen, Ct miktarı yüksek olduğundan dolayı MYD88 L265P mutasyonu bulunmadı.

Diğer hasta grubu olarak MZL NOS örneklerinde RT-PCR yöntemiyle %20 (2/10) ve dizi analiz yöntemi kullanarak %10 (1/10) MYD88 L265P mutasyonu saptanmıştır. Bu hastalar splenik venodal MZL ayırımı yapılamayan örneklerdir..

NMZL hasta grubunda RT-PCR yöntemiyle %20 (2/10) ve dizi analizi kullanarak %10 (1/10) oranda MYD88 L265P mutasyonu saptanmış. Bu grup hastalarda bulunan sonuçlar literatürde bildirilen sonuçlara çok yakındır. Bu grupta genelde DNA kalitesi (≥ 300) ve konsantrasyonu yüksek olmasına rağmen mutasyon bulunma oranı düşük olması incelenmesi gerekiyor.

6.1. Sonuç

- 1- Materyal özellikleri: yayma preparatlardan elde edilen DNA lar FFP materyallere göre mutasyon testlerinin başarısı için daha uygundur.
- 2- DNA kalitesi boyut kontrol veya SL incelemesi FFP örneklerde yapıldığından direkt sekans için test başarısı ve RT-PCR için Ct değerleri ile ilişkilidir.
- 3-Tümör hücre oranı mutasyon saptanmasında özellikle duyarlılığı düşük yöntemlerde test başarısı için önemlidir.
- 4- LPL olgularında MYD88 mutasyon oranı literatüre uygundur.
- 5- MYD88 L265P mutasyonu pozitif bulunan vakalarda DNA kalitesini gösteren SL değerleri ile Ct karşılaştırıldığında istatistiksel olarak Ct değerleri ile SL boyutları arasında istatistiksel olarak anlamlı ters ilişki saptanmıştır (P=0.033).
- 6- Kullandığımız materyallerden elde edilen DNA konsantrasyonları Ct değerleri ile karşılaştırma yapıldığında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.586).
- 7- Yapılan istatistiksel incelemelerde yaymalarda Ct değerlerinin FFP örneklerden anlamlı şekilde düşük bulunduğu saptanmıştır (P=0.008).
- 8- MYD88 L265 mutasyonu pozitif bulunan vakalarda Ct ve lenfosit ve plazma hücre oranları arasında yapılan istatistiksel incelemelerde anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.190).

KAYNAKLAR

- 1 Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Seminars in cancer biology*. 2013 Dec;**23**(6):422-30.
- 2 Bianchi G, Sacco A, Kumar S, Rossi G, Ghobrial I, Roccaro A. Candidate genes of Waldenstrom's macroglobulinemia: current evidence and research. *The application of clinical genetics*. 2013;**6**:33-42.
- 3 Iwatani K, Takata K, Sato Y, et al. Low-grade B-cell lymphoma presenting primarily in the bone marrow. *Human pathology*. 2014 Jul;**45**(7):1379-87.
- 4 van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews Genetics*. 2001 Mar;**2**(3):196-206.
- 5 Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical research in toxicology*. 2001 Jul;**14**(7):767-90.
- 6 Fryxell KJ, Moon WJ. CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Molecular biology and evolution*. 2005 Mar;**22**(3):650-8.
- 7 Haber JE. DNA recombination: the replication connection. *Trends in biochemical sciences*. 1999 Jul;**24**(7):271-5.
- 8 Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science (New York, NY)*. 1999 Dec 3;**286**(5446):1897-905.
- 9 TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ DMCA. 2013.
- 10 Prosnitz L MPN-HsII, Perez C BL, Halperin E, Schmidt-Ulrich R, editors. Principles and practise of radiation oncology. 4thed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004:2064-6.
- 11 Wagner N BNLIGR. The Washington Manual of Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; . 2004: p. 278-97.
- 12 Sevil KILÇIKSIZ BP, 2 Burak Umut ÇAĞLAR,3 Tümay GÖKÇE,1 Özlem YERSAL,3 Süheyla DENİZ. Non-Hodgkin lenfomalı olgularda standart prognostik faktörlerin 50 ve 60 yaş üstü-altı için değerlendirilmesi ve pik yaşı. *türk onkoloji dergisi*. 2006.
- 13 Abbas AK LA, Pillai S. B cell activation and antibody production., In: Abbas AK LA, Pillai S, eds. *Cellular and molecular immunology.*, 7th edn. Philadelphia U, Elsevier Saunders, 2012:243-68.

