

**KRONİK MYOLOSİDER LÖSEMİLİ HASTALARIN SİTOGENETİK ANALİZİ  
VE  
RT-PCR TEKNİĞİ İLE BCR-ABL GEN DİZİLİMİNİN TEŞHİSİ**

**MUSTAFA AŞÇI**

**144451**

**Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Öğretim  
Yönetmenliği Uyarınca Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.**

**Danışman: Yrd.Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ**

**MART 2005**

# YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DÖKÜMANTASYON MERKEZİ

## TEZ VERİ RAPORU

TEZ NO:

KONU KODU:

ÜNİV. KODU

Tez Yazarının

**Soyadı:** AŞÇI

**Adı:** Mustafa

**Tezin Türkçe Adı:**

Kronik Myelositer Lösemili Hastaların Sitogenetik Analizi ve RT-PCR Tekniği ile bcr-abl Gen Diziliminin Teşhisi

**Tezin Yabancı Adı:**

Cytogenetic analysis of patients with Chronic Myeloid Leukemia and the diagnosis of bcr-abl gene arrengment with RT-PCR method

**Tezin Yapıldığı**

**Üniversite:** Celal Bayar

**Enstitü:** Sağlık Bilimleri

**Yılı:** 2005

**Tezin Türü:** 1-Yüksek Lisans\*

2-Doktora

3-Tıpta Uzmanlık

4- Sanatta Yeterlilik

**Dili:** Türkçe

**Sayfa Sayısı:** 62

**Referans Sayısı:** 58

**Tez Danışmanının**

**Ünvanı:** Yrd. Doç.Dr.

**Adı:** Nuray

**Soyadı:** ALTINTAŞ

**Türkçe Anahtar Kelimeler**

1- bcr-abl

2- philadelphia kromozomu

3- Kronik myelositer lösemi

4- RT-PCR

**Yabancı Anahtar Kelimeler**

1- bcr-abl

2- philadelphia chromosome

3- Chronic myeloid leukemia

4- RT-PCR

Tarih:

İmza:

M. Aşçı

## TUTANAK

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa AŞÇI'nın Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "Kronik Myelosider Lösemili (KML) Hastaların Sitogenetik Analizi ve RT-PCR Tekniği İle BCR-ABL Gen Diziliminin Teşhisi" başlıklı çalışma, Jürilerimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

14/03/2005

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ

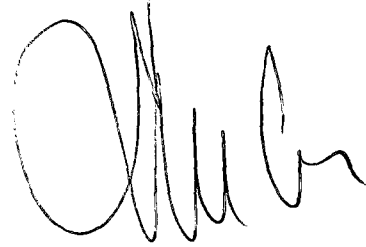
İmza



Üye Yrd.Doç.Dr. Nuran EKERBİÇER

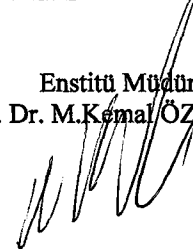


Üye Yrd. Doç. Dr. Sırrı ÇAM



Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14.03.2005 tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü V.  
Doç. Dr. M.Kemal ÖZBİLGİN



## ÖZET

Bio. Mustafa AŞÇI

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Manisa,  
TÜRKİYE

Kronik miyelositer lösemili hastaların %90'ında Philadelphia kromozomu bulunmaktadır. Philadelphia kromozomu 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon ile meydana gelir. Bu translokasyon sonucunda bcr-abl füzyon geni meydana gelir (4).

Bu çalışmanın amacı 25 KML hastasında bcr-abl hibrit geninin varlığının RT-PCR yöntemi ile gösterilmesi ve Ph kromozomun sitogenetik açıdan değerlendirilerek arasındaki korelasyonu belirlemektir. Olgularımızda bcr-abl geninin pozitif bulunma oranı %80 olarak saptanmıştır. Ph kromozomun pozitif bulunma oranı %80 olarak bulunmuştur. K562 hücre hattı pozitif kontrol olarak, distile su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Total RNA'ların pozitif kontrolü olarak ise B-actin primerleri kullanılmıştır.

Toplam RNA'lar kan, kemik iliği ve hücre soylarından izole edilerek; mRNA'lardan cDNA'lar sentezlenmiş ve böylece hedef DNA'lar PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. 25 KML hastasının bcr-abl düzenlenmesinin tespiti için oligonükleotid primerler uygulanmıştır.

PCR ürünü, agaroz jele yüklenerek mini jelde TBE tamponunda ayrılmış ve jel ethidium bromür ile boyanarak UV. ışığında görüntüleri elde edilmiştir. Sitogeneik analiz de ise kemik iliği materyalinden lenfosit kültürü yapılmış ve GTG boyama yapılarak mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. bcr-abl hibrit geninin protein ürünlerinin hücre içi fonksiyonları ve hangi mekanizmaları kullanarak hücreleri transforme ettiğinin anlaşılabilmesi için daha ileri araştırmalara gerek duyulmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre diğer yöntemlerden daha hızlı ve daha duyarlı olan PCR yönteminin malign hastalıkların tanısının konulması ve tedaviye verdiği cevabın izlenmesinde kullanılabileceği kanısındayız.

## SUMMARY

Bio. Mustafa AŞÇI

Dept. of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Celal Bayar University,  
Manisa, TURKEY.

Ninety percent of Chronic myelocider leukemia cases have Philadelphia chromosome (Ph). Ph chromosome occurs with the translocation between 9th and 22 th chromosomes. BCR-ABL fusion gene occurs after this translocation (4).

The aim of this study is to show bcr-abl hybrid gene existance with RT-PCR method in 25 CML cases and by estimating the Ph chromosome in cytogenetic way to determine the corelation between them.

In our cases it's established to be found the ratio of bcr-abl gene positiveis 80% and the ratio of Ph chromosome positive is 80%.

K562 cell line is used as positive control and pure water is used as negative controls of total RNA's. Total RNA's are isolated from blood, bone marrow and cell lineage; cDNA's synthesis from mRNA's so target DNA's are multiplied by PCR method. Oligonucleotide primers are applied to confrim of ordering bcr-abl in 25 CML cases.

PCR product is performed in agorose gel. By dying the gel with ethidium bromide, screen is obtained under UV. light.

In cytogenetic analysis lymphocyte culture has been done from bone marrow material and by doing GTG dying microscope analysis has been done. It requires more further studies for understanding bcr-abl gene's intracellular functions of protein products and by using which mechanisms it transformes cells.

As the results that we had, we understood that PCR method, which is more quick and more sensitive, could be used for diagnosing the malign illness and watching the response for the treatment.

## TEŐEKKÖR

Tez alıőmam sırasında deęerli bilgileri ile yol gősteren ve her tűrlű desteęi saęlayan deęerli hocam, danıőmanım ve Anabilim Dalı Baőkanım Sayın Yrd. Do. Dr. Nuray ALTINTAŐ'a, Dokuz Eylűl Őniversitesi Tıp Fakűltesi Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı Baőkanı hocam Sayın Prof. Dr. Meral SAKIZLI'ya, Dr. Sefa KIZILDAĖ'a, ve tűm bűlűm arkadaőlarımaya sonsuz teőekkűr ve saygılarımla.



## KISALTMALAR DİZİNİ

### KISALTMALAR

KML

Ph

bcr

abl

PZR

IFN-a

KİT

TSG

TYR

GAP

dntps

bp

RT-PCR

DMSO

TMAC

SSC

t(9;22) (q34;q11)

FISH

### AÇIKLAMALAR

Kronik Myelositer lösemi

Philadelphia kromozomu

Breakpoint Cluster Region Geni

Abelson Mürine Leukemia Virüs

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Interferon Alfa

Kemik İliği Transplantasyonu

Tümör Süpressör Gen

Tirozin Kinaz

GTPaz Activating Protein

Deoksiribonükleosid

Baz Çifti

Reverse Transcriptase (Polymerase Chain Reaction)

Dimethylsulfoxide

Tetramethylammoium chloride

Sodyum Sitrat-Sodyum Klorid

9. ve 22. Kromozom arasındaki translokasyon

Floresan in situ hibridizasyon

## TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Tablo Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1	Ph translokasyonuna ait tarihsel bilgi	4
Tablo 2	Hematopoez süreci	5
Tablo 3	Hematopoetik sistem malign hastalıklarının sınıflandırılması	7
Tablo 4	KML için kötü prognostik faktörler	10
Tablo 5	KML için prognostik evreleme sistemi	11
Tablo 6	Hızlı ve blastik faz KML'nin özellikleri	11
Tablo 7	Çeşitli kanser türlerinde rol oynayan bazı proto-onkogenler ve aktiveleştirici mutasyonları	15
Tablo 8	RNA'ların spektrofotometrik analizleri	39
Tablo 9	Ph kromozomu ve M-bcr/abl'nin korelasyonu	50



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Şekil No</u></b>	<b><u>Şekil Adı</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Şekil 1</b>	<b>Ph kromozomu</b>	<b>4</b>
<b>Şekil 2</b>	<b>KML hastasına ait periferik yayma</b>	<b>9</b>
<b>Şekil 3</b>	<b>t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>18</b>
<b>Şekil 4</b>	<b>9. ve 22. kromozomların translokasyon öncesi ve sonrası şekilleri</b>	<b>20</b>
<b>Şekil 5</b>	<b>Philadelphia kromozomunda bcr/abl füzyon geninin oluşumu</b>	<b>22</b>
<b>Şekil 6</b>	<b>b2a2 ve b3a2 kırılma bölgesi</b>	<b>24</b>
<b>Şekil 7</b>	<b>PCR'da siklus aşamaları</b>	<b>28</b>
<b>Şekil 8</b>	<b>PCR'ın özeti</b>	<b>43</b>
<b>Şekil 9</b>	<b>Kemik iliğinden kromozom analizi şeması</b>	<b>48</b>
<b>Şekil 10</b>	<b>jel görüntüsü</b>	<b>49</b>
<b>Şekil 11</b>	<b>KML olgulu bir vakada karyotip sonucu</b>	<b>51</b>

## İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1. KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ (KML)'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Klinik Bulgular</b>	<b>6</b>
<b>2.3. LABORATUAR BULGULARI</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1 Kan</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2. Kemik iliği</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Prognoz</b>	<b>9</b>
<b>2.5. Lösemnin Nedenleri</b>	<b>11</b>
<b>2.5.1. Genetik Faktörler</b>	<b>12</b>
<b>2.5.1.A. Onkogenler</b>	<b>13</b>
<b>2.5.1.B. Tümör Supressör Genler</b>	<b>14</b>
<b>2.7. Kanser Hücreleri ve Hücre Döngüsü</b>	<b>16</b>
<b>2.7.1 Primer Karyotipik Değişimler</b>	<b>17</b>
<b>2.7.2. Sekonder Karyotipik Değişimler</b>	<b>17</b>
<b>2.10. Kronik Myelositer Lösemide Sitogenetik Gözlemler</b>	<b>18</b>
<b>2.10.1. Philadelphia Kromozomu (Ph')</b>	<b>19</b>
<b>2.11. Ph' Kromozomunun Moleküler Analizi</b>	<b>20</b>
<b>2.11.1. c-ABL Geni</b>	<b>21</b>
<b>2.11.2. Breakpoint Cluster Region (BCR) Geni</b>	<b>22</b>
<b>2.11.3. c-ABL Proteininin Biyolojisi ve Fonksiyonu</b>	<b>24</b>
<b>2.11.4. Normal bcr Gen Ürünleri</b>	<b>25</b>
<b>2.11.5. Hibrit P210 bcr-abl Proteini</b>	<b>26</b>
<b>2.11.6. abl-bcr Hibrit Geni ve Özellikleri</b>	<b>27</b>
<b>2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Yöntemi</b>	<b>27</b>
<b>2.12.1. RT-PZR Yöntemi</b>	<b>28</b>
<b>2.12.2. RNA İzolasyonu</b>	<b>29</b>
<b>2.12.3. cDNA Sentezi</b>	<b>30</b>

<b>2.12.4. cDNA Primerleri</b>	<b>30</b>
<b>2.12.4.1. Spesifik Primer Yöntemi</b>	<b>30</b>
<b>2.12.4.2. Oligo dT Yöntemi</b>	<b>30</b>
<b>2.12.4.3. Rastgele Primerleme Yöntemi</b>	<b>31</b>
<b>2.13. PZR AMPLİFİKASYONU</b>	<b>31</b>
<b>2.13.1. PZR İçin Primer Sentezi</b>	<b>31</b>
<b>2.14. PZR'IN REAKSİYON İÇERİĞİ</b>	<b>31</b>
<b>2.15. Nükleik Asit Kontaminasyonu</b>	<b>32</b>
<b>2.16. Genomik DNA Kontaminasyonu</b>	<b>33</b>
<b>3. GEREÇ-YÖNTEM</b>	<b>35</b>
<b>3.1. GEREÇ</b>	<b>35</b>
<b>3.2.YÖNTEM</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1. Kimyasallar ve Kitler</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1.A.Moleküler Çalışma</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1.A.1.Oligonükleotid Primerleri</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1.A.2. Diğer Araç ve Gereçler</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1.A.3. RNA İzolasyonu</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1.A.4. RNA İzolasyon Protokolü</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1.A.5. Primerlerin Sulandırılması</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1.A.6. RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1.A.7. Nested PZR</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1.A.8. Jel Dökümü ve DNA'nın Yürütülmesi</b>	<b>41</b>
<b>3.2.1.B. Sitogenetik Çalışma</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1.B.1. Kimyasallar</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1.B.2. Kullanılan Araç ve Gereçler</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1.B.3. Besi Ortamı Protokolü</b>	<b>45</b>
<b>3.2.1.B.4. Metafaz Kromozomların Eldesi</b>	<b>45</b>
<b>3.2.1.B.6. GTG Bantlama</b>	<b>46</b>

<b>3.2.1.B.7. Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1.B.8. Tripsin Giemsa Bantlama (GTG-Banding) Aşaması</b>	<b>47</b>
<b>4.BULGULAR</b>	<b>49</b>
<b>5.TARTIŞMA-SONUÇ</b>	<b>52</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>57</b>



## 1. GİRİŞ

Kronik myelositer lösemi (KML) (kronik granulositer lösemi) ilk kez 150 yıl önce tanımlanmış ve Virchow tarafından " Leukamie " terimi kullanılmaya başlanmıştır. 1900 yılında ABO kan grubunun Landsteiner tarafından bulunması ile insan kan grupları genetiğın hematolojideki önemini gösteren ilk dönüm noktası olmuştur. Daha sonra 1956 yılında Tijo ve Levan adlı bilim adamları tarafından, insan kromozom sayısının ( $2n = 46$ ) ortaya konulmasından sonra pek çok hastalık türlerinde olduğu gibi insan kanserlerinde de kromozomal değişikliklerin daha yoğun bir şekilde incelenmesi sağlandı ( 1, 2).

1960 yılında Nowell ve Hungerford'un KML'ye özgü olan Philadelphia (Ph') kromozomunu göstermeleri üzerine pek çok lösemi türünde lösemiye ait kromozom anomalileri saptanmasında büyük artışlar olmuştur. Lösemiler grubunun %15-20'sini oluşturan ve %90-95'inde Philadelphia (Ph') kromozomu varlığı saptanan KML, bilinen ilk sitogenetik "marker" birlikteliği ile tanınan malign hastalık olmakla önem taşımaktadır. Saptanan bu anomaliler prognostik değerlerinin ortaya konmasıyla büyük önem taşır.

Her bir kanser türünün farklı özellikleri, oluşum, ve tedavi edici özellikleri vardır. Günümüzde kanser üzerindeki araştırmalarda ana görev neoplastik dönüşümlerden sorumlu genetik değişimleri ortaya koymaktır. Yapılan sitogenetik çalışmalarda çeşitli kromozomal anomaliler saptanmıştır. Rastgele olmayan kromozomal değişim noktaları lösemi, lenfoma ve myelodisplazi ile uyumludur. Bu kromozomal bölgelerin kanser oluşumunda gerçek rol oynadıkları düşünülmektedir (3,4,5). Lösemiler hücre büyüme ve çoğalmasını kontrol eden genetik mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkar ve diğer malignant hastalıklar gibi bir dizi genetik değişimin sonucudur. Bu genetik değişimler, tek bir hücre içinde oluşarak, onu normal bir hücreden malignant bir hücreye dönüştürürler (5).

Son 20 yılda gelişen moleküler teknikler bazı hematolojik hastalıkların mekanizmalarını aydınlatmaya başlamıştır. KML hastalığının etkeni 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki yeniden bir düzenlemeyle ortaya çıkan

Philadelphia (Ph') translokasyonudur t(9;22)(q34;q11). Böylece oluşan iki kimerik gen bcr-abl (kromozom 22) ve abl-bcr (kromozom 9)'nın gösterilmesiyle KML için moleküler tanı ve tedavide önemli bir aşamaya ulaşılmıştır (6). Moleküler çalışmalar, kromozom 9 ve 22'deki yer değiştirme sonucu normal abl ve bcr genlerindeki yapısal bozukluğu ortaya çıkan kimerik bcr-abl geninin ise şekil değiştirmiş bir füzyon proteini kodladığını göstermiştir.

Ancak lösemili olgularda gerek metafaz kromozomu elde edilmesinin zor olması, gerek bantlama tekniklerinin özellikle lösemi genetiğinde her zaman genetik analize izin vermiyor olması, buna karşın PZR yönteminin hızlı, güvenilir olduğu, rutin laboratuvar şartlarında uygulanabildiği ve lösemi prognozu hakkında yol gösterici olduğu literatürde belirtilmektedir (6).

Moleküler biyolojide (PZR) yöntemi, genetik bozuklukların saptanmasında en duyarlı yöntemdir. Bu nedenle biz de bu yöntemi kullanarak KML hastalarında bcr-abl gen diziliminin tespiti ve sitogenetik açıdan karşılaştırılmasını amaçladık.

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı, Manisa Devlet Hastanesi ve Yeşil Yurt Devlet Hastanesi Hematoloji Servisine başvuran, KML tanısı konmuş olan hastaların Konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle anomalilerin değerlendirilmesinin her zaman tanımlanamayan rastgele olmayan translokasyonların RT-PZR (reverse-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle bcr-abl protoonkogen gen varlığının tespiti ve moleküler düzeyde tanımlanmasına çalışılacaktır. Ayrıca lösemilerde metafaz kromozomu elde edilmesinin zor olması, buna karşın literatürde belirtildiği üzere polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi genetik bozuklukları saptamada en duyarlı yöntem olması çalışmamızı bu tekniğe yönelmemizi sağlamıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ (KML)'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ

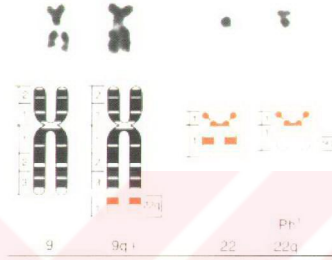
Lösemiler ilk kez 1845'te Craigie, Bennett ve 1846'da Virchow tarafından dalağın kronik olarak büyümesinin kan hücrelerindeki artış ile birlikteliği olarak tanımlanmıştır. Yunanca "leukos" (beyaz) ve "haima" (kan) sözcüklerinden oluşan "Leukemia" adı ise ilk kez yine Virchow tarafından 1847'de önerilmiştir. Bunu izleyen yıllarda klinikte splenomegalinin ve lenfadenopatinin ağırlıklı olduğu tipler olarak iki farklı form tanımlanmıştır. İlk kez Friedreich, hızlı ilerleyen akut formu 1857'de tanımlamıştır.

Kan hücrelerinin boyanması için Ehrlich metodunun tanımlanmasından hemen sonra değişik klinik formlarda, değişik kan hücrelerinin söz konusu olduğu ortaya çıkmış ve Reschad ve Schilling-Torgau 1913'te ilk monositik lösemiye bildirmişlerdir. 1895'de Vaquez persistan polisitemiyi tanımladıktan sonra 1907'de lösemi ile birlikte anemi görülen olguların ilk serisi Meyer ve Heineke tarafından yayımlanmıştır (7,8). Neumann 1878'de kemik iliğinin ürettiği hücrelerin tek tip olmadığını, değişik tip hücrelerin üretildiği bir merkez olduğunu vurgulamış; lösemnin buradan kaynaklandığını belirlemiş ve adını da myelogene olarak önermiştir (8).

KML hemopoyetik bir kök hücre hastalığı olup, anemi ile karakterizedir. Kanda olgunlaşmamış granulositler ve bazofiller gözlenmektedir (9). KML hastalarının ~ % 90'ında Ph' kromozomu bulunurken, % 10'unda Ph' translokasyonu sitogenetik olarak gözlenmemektedir (10). Ph' translokasyonu gözlenmeyen bu grubun % 50'sinde Ph' translokasyonu (Şekil 1) yani bcr-abl translokasyonu moleküler yöntemler ile tespit edilirken, geri kalan % 50'sinde izlenmemektedir. Ancak bu gruptaki hastaların kliniği, diğer KML hastalarına uyum göstermektedir (11,12).