- 14 Capaldi IB, May AM, Schmitt-Graeff A, et al. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Experimental and molecular pathology*. 2014 Aug;**97**(1):57-65.
- 15 Wada N, Zhan M, Hori Y, Honma K, Ikeda J, Morii E. Characterization of subpopulation lacking both B-cell and plasma cell markers in Waldenstrom macroglobulinemia cell line. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2014 Jan;**94**(1):79-88.
- 16 Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *The New England journal of medicine*. 2012 Aug 30;**367**(9):826-33.
- 17 Poulain S, Roumier C, Decambren A, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2013 May 30;**121**(22):4504-11.
- 18 Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E, et al. A clinicopathological study of nodal marginal zone B-cell lymphoma. A report on 21 cases. *Histopathology*. 2006 Jan;**48**(2):162-73.
- 19 Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Jan 20;**197**(2):263-8.
- 20 Motshwene PG, Moncrieffe MC, Grossmann JG, et al. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Sep 11;**284**(37):25404-11.
- 21 Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in immunology*. 2014;**5**:367.
- 22 Toubiana M, Gerdol M, Rosani U, Pallavicini A, Venier P, Roch P. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: complete cds and gene expression levels. *Developmental and comparative immunology*. 2013 Jun;**40**(2):158-66.
- 23 Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime reports*. 2014;**6**:97.
- 24 Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988 Jan 29;**52**(2):269-79.
- 25 Lemaitre B, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;**p. 973-83**.
- 26 Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;**351**(6325):355-6.

- 27 Nomura N MN, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. . DNA Res 1994;**1**:27-35.
- 28 Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. Genomics. 1996 Mar 15;**32**(3):486-8.
- 29 Akira S. Toll-like receptor signaling. The Journal of biological chemistry. 2003 Oct 3;**278**(40):38105-8.
- 30 Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from Mycoplasma pneumoniae activate nuclear factor-kappaB through toll-like receptors 1 and 2. Immunology. 2007 Aug;**121**(4):473-83.
- 31 Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2000 Dec 15;**165**(12):7125-32.
- 32 Nijhuis MM, Pasterkamp G, Sluis NI, de Kleijn DP, Laman JD, Ulfman LH. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. Journal of vascular research. 2007;**44**(3):214-22.
- 33 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science (New York, NY). 2004 Mar 5;**303**(5663):1526-9.
- 34 Andreakos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? Immunological reviews. 2004 Dec;**202**:250-65.
- 35 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 2001 Oct 18;**413**(6857):732-8.
- 36 Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2000 Jun 1;**164**(11):5998-6004.
- 37 Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997 Oct 31;**91**(3):295-8.
- 38 Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current opinion in immunology. 2002 Feb;**14**(1):103-10.
- 39 Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. The Journal of infectious diseases. 2002 Nov 15;**186**(10):1522-5.

- 40 Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jan 28;**275**(4):2251-4.
- 41 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Jun 7;**189**(11):1777-82.
- 42 Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science (New York, NY)*. 1997 Nov 28;**278**(5343):1612-5.
- 43 Burns K, Martinon F, Esslinger C, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 15;**273**(20):12203-9.
- 44 Bryant CE, Symmons M, Gay NJ. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. *Molecular immunology*. 2014 Jul 28.
- 45 Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual review of biochemistry*. 2007;**76**:141-65.
- 46 Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Molecular interventions*. 2003 Dec;**3**(8):466-77.
- 47 McGettrick AF, O'Neill LA. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Molecular immunology*. 2004 Jul;**41**(6-7):577-82.
- 48 Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science (New York, NY)*. 1988 Oct 28;**242**(4878):540-6.
- 49 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999 Jul;**11**(1):115-22.
- 50 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977 Dec;**74**(12):5463-7.
- 51 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977 Feb;**74**(2):560-4.
- 52 Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986 Jun 12-18;**321**(6071):674-9.
- 53 Ansorge W, Sproat BS, Stegemann J, Schwager C. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 1986 Dec;**13**(6):315-23.