Sitogenetik anomaliler ilk kez 1960'da Nowell ve Hungerford tarafından gözlenmiştir. Tablo 1'de Ph' translokasyonunun tarihi ve moleküler bulguları listelenmiştir (8). KML oldukça nadir görülen bir hastalıktır. Bütün lösemiler içinde % 15'lik bir payı bulunmaktadır. Populasyonda yaklaşık 1-2/100.000

oranında gözlenmektedir. KML bütün yaş gruplarında gözlenmesine karşın, 40 yaşın altında nadir şekilde ve erkeklerde de kadınlardan (E/K=3/2) daha fazla bulunmaktadır (19).



Şekil 1: Ph kromozomu (wisc.edu clarkPubFigpub15\_16.jpg) (55)

Tablo 1. Ph' translokasyonuna ait tarihsel bilgi (8).

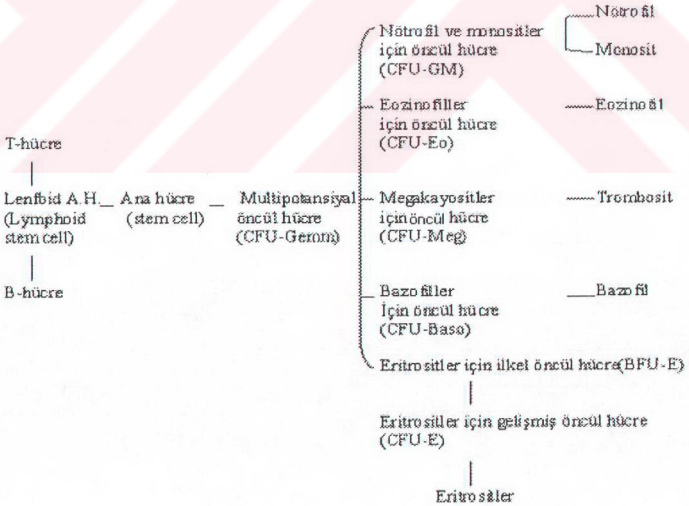
Yıl	Buluş	Araştırmacı
1960	Ph' kromozomu, G grubu	Nowell ve Hungerford
1970	Ph' translokasyonu 22 q-dir	Caspersson ve arkadaşları
1973	Ph' t (9:22) translokasyonudur	Rowley ve arkadaşları
1982	ABL geni 9. ve 22.kromozomlarda gösterildi	Deklein
1984	22.kromozomda BCR geni tanımlandı	Groffen
1984	t(9:22)'de bant bölgeleri t(9:22)(q34.1;qll.21)	Prakash ve Yunis
1984	ABL transkriptinin keşfi	Gale ve Canaani
1985	P210.BCR-ABL proteini tanımlandı	Konopka
1985	BCR-ABL hibrit geni gözlemlendi	Shtivelman



Hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecindeki bazı hatalar hücre ve ait olduğu dokuda malign değişime yol açabilirler (13). Bu nedenle herhangi bir dokunun malign değişiminin yorumlanabilmesi için, o dokuya ait hücrelerin farklılaşma sürecinin de göz önünde bulundurulması önem taşımaktadır. Kan dokusunu oluşturan hücrelerin gelişip çoğalma süreci (hematopoiesis) Tablo-2'de görülen biçimde belirtilmektedir (14).

Diğer dokularda olduğu gibi hematopoetik sistemde de bu sürecin sağlıklı ve normal olması için kilit rol oynayan proteinler ve bunlardan sorumlu genler bilinmektedir. Farklılaşma süreci içerisinde zaman zaman görev alarak bu sürecin tamamlanmasını sağlayan bu genlerde meydana gelen herhangi bir değişim (mutasyon), farklılaşma-çoğalma hatalarına yol açabilmektedir (13,15,16).

Tablo 2: Hematopoez süreci ( Rothstein G. Origin and development of the blood and blood forming tissues. Clinical Hematology,1993, temel alınarak hazırlanmıştır.)



Bu genlerin sorumluluğundaki farklılaşma düzeyi ise gelişecek neoplazinin özelliklerini belirleyecektir. Bunun yanı sıra çevresel faktörlerde her dokuya ait birden fazla malign transformasyon tipini ortaya çıkarmaktadır. Tablo-3'de kan dokusunun malign hastalıkları için en çok kabul gören sınıflama görülmektedir (8).

Ph' kromozomunun hematopoetik hücrelerde gösterilmesine karşın, fibroblastlarda gösterilememesi sitogenetik bozukluğun sonradan kazanıldığını düşündürür. Monozigot ikizlerden sadece birisinin hastalığa yakalanması da bu hipotezi destekler (18).

## 2.2. Klinik Bulgular

En sık rastlanan şikayetler yorgunluk, kendini iyi hissetmeme, kilo kaybı, iştahsızlık, sol hipokondriumda dolgunluk hissi, karın ağrısı ve aşırı terlemedir. Bu şikayetler nonspesifiktir ve haftalar, aylar içinde meydana gelir. Bazı olgularda tanı, hastalık semptomatik hale gelmeden rutin kan sayımları sırasında konulabilir.

Nadiren hipermetabolizm (gece terlemesi, kilo kaybı, sıcak intoleransi), akut gut artriti (hiperürisemiye bağlı), priapizm, kulak çınlaması veya stupor (lökostaza bağlı), splenik infarkt ve perisplenitise bağlı sol üst kadranda ve sol omuz ağrısı gibi semptomlar görülebilir. Fizik muayenede en sık rastlanan bulgular splenomegali, solukluktur. Hepatomegali, purpura ve retinal hemoraji de sık rastlanan bulgulardır. Dalak karnın sol tarafını tamamen dolduracak kadar büyüyebilir ve oldukça sert olup dalak infarktüsü oluşmadıkça palpasyonda ağrı yoktur. Dalağın spontan rüptürü nadiren görülür. Nötrofillerin deride perivasküler infiltrasyonuna bağlı olarak akut febril nötrofilik dermatosis görülebilir.

Tablo-3-: Hematopoetik sistem malign hastalıklarının sınıflandırılması  
(AK Sullivan'dan modifiye edilmiştir.)

<p>I. ANA HÜCRE (STEM CELL)DEN KAYNAKLANAN NEOPLAZİLER</p> <p>A) Matürasyon görülen: Kronik miyelositer lösemi (KML)</p> <p>- Granulositik - Eozinofilik - Bazofilik - Mast hücre ağırlıklı</p> <p>B) Matürasyon görülmeyen: KML-miyeloblastik faz (Philadelphia kromozomu bulunan)</p> <p>- Miyeloid farklılaşma ağırlıklı - Lenfoid farklılaşma ağırlıklı</p> <p>C) Karışık miyeloid/lenfoid farklılaşma</p> <p>II. OLASI MULTİPOTANSİYEL ANA HÜCRE (MULTİPOTENT STEM CELL) KAYNAKLI NEOPLAZİLER</p> <p>A) Miyelodisplastik sendromlar</p> <p>- Refrakter anemi (RA) - Ring sideroblastlarla birlikte RA - Blast artışı ile birlikte RA - Kronik miyelomonositer lösemi - Artmış transforme blast ile birlikte RA</p> <p>B) Kronik miyeloproliferatif hastalıklar</p> <p>- Polisitemia rubra vera - Trombositemi - Miyelofibrozis (AML:M7 ile birlikte olmayan)</p> <p>III. OLASI MİYELOİD ORTAK ÖNCÜLLER (MYELOID-COMMITTED PRECURSORS) KAYNAKLI NEOPLAZİLER</p> <p>A) Akut miyeloid lösemi (AML)</p> <p>- Miyeloblastik lösemi, minimal farklılaşma: MO - Miyeloblastik lösemi, matürasyon yok: M1</p> <p>- Miyeloblastik lösemi, matürasyon van M2 - Promiyelositik lösemi: M3</p> <p>- Miyelomonositik lösemi: M4 - Monositoid lösemi: M5 (Monoblastik: M5a, Monositik: M5b)</p> <p>- Eritrolesemi: M6- Megakaryoblastik lösemi: M7</p> <p>B) Malign histiyositoz</p> <p>IV. LENFOİD ORTAK ÖNCÜLLERİ (LYMPHOID-COMMITTED PRECURSORS) NEOPLAZİLERİ</p> <p>A) İmmatur fenotip: Akut lenfoblastik lösemi</p> <p>- B-hücre - T-hücre</p> <p>B) Ara veya rnatür fenotip - B veya T farklılaşması- Nodal / splenik faz - Lösemik faz a. B-hücre: - Non-Burkitt lenfoma - Burkitt lenfoma b. T-hücre: - Lenfoblastik lenfoma - ErişkinT-hücre lösemi/lenfoma - Sezary sendromu - Diğerleri</p> <p>C) Matur lenfositer fenotip</p> <p>- Promiyelositik lösemi: a. B-hücre b. T-hücre</p> <p>- Kronik lenfositik lösemi: a. B-hücre b. T-hücre c. Geniş granüler lenfositik lösemi</p> <p>- "Hairy cell" lösemi ve varyantları: a. B-hücre b. T-hücre</p> <p>D) Plazmositoid fenotip</p> <p>- Makroglobülinemi - "Ağır zincir" hastalığı - Miyeloma</p> <p>V. OLASI LENFOİD KAYNAKLI NEOPLAZİLER</p> <p>- Nodüler skleroz - Lenfoid ağırlıklı - Karışık hücreli -Lenfosit baskılanması</p>
---

## 2.3. LABORATUAR BULGULARI

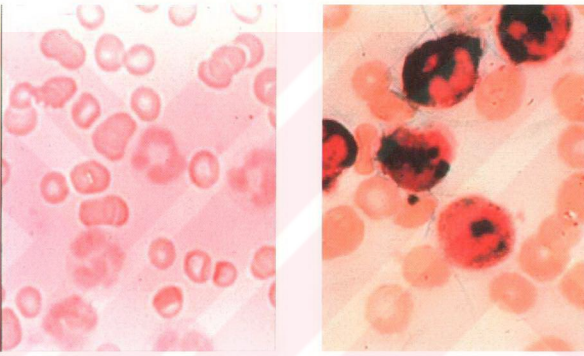
### 2.3.1 Kan

KML tanısı kan hücrelerinin sayımı ve çevresel kan yaymasının incelenmesi ile konabilir. Tanı sırasında hastaların büyük bölümünde hematokrit düşüktür. Eritrositlerde çok hafif şekil ve büyüklük değişikliği vardır. Çok az sayıda normoblast bulunabilir. Retikulosit sayısı normal veya hafif artmıştır. Seyrek olarak eritrositöz veya eritroid aplazi görülebilir (20-22). Total lökosit sayısı tanı anında yüksek bulunur ve çoğunda  $25 \times 10^6$  ml.'den, olguların yarısında ise  $100 \times 10^6$  ml.'den fazladır. Genellikle nötrofilik serinin miyeloblasttan, nötrofile kadar olan tüm evreleri bulunur. Çoğunluğunu segment nötrofiller ve miyelositler oluşturur. Blastik krize girene kadar blast ve promiyelosit oranı düşüktür. Tedavi edilmeyen olgularda lökosit sayısı progressif olarak artar (20, 22).