- 54 Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic acids research*. 1987 Jun 11;**15**(11):4593-602.
- 55 Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*. 2006;**1**(3):1559-82.
- 56 Piatkowski J, Skalniak A, Bodzioch M, Pach D, Hubalewska-Dydejczyk A. [Introduction to human genome sequencing in diagnostics]. *Przegląd lekarski*. 2013;**70**(7):458-62.
- 57 Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002 Aug;**29**(1):23-39.
- 58 Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005 Jul;**39**(1):75-85.
- 59 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;**17**(12):2257-317.
- 60 Jimenez C, Chillón Mdel C, Balanzategui A, et al. Detection of MYD88 L265P mutation by real-time allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2014 Nov-Dec;**22**(10):768-73.
- 61 Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013 Mar 14;**121**(11):2051-8.
- 62 Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013 Mar 28;**121**(13):2522-8.
- 63 Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *American journal of clinical pathology*. 2013 Sep;**140**(3):387-94.
- 64 Martinez-Lopez A, Curiel-Olmo S, Mollejo M, et al. MYD88 (L265P) somatic mutation in marginal zone B-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology*. 2015 May;**39**(5):644-51.
- 65 Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. 2013 Jan;**27**(1):183-9.

- 66 Ansell SM, Hodge LS, Secreto FJ, et al. Activation of TAK1 by MYD88 L265P drives malignant B-cell Growth in non-Hodgkin lymphoma. *Blood cancer journal*. 2014;**4**:e183.
- 67 Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. 2014 Aug;**28**(8):1698-704.
- 68 Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011 Feb 3;**470**(7332):115-9.

ÖZGEÇMİŞ

Ad, Soyadı : Shaghayegh REZAPOURBEHNAGH

Doğum Tarihi : 21 September 1983

Doğum Yeri : Urmiya- Iran

Milliyet : İranlı

Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe, Arapça, Farsça

Medeni Durum : Bekâr

Ev Adresi : Turkey Ankara, Esat Seyran Cad. 4/11

Tel : (+)90-531 361 2410

Email : shaghayeg.rezapor@gmail.com

Eğitim Dürümü

1990 - 1996 : İlköğretim

Özel BOALI İlköğretim -Urmiya-İran

1996 - 2002 : Lise

Özel NIYAYESH Okulları -Urmiya-İran

2005 - 2009 : Lisans

İran-Urmia Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü(Ortalama:3.38) Derece: Biyolog

2013-present : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji

Toelf İBT : 87

GRE : 730

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Shaghayegh Rezapourbehnagh¹, Hale Kivrak², Gulsah Kaygusuz², Isinsu Kuzu
DIFFERENT FACTORS EFFECTING THE DETECTION OF MYD88 MUTATION IN
SMALL B CELL LYMPHOMAS WITH PLASMA CELL DIFFERENTIATION

5th International Congress on Leukemia Lymphoma Myeloma (Poster Sunumu)



DIFFERENT FACTORS EFFECTING THE DETECTION OF MYD88 MUTATION IN SMALL B CELL LYMPHOMAS WITH PLASMA CELL DIFFERENTIATION

Shaghayegh Rezapourbehagh¹, Hale Kivrak², Gulsah Kaygusuz², Isinsu Kuzu²
¹Ankara University Institute of Biotechnology
²Ankara University School of Medicine, Department of Pathology

Introduction

MYD88 L265P single amino-acid mutation has been reported in ~90% of Lymphoplasmacytic lymphoma /Waldenström's Macroglobulinemia (LPL/WM) and /or immunoglobulin M (IgM) monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS). Although this mutation is not specific for LPL/WM, it can be used for differential diagnosis with the other laboratory and clinical data on routine practice considering the sensitivity of detection. One problem effects sensitivity is the allele burden status or the amount of the neoplastic cells within the available sample. The other problem is the DNA fragmentation or quality which is effected by the formalin fixation of the tissues. Different methods can be performed for mutation analysis. Sanger sequencing (SS) is the gold standart method for mutation analysis. But this method could miss the mutation if the allele burden status is less than 20-30%. Quantitative allele specific PCR (ASq PCR) is more sensitive and can target safely point mutations. In this study, we aimed to compare the results of two different methods for the detection of MYD88 L265P mutation on various different tissue samples, previously diagnosed different small B cell Lymphomas.

Methods

Total of 63 various types of small B cell lymphomas were included in the study. (Table 3) Either formalin fixed paraffin embedded tissues or bone marrow smears of involved tissues were used for DNA extraction. For molecular analysis Quantitative Allele-specific polymerase chain reaction (q PCR) and Sanger sequencing (SS) methods were performed. In order to evaluate specific advantages and disadvantages of both methods, we compared the type of material used for molecular tests and as well as the DNA fragmentation status. (Table 1)(Table 2)

•Statistical tests : Chi Square , Kruscal Wallis

Table 1: Sanger sequencing primers

Primers for SS primers (amplify a 375 bp)	
Forward,	5-GTTGAAGACTGGGCTTGCC-3
Reverse,	5-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3

Table 2: q PCR primers

Primers for AS qPCR	
forward	5-GTTGAAGACTGGGCTTGCC-3 (wild type)
Reverse	5-GTTGAAGACTGGGCTTGCC-3 (mutant)
Reverse	5-GTTGAAGACTGGGCTTGCC-3

Table 3: The distribution of the diagnosis and patients' demographic data

Diagnosis	case #	Age	St dev	Gender	
				F	M
SPMZL	17 (26.98%)	61.65	10.470	9(47.1%)	9(52.9%)
LPL	13 (20.63%)	62.23	12.417	6(46.2%)	7(53.8%)
MZL NOS	9 (14.28%)	61.56	12.218	4(44.4%)	5(55.6%)
NMZL	10 (15.87%)	60.80	12.515	6(60%)	4(40%)
FL	3 (4.76%)	31.67	9.713	1(33.3%)	2(66.7%)
EMZL	3 (4.76%)	33.67	12.014	1(33.3%)	2(66.7%)
MM	5 (7.93%)	59.20	15.515	2(40%)	3(60%)
SDRPL	3 (4.76%)	66.33	19.035	1(33.3%)	2(66.7%)

SPMZL (Splenic Marginal Zone lymphoma), LPL (lymphoplasmacytic lymphoma), MZL (Marginal zone lymphoma NOS), NMZL (Nodal Marginal Zone Lymphoma), FL (Follicular lymphoma), EMZL (Extranodal Marginal Zone Lymphoma), MM (Multiple Myeloma), SDRPL (Splenic Red Pulp Lymphoma)

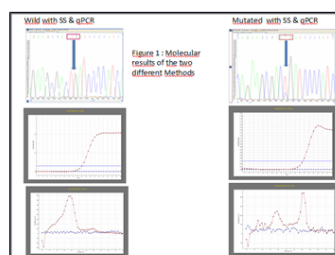


Table 4 : Distribution of the molecular results

Diagnosis	case #	Sanger Sequence (SS)	Allel specific Quantitative PCR (ASqPCR)
SPMZL	17	0(0%)	2(11.8%)
LPL	13	3(23.1%)	9(69.2%)
MZL NOS	9	1(11.1%)	2(22.2%)
NMZL	10	1(10%)	2(20%)
FL	3	0(0%)	0(0%)
EMZL	3	0(0%)	0(0%)
MM	5	0(0%)	0(0%)
SDRPL	3	0(0%)	2(66.7%)

Table 5: Type of the material used on mutated cases

Material type	qPCR +/SS+ n (%)	qPCR +/SS- n (%)
FFP LN	1 (20)	4 (33,3)
FFP Splen	0	2 (16,7)
BM Smears	4 (80)	6 (50)
Total	5	12

FFP : formalin fixed paraffin embedded
 LN: Lymph node , BM: Bone marrow

Table 6: The effect of DNA fragmentation and concentration on discrepancy of the molecular results

DNA size	qPCR vs SS	Case #	Mean/Mean Rank
	Qpcr (+)/Sekanse(+)	5	420(45.30)
(p=0.018)	Qpcr (+)/Sekanse(-)	12	350(40)
	DNA concentration	5	323(26.60)
(p=0.473)	Qpcr (+)/Sekanse(-)	12	334(27.08)

Conclusion

- MYD88 mutation is most frequently seen among the LPL cases in our series. Certain number of MZL's either splenic or nodal types were also carrying mutation. Table 4)
- ASqPCR was more sensitively detected the mutation comparing to SS.
- The most significant factor was the DNA fragmentation status detected different between the SS and ASqPCR groups.
- Different factors effecting the results of the mutation status should be considered on interpretation. (Table 5) (Table 6)
- Most sensitive and reliable methods should be performed and optimised to obtain reliable results for mutation detection, especially for guiding the targeted therapies.

References

- Rossi, D., C. Ciardullo, and G. Gaidano. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol.* 2013; 23(6): p. 422-30.
- Bianchi, G., et al. Candidate genes of Waldenström's macroglobulinemia: current evidence and research. *Appl Clin Genet.* 2013; 6: p. 33-42.
- Ivattani, K., et al. Low-grade B-cell lymphoma presenting primarily in the bone marrow. *Hum Pathol.* 2014; 45(7): p. 1379-87.
- Toubiana, M., et al. Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: complete cds and gene expression levels. *Dev Comp Immunol.* 2013; 40(2): p. 153-65.
- Deguine, J. and G.M. Barton. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: p. 57.
- Treon, S.P., et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012; 367(6): p. 628-33.
- Fouail, S., et al. MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2013; 121(22): p. 4504-11.