KML hastalarının % 90'ından fazlasında nötrofil alkalin fosfataz aktivitesi düşük veya yoktur (20,22). KML' li hastaların nötrofillerinde alkalin fosfataz için mRNA saptanamaz. Yoğun inflamasyon ve enfeksiyonda veya lökosit sayısı tedavi ile normale döndüğünde nötrofil alkalin fosfataz aktivitesi normale döner. KML nötrofilleri lökopenik hastalara verildiğinde alkalin fosfataz aktivitesini yeniden kazanır (22). Eozinofil oranı genellikle artmamıştır fakat mutlak eozinofil sayısı hemen hepsinde artmıştır. Nadiren eozinofiller belirgin olarak artar ki bu olgular Ph' kromozomu pozitif eozinofilik KML olarak değerlendirilir. Mutlak bazofil sayısı hemen her hastada artmıştır ve bu bulgu ayırıcı tanıda önemlidir. Tanı sırasında mutlak lenfosit sayısı artmıştır (ort  $15 \times 10^6$  ml.'den). B lenfositler artmamıştır. T lenfositler aynı zamanda dalakta da artmıştır (22).

### 2.3.2. Kemik İliği

İlik belirgin olarak hipersellülerdir. Hematopoetik doku ilik hacminin %75-90'nı oluşturur. Yağlı doku belirgin olarak azalmıştır. Granulopoezis belirgindir. Normalde 2/1 - 4/1 olan miyeloid eritroid oranı 10/1 - 30/1 arasındadır (şekil 2). Eritropoezis genel olarak azalmıştır ve megakaryositlerin sayısı normal veya artmıştır.



şekil 2: KML hastasına ait periferik yaymalar.

### 2.4. Prognoz

Eskiden KML' nin prognozu iyi değildi. Beklenen yaşam sũresi 3 yıldı ve tanı konulduktan sonra 5 yıllık sağkalım oranı %20' den azdı. Erken tanı, gelişmiş KML tedavisi ve daha iyi destek tedavileri sonucu KML' li hastaların prognozu daha iyi hale gelmiştir. Rutin tarama testleri ile çoğu hasta asemptomatik dõnemde iken KML tanısı alabilmektedir.

KML tedavisinde hydroxyurea veya busulfan gibi eskiden kullanılan ilaçlara göre daha etkili olan interferon (IFN-a), dũřuk doz cytosine (ara-C),

yoğun kemoterapi ve otolog kemik iliği transplantasyonu (KiT) gibi tedaviler sonucu hastalığın prognozu daha iyi olmaktadır. Ortalama yaşam süresi 60-65 aya kadar ulaşmıştır. 3 yıllık sağkalım oranı %75-85' tir. İnterferon (IFN-a) tedavisi sonucunda hastaların %20-25'i major devamlı sitogenetik remisyona girmektedir (23).

Hastaların heterojen olması KML'de prognostik faktörlerin analizinin yapılmasını gerekli kılmıştır. KML için kötü prognostik faktörler Tablo 4' de verilmiştir. Prognostik modellerin gelişmesi ile hastalar iyi, orta ve kötü risk gruplarına ayrılmıştır. Ortalama yaşam süresi kötü risk grubunda 2 yıl, orta risk grubunda 3-4 yıl, iyi risk grubunda ise 5-6 yıl olarak bulunmuştur (23, 24). KML için prognostik evreleme sistemi tablo 5' de verilmiştir.

Tablo 4: KML için kötü prognostik faktörler

<b>Klinik</b>
- İleri yaş
- Tanı sırasında hastalığın semptomatik olması
- Anlamlı kilo kaybı
- Hepatomegali
- Splenomegali
- Düşük performans
- Siyah ırk
<b>Laboratuvar</b>
-Anemi
-Trombositoz, trombositopeni, megakaryositopeni
-Kan veya ilikte blast veya blast + promyelosit artışı
-Kan veya ilikte basofil artışı
-Derece 3-4 kollajen veya retikülin fibrozis
<b>Tedaviye göre</b>
-Busulfan tedavisi ile hematolojik remisyona uzun sürede girmesi
- Remisyon süresinin kısa olması
- Hastalığı kontrol altına alabilmek için total busulfan veya hydroxyurea dozunun ilk yıl içinde verilmesi
- İnterferon veya yoğun kemoterapi ile Ph (+) pozitif metafazların baskılanmasından sonra, bu cevabın kaybolması
- İnterferon tedavisine başlanıldığında iyi cevap vermeme

Tablo 5: KML için prognostik evreleme sistemi

Evre	Kötü prognostik karakteristik sayısı	Prognostik belirleyici
1	0 veya 1	Kötü prognoz karakteristikleri
2	2	1. Yaş > 60 olması 2. Dalak büyüklüğünün > 10 cm olması 3. Kanda veya ilikte blast oranının ;> %3 olması
3	≥3	4. Bazofillerin kanda > %7, ilikte > %3 olması 5. Trombosit sayısının < 700x10 <sup>6</sup> ml. olması
4	Hızlı faz karakteristiklerinden birisi	Hızlı faz karakteristikleri 1. Sitogenetik klonal gelişim 2. Kanda blast oranının > %15 olması 3. Kanda blast + promiyelosit oranının > %30 olması 4. Kanda basofil oranının > %20 olması 5. Trombosit sayısının < 100x10 <sup>6</sup> ml. olması

Tablo 6: Hızlı ve blastik faz KML'nin özellikleri

<b>A. Blastik faz KML</b>
- İlik veya çevresel kanda blast oranının %30' dan fazla olması
- Lokalize immatür blastlarla oluşan extramedüller hastalık
<b>B. Hızlı faz KML</b>
- Çevresel kanda blastların %15'ten fazla olması
- Çevresel kanda blast ve promiyelosit toplamının %15' ten fazla olması
- Çevresel kanda bazofil oranının %20' den fazla olması
- Trombosit sayısının 100x10 <sup>6</sup> ml.'den düşük olması
Sitogenetik klonal gelişim

## 2.5. Löseminin Nedenleri

Radyasyon ve kimyasal maddeler hücrede öncül nükleotidlerin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bunlar kromozomlarda kırılmalara, ring kromozom, disentrik kromozom ve sayısal anomalilere sebep olarak lösemi insidansını arttırmaktadırlar (3,25). Ayrıca DNA'da fosfodiester bağında kırılma yaptığından sentez (S) evresinde hatalı replikasyon ve dolayısı ile kromatid tipinde kırık oluşturmaktadır. Örneğin atom bombasına maruz kalanlarda 3 yıl sonra lösemi görülmeye başlanmış ve 5-7 yıl sonra maksimum düzeye çıkmıştır. Ayrıca Spondilit artrit için radyasyon gören vakalarda da lösemi insidansı yüksektir (3,25).

Kimyasal ajanlar aslında mutajen sayılırlar. Genetik materyal ile etkileşim sonucunda kansere yol açan mutasyonları oluştururlar. Doğrudan mutajen etki göstermeyen bazı kimyasal karsinojenler metabolize olduktan sonra mutajen ajanlara dönüşürler (26,27). Özellikle onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supressör genlerin inaktivasyonuna neden olan mutasyonlar kansere yol açan mutasyonlardır.

### 2.5.1. Genetik Faktörler

Son yıllarda yapılan çalışmalar, malign hastalıkların etiolojisinde genetik materyalin önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Özellikle familial lösemi olgularının tahmin edilenden daha sık olması genetik faktörün rol oynadığı lehinde bir kanıt olmuştur. Moleküler düzeyde yapılan destekleyici çalışmalar ile proto-onkogen ile onkogen arasındaki ilişkiler ve maligniteye neden olan onkogenler artık belirlenmeye çalışılmaktadır. Malignitelerin en önemli işaretlerinden birisi de kontrolsüz hücre artışı olduğuna ve de hücre çoğalmasındaki kontrolünde genetik materyaldeki artışla olduğu



düşünüldüğünde bu tip hastalıkların genetik materyaldeki bozuklukla paralel oluşabilecekleri söylenebilir. Örneğin doğumsal kromozom anomalileri bulunan olgularda malignite oranı, sağlıklı bireylere göre daha yüksektir (3,4).

Down Sendromlu olgularda lösemi insidansı, sağlıklı bireylere göre 20 kat daha fazladır. İdentik ikizlerle yapılan çalışmalarda, ilk 5 yıl içinde ikizlerden birisinde lösemi görüldüğünde diğerinde de lösemi oluşma olasılığı yüksek olduğu gözlenmiştir. Fanconi anemisi, Bloom sendromu gibi otozomal resessif geçişli hastalıklarda da lösemi insidansı yüksektir. (25)

### **2.5.1.A. Onkogenler**

Onkogenler kanser oluşum ve gelişim süresince dominant etki gösteren gen grubudur. İlk defa RNA virüslerinde gösterilmişlerdir. Sonra normal hücre genlerinden kaynaklandıkları gösterilmiş proto-onkogen olarak adlandırılmışlardır. Proto-onkogenler normal hücre ve gelişmesinde rol oynarlar ancak mutasyon sonucunda onkogene dönüşürler. Örneğin abl proto-onkogeni aktiveleştirici mutasyon olarak translokasyon sonucu KML'ye neden olur (24,25,27). Proto-onkogenleri onkogenlere dönüştürecek mutasyonlar çeşitli şekillerde oluşabilirler (Tablo-7). Proto-onkogenler 5 mekanizma ile aktif hale geçebilirler.

- Gen regülasyonunun bozulması sonucunda o gen ürünü fazla miktarda sentezlenebilir, yani proto-onkogen bölgesinde genel DNA replikasyonundan bağımsız biçimde tekrar tekrar replike olması ile o proto-onkogenin genomdaki sayısı dolayısı ile ürün miktarı artmaktadır.
- Retroviral DNA entegrasyonu ile retroviruslar üreme esnasında revers transkriptaz enzimleri ile RNA üzerinden DNA'yı kopyalayıp hücre DNA'sına katarlar. Proto-onkogen bölgesine bu şekilde katılmalar proto-onkogen aktivasyonuna neden olurlar (28,29,30).

- Kromozomal translokasyonlar genlerin yeniden düzenlenmelerine yol açarak proto-onkogenleri aktive edebilir ya da normalde bulunmayan yeni bir ürün kodlayan füzyon genleri oluşturabilir.
- Nokta mutasyonları proto-onkogen baz dizisini değiştirerek bir onkoproteine dönüştürebilir (26,31).
- Anti-onkogenlerin proto-onkogenler üzerinde kontrol edildikleri düşünülmektedir. Anti-onkogen olarak isimlendirilen gen bölgelerinin delesyonları ile proto-onkogenleri aktivasyon kazanabilecekleri son araştırmalarla gösterilmiştir.

### **2.5.1.B. Tümör Supressör Genler**

Bu genler hücre çoğalmasının negatif kontrolünü yaparlar. Normal koşullar altında hücrelerin gereğinden fazla çoğalmalarını engeller. Kanser hücrelerine bu genler verildiğinde kanserli hücre sınırsız bölünme kapasitelerini kaybederek normal hücre haline gelirler (31). Eğer herhangi bir kromozom anomalisi sonucunda tümör supressör gen (TSG)'ler inaktifleşir ya da ortamdaki kaybolursa kanser ortaya çıkar. TSG'lerin kanserleşmede resessif etkisi vardır. Herhangi bir hücrede onkogende ya da TSG'de oluşan mutasyon, o hücreye diğer komşu hücrelerden daha fazla çoğalma yeteneği kazandırdığında kanser oluşur.

Herhangi bir kromozom anomalisine sahip olan olgularda lösemiye dönüş, normal karyotipe sahip bireylerden daha kısa zamanda ortaya çıkmaktadır. Örneğin Turner sendromu gibi seks kromozomu yönünden mozaikizm gösteren bireylerde Ph kromozomu hücre soyunda vardır. 47, XXY kromozom kuruluşuna sahip olan Klinefelter sendromlu olgularda meme kanseri riski sağlıklı erkek bireylere göre 66 kat daha fazladır. Bu durumun ekstra X kromozomuna bağlı hormonal bir düzensizlikten oluştuğu söylenebilir.

Tablo 7: (Çeşitli kanser türlerinde rol oynayan bazı proto-onkogenler ve aktiveleştirici mutasyonları (Ruddon,1995)

Proto-onkogen	Kanser türü	Mutasyon türü
Abl	Kronik myeloid lösemi	Translokasyon
ErbB-1	Skvamoz hücreli karsinom	Amplifikasyon
ErbB-2 (ncu)	Meme,over,mide	Amplifikasyon
Gip	Over karsinomu	Nokta mutasyonları
Myc	Burkitt lenfoması, akciğer, meme karsinomu	Translokasyon, Amplifikasyon
L-myc	Akciğer karsinomu	Amplifikasyon
N-myc	Nöroblastoma, küçük hücreli akciğer karsinomu	Amplifikasyon
H-ras	Kolon, akciğer, pankreas karsinomu, melanom	Nokta mutasyonları
K-ras	Akut myeloblastik ve lenfoblastik lösemi, melanom	Nokta mutasyonları
N-ras	Tiroid ve genitoüriner bölge karsinomu, melanom,	Nokta mutasyonları
ret	Tiroid karsinomu	Yeniden düzenlenme
ros	Astrositom	?
K-sam	Mide karsinomu	Amplifikasyon
sis	Astrositom	?
SIC	Kolon karsinomu	?
Trk	Tiroid karsinomu	Yeniden düzenlenme

## 2.7. Kansere Hücreleri ve Hücre Döngüsü

Kansere hücrelerinin belirgin özelliklerinden birisi normal hücre bölünmelerini düzenleyen kontrol mekanizmalarına anormal yanıt vermeleridir. Bunlarda döngüsel nükleotid düzeyleri, plazma zarı akışkanlığı, salgıladığı proteinler ve iyon geçirgenlikleri farklıdır. Hücre jenerasyon zamanları normal veya normalden daha uzun olup, bu hücrelerin intravasküler kompartmanında kalış süreleri normalden daha uzundur. Blast halindeki hücrelerin pek çoğu bölünmeyen bir hazırlık ya da uzun bir G1 fazında bulunurlar (32). Ayrıca kansere hücrelerinin bir populasyon olarak bölünmeleri sınırsızdır. Normal bir fibroblast ise kültürde 20-50 defa bölünebilmektedir. Normal hücreler kültür ortamında bölünebilmek için fetal-calf serumuna ihtiyaç duymalarına rağmen, kansere hücreleri serum içermeyen kültür ortamında bölünebilir. Normal hücreler kültür ortamında in vitro koşullarda sınırlı sayıda bölünme geçirirlerken, kansere hücreleri ölümsüzdür (33).

Normal hücreler kültür ortamında yüzeyi doldurduklarında kontakt inhibisyon kurarak bölünmeye son verirlerken, kansere hücreleri üst üste katlar halinde bölünmeye devam edebilirler. Çünkü normalde yaklaşık 1 olan metafaz/profaz oranı kanserli hücrelerde çok artmıştır. Bu yüzden kanserli hücrede çok sayıda multipolar bölünmeler, endomitozlar, anafazda geri kalan kromozomlar gözlemlenir (34).

Kansere kromozomlarının yapı ve işlevlerinde, moleküler yapılarında bir takım değişimler olmaktadır. Telomer yapı ve işlevinde, genomik imprinting de oluşan değişiklikler bunlar arasındadır.

Telomerler, kromozom uçlarında bulunan, tandem tekrarlanan DNA dizileri ve bu dizilerle ilişkili olan çeşitli proteinlerden oluşan özel yapılardır. Telomer ile sonlanmayan bir kromozomun ucu birleşme ve rekombinasyona açıktır. Linear DNA replikasyonunu sağlayan DNA polimerazlar zincir uç kısmında bulunan telomerik bölgeleri sentezleyemediklerinden telomer boyları hücre siklusunun her S (sentez ) fazında bir miktar kısalır (35).

Germ hücrelerinde bu kısalma telomeraz tarafından kromozom ucuna telomerik dizi eklenmesi ile giderilir. Germ hücrelerinde bulunmasına rağmen somatik hücrelerde telomeraz aktivitesi yoktur. Transforme olmayan insan hücreleri hem in vitro hem de in vivo koşullarda hücre bölünmesi ile telomer kısalması gösterirler. Bu nedenle telomerler yavaşça kısalırlar. Oysa hemen hemen tüm kanser türlerinde telomeraz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Kanserli hücreler normalden fazla bölündüklerinden telomer bölgeleri de kısadır ama aktif durumda olan telomeraz, telomerleri sabit uzunlukta tutarak kanser hücrelerini ölümsüz kılar (33,34,35)

Kanserle ilişkili olarak genomik imprinting'de de değişiklikler olmaktadır. Örneğin KML hastalarının karakteristik bulgusu olan t (9,22)'de (Şekil 3.) 9 numaralı kromozomun paternal kaynaklı, 22. kromozomun ise maternal kaynaklı olduğu gösterilmiştir. (33,34,35)

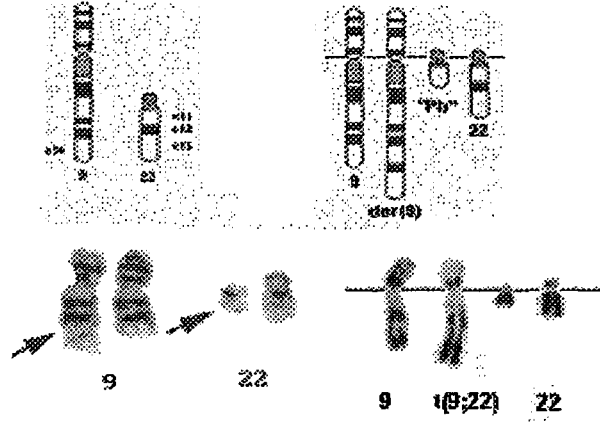
Kromozom anomalisi saptanan değişimlerin lösemi prognozu üzerindeki etkileri şu kriterlere göre yapılır.

### **2.7.1 Primer Karyotipik Değişimler**

Lösemilerde sadece primer karyotipik değişim bulunur. Bu da maligniteye dönüşüm için yeterli sayılır. Bu değişim akut lösemilerin ve alt grupların tanısında anahtar rol oynar.

### **2.7.2. Sekonder Karyotipik Değişimler**

Sekonder değişimler, primer değişikliklere ek olarak ortaya çıkarlar. Nadiren de tek başına oluşabilirler. Kural olarak her lösemi tipi sadece primer değişim gösterdiği sürece en az malign haldedir. Eğer sekonder değişim görülmeye başlarsa hastalığın kötüleşeceğini gösterir. Örneğin t(8;21) tipinde bir hastalık -X, +8 veya başka anomalilerin ortaya çıkmasıyla kötü prognoz göstermeye başlar. Kemoterapiye direnç gösterebilir, remisyona güçlük girebilir (35).



Şekil 3: t(9;22) (q34;q11) (55). [www.mcl.tulane.edu...](http://www.mcl.tulane.edu...) LeukemiasCML

## 2.10. Kronik Myelositer Lösemide Sitogenetik Gözlemler

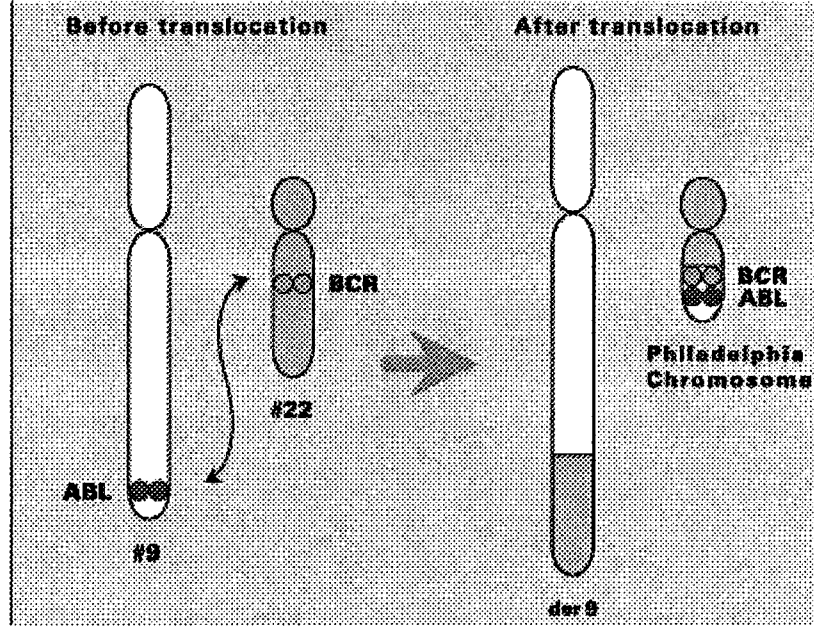
KML genelde iki faza ayrılır. Yaklaşık 3 yıl süren kronik fazda kan ve kemik iliğinde myeloid hücreler çoğalır (45). Bu hastaların büyük bir kısmında klasik KML bulgularına rastlanmaz ve çoğunluğu da tesadüfen yapılan kan testleri ile belirlenebilir (46). Bu dönemde KML'nin sitogenetik işareti olan Ph' kromozomu hastalığın tesbiti ve gözlenmesi bakımından önemlidir. Moleküler yöntemler uygulanırsa bcr-abl translokasyonunun olduğu gözlenebilir. KML'de terminal faz, blastik krizdir. Bu fazda genellikle miyeloblastlar veya lenfoblastlar dominanttır (43). Miyeloid hücreler son farklılaşma yeteneğini kaybederler ve kanda olgunlaşmamış myeloid öncüler artar. Blastik krizde ilave kromozomal anomaliler de gözlenir. En çok gözlenen anomaliler +8, +19, + Ph', i (17q), 14q+, +21'dir. Daha az olarak da -7 ve -Y gözlenebilir (27,43). Hastalığın kronik fazdan blastik krize geçmesinde rol oynayabilen ilave diğer mutasyonlarda gözlenebilir.

KML'de vakaların % 90'ında Ph' kromozomu gözlenebilmektedir. Bu grubun % 5'i, gerçekte variant KML'dir. Bunlarda 9. ve 22. kromozomdan başka, bir veya birden fazla kromozom translokasyonda görev almıştır (47,48). KML hastalarının ~%10 da sitogenetik olarak Ph' translokasyonu gözlenemez. Bu hastalara moleküler yöntemler uygulanırsa bcr-abl hibrit geninin ~%50 oranında tesbit edilebilir. Bu grup KML hastaları Ph' negatif M-BCR pozitif olarak adlandırılırlar (8,29,43). KML hastalarının çok azında ~% 2 bcr-abl translokasyonu sitogenetik ve moleküler yöntemlerle tesbit edilememektedir. Bu grup hastalar klinik olarak daha ağır seyretmekte ve Ph' negatif M-bcr negatif olarak adlandırılmaktadır (12,15,).

KML hastalarında bütün hemopoyetik soylar gözlenebilir. Bu bize, KML'nin klonal bir hastalık olduğunu ve tek bir plüripotent hemopoyetik kök hücreden kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir.

### **2.10.1. Philadelphia Kromozomu (Ph')**

Ph' kromozomu 1960 yılında Nowell ve Hungeford tarafından KML hastalarının kemik iliği metafaz plaklarında gözlenen bir küçük kromozomdur (4). Bu kromozom 9. kromozom ile 22. kromozom arasında resiprokal translokasyon sonucu oluşmaktadır. Daha sonra geliştirilen bantlama yöntemleriyle kromozomlar üzerindeki kırılma bölgeleri aydınlatılmıştır (26). 22. kromozomdaki kırılma noktası bant q11, kromozom 9'daki kırılma noktası ise, bant q34'de bulunmaktadır. Kırılan bölgeler resiprokal olarak transloke olurlar. Bunun sonucunda 22. kromozomda Ph' kromozomu veya 22q- şeklinde gösterilen küçük bir kromozom oluşurken, 9. kromozomda ise 9q+ kromozomu gözlenebilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4: 9. ve 22. Kromozomların translokasyon öncesi ve sonrası şekilleri.  
(56) [www.hmds.org.ukpqr.html](http://www.hmds.org.ukpqr.html)

## 2.11. Ph' Kromozomunun Moleküler Analizi

Ph' kromozomu bütün lösemik hemopoyetik hücrelerde gözlenebilir. Non-lösemik hemopoyetik hücreler (kemik iliği fibroblastları dahil) normal karyotipe sahiptirler. 9. ve 22. kromozomdaki genlerin kırılma bölgeleri şekil 5' de görülmektedir.

c-ABL geni, v-ABL geninin hücreSEL homologudur. İlk kez Abelson Murine Leukaemia virüs (A-MuLV)'den izole edilmiştir (49). v-ABL geni in vivo ve in vitro ortamda farklı hücreleri transforme edebilmektedir. ABL geninin protein ürünleri, plazma membranında, sitoplazmada ve hücre çekirdeğinde yerleşmiştir. Aktive olmuş ABL gen ürünlerinin çok yüksek tirozin kinaz aktiviteleri bulunmaktadır (49).



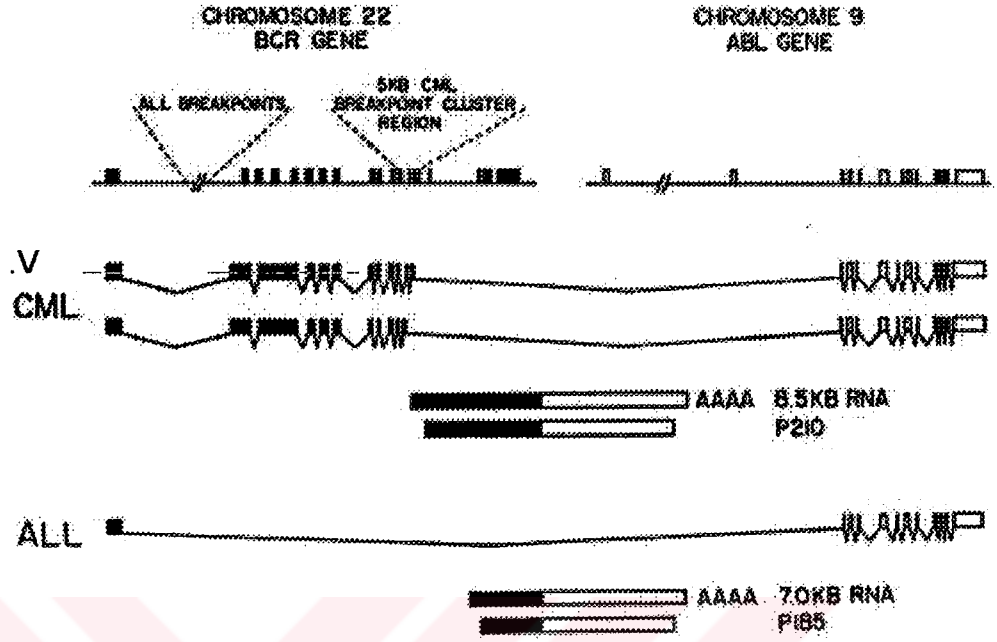
### 2.11.1. c-ABL Geni

Hücresel abl geni, evrimsel bakımdan korunmuş genlerden birisidir. Somatik hücre hibritleri ve in-situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda insan c-abl geninin 9 nolu kromozomun q34 bant bölgesinde lokalize olduğu bulunmuştur. Genin 5' bölgesinin sentromere; 3' bölgesinin ise, telomere doğru olduğu saptanmıştır. c-abl geninin yapısı, gen haritalanması, moleküler klonlama gibi yöntemler kullanarak karakterize edilmiştir. İnsan genomunun DNA'sından kaynak alınarak klonlanan c-abl geninin 230 kb uzunluğunda olduğu gösterilmiştir. Genin kodlama sekansının 32 kb uzunluğunda olduğu ve 11 ekson içerdiği belirlenmiştir (50).

c-ABL geninin ekson Ib ve ekson Ia ile gösterilen ilk eksonunun iki alternatifi bulunmaktadır (36). c-abl geninin I.eksonu hemen ekson II'nin distalinde yerleşmiştir. Ekson Ia ve Ib'nin yerleri pulse-field gel elektroforez yöntemi kullanılarak haritalanmış olup; ekson II'nin, Ia'dan 19 kb, ekson Ib ise 200kb uzakta olduğu tespit edilmiştir (36).

Ph' translokasyonunda 9.kromozomdaki c-abl geninin kırılma noktası genelde ekson Ib ile ekson II arasındadır(Şekil 5). Bu bölge -200 kb uzunluğundadır. İkinci büyük kırılma noktası ise, ekson Ia ile ekson II arasındaki 19 kb bölgedir. Her iki bölgede de kırılmalar intron alanlarından olmaktadır. Bu bölgelerin dışında diğer bölgelerde de kırılmaların olabileceği gösterilmiştir (36). c-abl geninin alternatif ilk eksonlarının farklı olmasından dolayı 2 tip farklı uzunlukta mRNA şifrelerler.

Bu farklılık sadece ilk eksonlar olan ekson Ia ve Ib'den kaynaklanır. Bunlardan birisi, 6 kb (Ia), diğeri ise 7 kb (Ib) uzunluğundadır. Bu mRNA'lar bütün dokularda ifade edilirler. mRNA'ların proteine çeviri edilmesi ile ~145 kd'luk c-abl proteini oluşur. Bu protein amino terminal ucunda farklılık gösterir (şekil 4). Ia abl proteini, Ib abl proteininden 19 amino asit daha kısadır (51).



Şekil 5: Philadelphia kromozomunda bcr/abl füzyon geninin oluşumu.  
[www.mcl.tulane.edu...](http://www.mcl.tulane.edu...) LeukemiasCML (54)

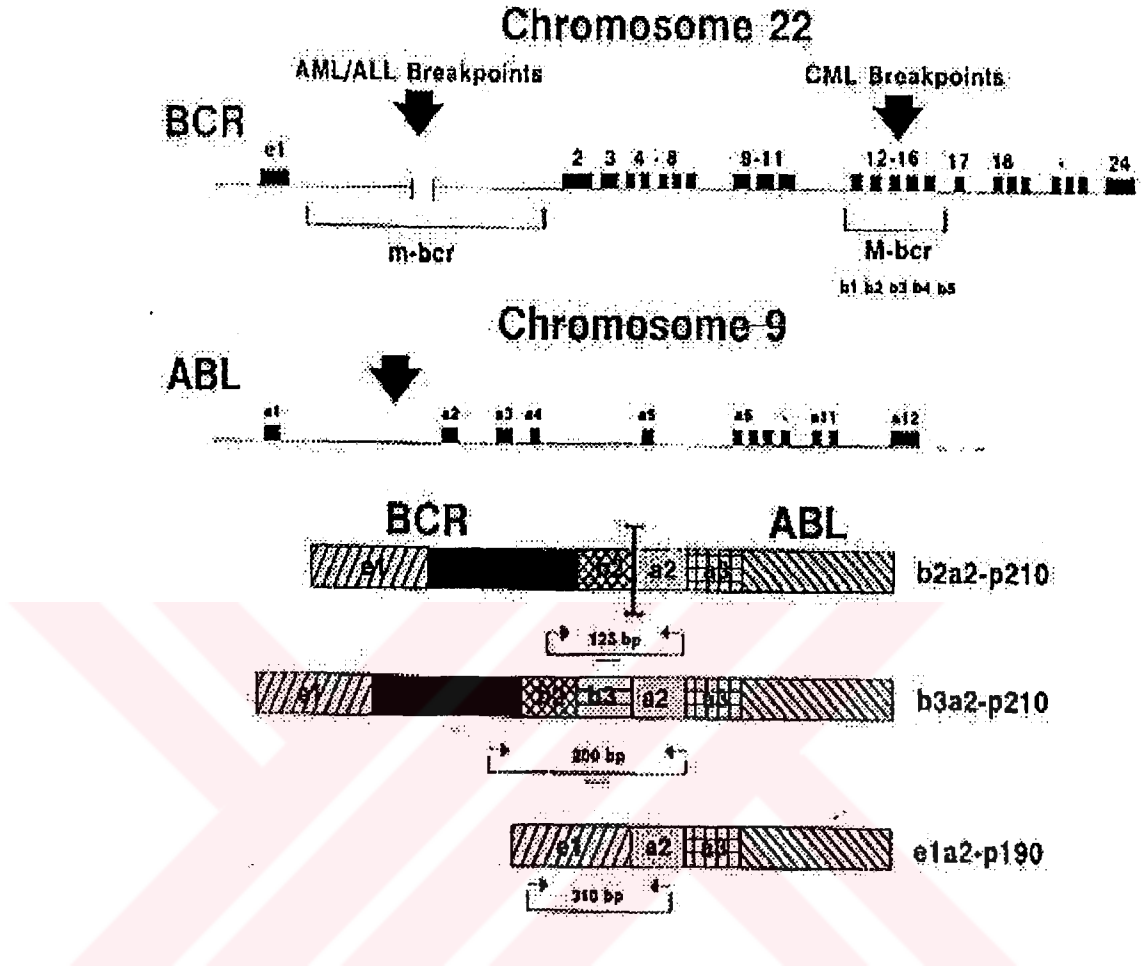
### 2.11.2. Breakpoint Cluster Region (BCR) Geni

bcr geni bütün insan hücre tiplerinde mevcut olup, en çok beyinde en düşük düzeyde ise, akciğerde ifade edilmektedir. Bu gen kromozom 22'de olup 5' sentromere doğru yerleşmiştir. Yaklaşık 20 eksonu ve 130 kb'lık bir uzunluğa sahiptir (13). c-abl genine benzer olarak intronik kırılma bölgeleri bulunmaktadır. ilk intronu yaklaşık 70 kb uzunluğundadır. bcr geninin promotor bölgesi ilk eksonunun 5' ucuna yakın bir bölgede yerleşmiştir (25,36). bcr geninin promotor bölgesi G-C bakımından zengindir ve birçok SPI (bir transkripsiyonal regülatör faktör) bağlanım bölgesi bulunmaktadır. bcr geni KML hastalarında Ph' kromozomu oluşumu anında M-bcr bölgesinden kırılır, daha sonra bu bölge c-abl geninin 5' bölgesi ile birleşir (24).

c-abl genine benzer olarak bcr geninde de kırılmalar intron bölgelerinde ve özellikle, ekson b2 ile b3 veya b3 ile b4 arasında almaktadır. Bunun sonucunda oluşan yeni ürün, b3a2 veya b2a2 şeklinde gösterilir; yani bcr-abl hibrit geninde bcr geninin M-bcr bölgesinin 3. eksonu ile c-abl geninin 2.eksonu birleşmekte (b3a2), diğerinde ise bcr'ın 2.eksonu ile c-abl'nin 2.eksonu birleşmektedir (b2a2) (şekil6). Bu iki tip bcr-abl birleşiminin, klinik yönden bir farklılığa neden olmadığı bildirilmiştir (34,36).

bcr geninin karboksi terminal bölgesi, GAP (GTPaz Activating Protein) aktivitesine sahip olduğu ve bu bölgenin, bcr-abl hibrit geninde bulunmadığı bildirilmiştir (14). Daha önce belirtildiği gibi, KML'de c-ABL geni, 22q kromozomuna transloke olmaktadır. KML hastalarının büyük bir kısmında 22. kromozomdaki kırılma noktaları belirli bir alanda toplanmaktadır. Bu alan yaklaşık 5.8 kb uzunluğunda olup (Major Breakpoint Cluster Region) M-bcr olarak bilinir. bcr geninin bir parçası olan bu bölgedeki eksonlara, özel sayılar verilmiştir. (b1, b2, b3 ve b4) (22,33). Kırılan bcr geninin 3' bölgesini c-abl geninin 5' bölgesi izler. Bir başka deyişle genler, baş ve kuyruk şeklinde yer almaktadırlar (31).

bcr-abl hibrit geni, bcr geni promotorunun kontrolündedir. Transkript edilen mRNA'nın 5' ucunda bcr geninin eksonları ile, 3' ucundaki c-abl'in II. eksonu doğrudan birleşmişlerdir. Bu birleşmede bcr geninin 3. eksonunun bulunup bulunmamasına göre iki hibrit mRNA elde edilir. Her iki mRNA birbirinden 75 bp veya 25 aminoasit bakımından farklıdır (20). Yeni hibrit bcr-abl geni baz çifti (8.5 kb) yönünden normal c-ABL genine (7.0 kb) göre daha büyüktür ve normal bcr geninden de farklıdır (35,36).



Şekil 6: b2a2 ve b3a2 kırılma bölgeleri. [www.pathology.washington.edu](http://www.pathology.washington.edu) (53)

### 2.11.3. c-ABL Proteininin Biyolojisi ve Fonksiyonu

Bir proto-onkogen olan c-ABL geni P145 kd proteinini şifreler ve bu protein tüm hücrelerin sitoplazma ve nukleuslarında bulunur. P145, diğer sitoplazmik protein kinazlar ile benzerlikler gösterir. Bu proteinin SRC tirozin kinaz proto-onkogeninden adını alan SH2 ve SH3 (SRC homoloji bölge 2 ve 3) diye adlandırılan bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgeleri takiben tirozin kinaz (Tyr) bölgesi ve son olarak da büyük bir COOH bölgesi vardır. c-abl'in SH3 ve SH2

trozin kinazın kontrol yerleri olarak da bilinir ve özellikle SH3 bölgesi, birçok intrasellüler sinyal iletim proteinlerinde gözlenmiştir (37).

c-abl karboksi terminalinde, 99 amino asitlik bir DNA bağlanma bölgesi taşımaktadır. Bu bölge; c-abl'in kromatin materyali ile etkileşime girmesini sağlamaktadır (24). Mitoz bölünmede c-abl, DNA'ya bağlanma özelliğini kaybeder. Bu özelliğini kaybedebilmek için de karboksi terminal ucundan fosforlanmış olması gerekmektedir. c-abl'nin DNA'ya bağlanma bölgesinde homozigot mutasyon taşıyan farelerin çoklu anomali doğduğu ve öldükleri bildirilmiştir. Bu da bize c-abl'in COOH bölgesi fonksiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (34). c-abl geninin aktivasyonu için birçok yol bulunmaktadır.

- 1) c-ABL'in SH3 ve SH2 bölgelerindeki delesyonlar ve nokta mutasyonlar geni aktive edebilir. Özellikle SH3'deki mutasyonlar genin yüksek aktivasyonu ve transforme edebilme özelliğini artırabilir.
- 2) BCR geninin c-abl'nin N terminalinde bulunması aktivasyona neden olabilir.
- 3) c-ABL'in 500-1000 kat yüksek amplifikasyonu.
- 4) Özellikle 2647. bazda G-A ve 1348 bazda T-G mutasyonları da geni aktive edebilmektedir (21,56).

c-abl geninin inhibisyonunun moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İnhibitör bir ajanın c-abl ile etkileşerek, aktivasyonunun azalmasına neden olduğu sanılmaktadır. Eğer supresor gene bağlanmaz ise, gen yüksek aktivite göstermekte ve transformasyona neden olabilmektedir (29).

#### **2.11.4. Normal bcr Gen Ürünleri**

İnsan bcr geninin iki tip major mRNA'sı vardır. Bunlar 4.5 ve 7 kb uzunluğunda olup, epitel hücrelerinde, fibroblastlarda ve bütün hemopoietik hücrelerde gözlenmektedir. İki mRNA arasındaki farklılık, proteine çevrilmeyen bölgeden doğmaktadır. İki mRNA'nın ürünü olan proteinlerin molekül ağırlıkları 160 ve 130 kd'dır (13). Bununla birlikte değişik molekül ağırlıklı (190,185,155,135,125,108 ve 83 kb) proteinlerin de varlığı rapor edilmiştir (13).

bcr proteininin farklı bölgelerinin değişik fonksiyonlar taşıdığı bulunmuştur. bcr geninin ilk eksonu SRC ile homoloji göstermekte ve serin/tironin kinaz aktivasyonu taşımaktadır. Bu bölge c-abl'in aktivasyonu için gereklidir ve bcr-abl hibrit geninde de c-abl'in SH2 kontrol bölgesine bağlanabilmektedir (36).

#### **2.11.5. Hibrit P210 bcr-abl Proteini**

Hibrit P210 proteini, hibrit bcr-abl transkriptinin çevirisi sonucunda oluşmaktadır (77,79). cDNA kolonileri ile yapılan sekans analizleri, 8.5 kb'lık hibrit bcr-abl geninin 5' kısmında en az 400 nükleotidlik proteine çevrilmeyen ve G-C bakımından zengin bir bölgenin olduğunu göstermiştir. Translokasyonun 471. nükleotidden başladığı ve bcr-abl'in ilk 927 amino asitinin bcr geninden kaynaklandığı bulunmuştur. Buna karşılık karboksi terminalindeki 1009 amino asit'lik bölüm ise c-abl geninden gelmektedir (23,36).

KML hastalarının büyük bir kısmında, bcr geninin M-bcr bölgesi eksonları olan ekson 2 ile 3 veya ekson 3 ile 4 arasında kırılmalar olmaktadır. bcr'in 3. eksonu 25 amino asit kodlar. Bu fazla 25 amino asidin, P210 bcr-abl proteinindeki fonksiyonu bilinmemektedir. P210 bcr-abl proteini bütün hemopoyetik hücrelerde bulunmakta, lösemik hücrelerdeki ekspresyon miktarı ve yarı ömrü bilinmemektedir (27). Öte yandan P210 bcr-abl'nin biyolojik aktivasyonu için mutlaka bcr geninin ilk eksonunun bulunması gerektiği KML ve ALL hastalarında bcr geninin ilk eksonunun bulunması ile gösterilmiştir (18,32). Bu bölgenin c-abl'in SH2 bölgesinin serin ve treonin birimlerine bağlanarak c-abl'nin aktivasyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (44,26)

P190 (ALL), P210 (KML) ile karşılaştırıldığında P190'ın daha yüksek tirozin kinaz aktivasyonun sahip olduğu gözlenmiştir (73,87). bcr-abl birleşiminin farklı tip lösemilerin gelişmesine yol açabildiği de vurgulanmaktadır (21,27).

### 2.11.6. abl-bcr Hibrit Geni ve Özellikleri

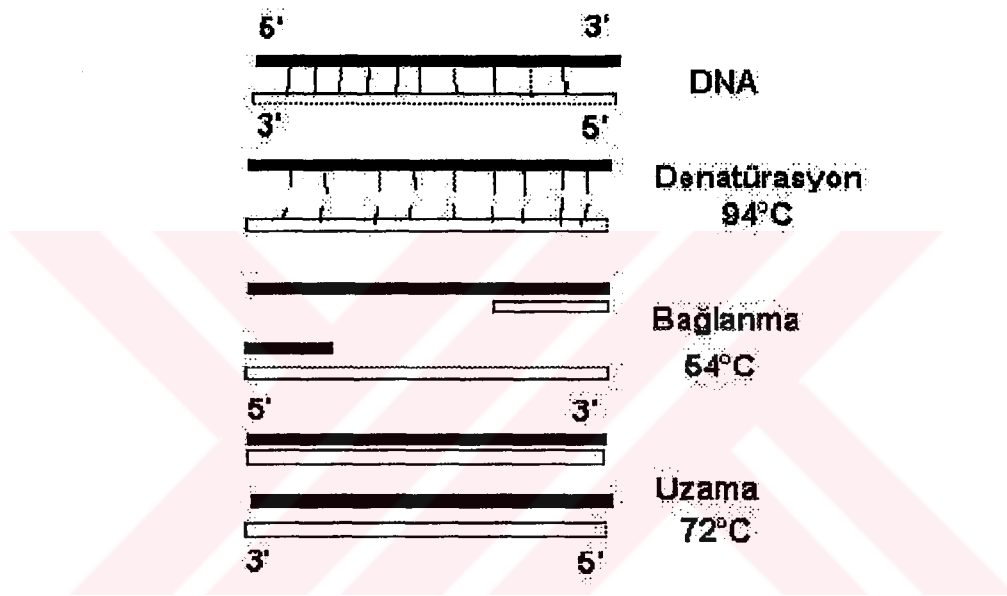
KML hastalarının % 95'inde bcr-abl hibrit geni 22. kromozomda gözlenirken, kromozom 9'da (9q+) abl-bcr hibrit geni gözlenir. abl-bcr hibrit geni bcr-abl hibrit genine göre oldukça az çalışılmıştır. Bu translokasyonda 22. kromozomda bulunan bcr geninin 3' kısmı 9. kromozomda bulunan c-abl geninin alternatif ilk eksonları olan ekson 1b veya ekson 1a ile birleşmektedir. bcr ve abl genlerindeki kırılma bölgelerine göre de lab3 ve lab4 veya lbb3 ve lbb4 tipi birleşmeler gözlenmektedir. Burada b3 ve b4, bcr geninin M-bcr bölgesindeki eksonlarının adlarıdır.(37). abl-bcr aktif bir gen olup protein ürünü ve hücredeki fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

bcr proteininin C terminalinin GTPaz aktivasyonuna sahip olduğu yakın zamanda gösterilmiştir. Bütün bunlara rağmen, normal bcr geninin fonksiyonu bilinmemektedir. Bu proteinlerin bütün hemopietik hücrelerde bulunması hücre içi sinyal yolunda görev yapabileceğini düşündürmektedir (14).

### 2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) Yöntemi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) DNA'nın spesifik bir bölgesinin, in vitro enzimatik şekilde çoğaltılması işlemidir. PZR değişik amaçlar için farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; genomik DNA veya cDNA' nın doğrudan klonlanması, gen mühendisliği, suç materyallerinin genetik yönden belirlenmesi, enfeksiyon ajanlarının tanımlanması, genetik hastalıkların prenatal tanısı, DNA transkriptinin yapısal analizi, genomik DNA ve cDNA' nın nükleotid sekanslarının analizidir (31). PZR için kalıp DNA, ve bu DNA'ya komplementer çok kısa iki primer gereklidir. Bunlara ilaveten, DNA polimeraz, yeteri kadar deoksiribonükleosidler (dNTPs) ve MgCl<sub>2</sub>'de ihtiyaç vardır. Primerler, çoğaltılacak DNA'nın her iki tarafında kalıp DNA ile eşleşebilecek özellikte olmalıdır.

PZR'ın ilk turu sonunda tümüyle birbirlerine benzer iki kalıp , ikinci turda ise dört kalıp oluşur. Çoğalma devam ederek 30 tura ulaştığında bir tek DNA kalıbından ~228 (270 milyar) kopya üretilebilir. Her bir tur üç basamakta gerçekleştirilir. Bunlar; 1) çift sarmalı DNA'nın denatürasyonu, 2) primerlerin DNA'ya bağlanmaları (annealing), 3) sentez safhasıdır (Şekil 7).



Şekil 7: PZR'da siklus aşamaları (58). Köksal F., nükleik asit çoğaltma yöntemleri.

### 2.12.1. RT-PZR Yöntemi

RNA'nın analizinde birçok yöntem kullanılabilir. Bunlardan bazıları Northern blot, RNA dot/slot blotlar ve in-situ hibridizasyondur. RT-PZR ise diğer bir mRNA analiz yöntemi olup, bu yöntem RNA-PZR şeklinde de adlandırılmaktadır (9). RT-PZR oldukça duyarlı ve yinelenebilir olmasından dolayı gen transkriptlerinin analizlerinde giderek yaygın olarak kullanılmaktadır.



Bu yöntemde ilk işlem RNA'nın dokulardan veya hücrelerden izole edilmesidir. Daha sonra bu RNA revers-transkriptaz enziminin kalıp olarak kullanılması ve komplementer DNA, yani cDNA sentezlenir. Bu kez cDNA, PZR için kalıp olarak kullanılır (35).

PZR yapılır ve amplifiye ürün agaroz jele uygulanır. Amplifiye olmuş cDNA, baz çifti (bp) uzunluğuna göre agaroz jel elektroforezinde ayrılır. Ethidium bromürle boyanır ve incelenir. Daha sonra istenilirse bu PZR ürünleri, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilebilir, hibridizasyonları yapılabilir ve nükleotid sekansları tespit edilebilir (35,36).

### 2.12.2. RNA İzolasyonu

RT-PZR'ın başarısı için yüksek kalitede RNA'nın kullanılması gerekmektedir. RNA'nın ribonükleazlar tarafından parçalanması ve genomik DNA ile kontaminasyonu mutlaka önlenmelidir. RNA'nın saf bir şekilde ve parçalanmadan izolasyonunda birçok yöntem olmasına karşın, guanidium tiosiyanat-fenol kloroform yöntemi birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (35,36).

Yöntemin prensibi, RNA'nın su molekülleri ve guanidium tiosiyanat ile kompleks oluşturulmasının kolaylaştırılması; DNA ve proteinlerin hidrofilik etkileşimlerinin bozularak, DNA ve proteinlerin sulu fazdan uzaklaştırılmasına dayanır. Bu yöntemle toplam RNA elde edilir. Çok iyi kalitede RNA elde edildiğinde bu RNA'nın agaroz jelde yürütülmesi ile 28S ve 18S rRNA'lar da gözlemlenebilmektedir. İzole edilen RNA'lar etanol içinde -20 °C'de veya su içinde -70 °C'de uzun süre (bir yıl) saklanabilir (40). Bu çalışmamızda RNA izolasyonunu, RNA İzolasyon Kit'i kullanılarak gerçekleştirildi.

### **2.12.3. cDNA Sentezi**

RT-PZR için cDNA kalıbı revers-transkriptaz kullanılarak RNA'dan sentezlenebilmektedir. İki virüs Avian Myoblastosis Virüs (AMV) ve Moloney Murine Lösemi Virüs (MMLV)'in Revers-Transkriptazları yaygın olarak kullanılmaktadır (32,34). cDNA sentezinden sonra mRNA'ların kalması PZR'ın etkinliğini azaltabilir. Çünkü bu mRNA, cDNA ile komplementerdir (2).

### **2.12.4. cDNA Primerleri**

mRNA'dan cDNA sentezinde primerler, üç farklı yöntemle kullanılmaktadır.

#### **2.12.4.1. Spesifik Primer Yöntemi**

Primerler mRNA'nın spesifik bölgeleri ile baz eşleşimi yaparak revers-transkriptazın bağlanması ve sentezin gerçekleşmesi sağlar. Bu yöntem kullanıldığında primer konsantrasyonunun ve annealing ısısının ayarlanması gerekmektedir.

#### **2.12.4.2. Oligo dT Yöntemi**

Bilindiği gibi mRNA'ların 3' kısmında bir poly A sinyali bulunmaktadır. Oligo dT, bu sekans ile komplementerdir. Bu yöntemle sadece mRNA'ların cDNA'ları sentezlenebilir.

### **2.12.4.3. Rastgele Primerleme Yöntemi**

Hekzamerler genelde heterojen sekanslara sahip olup RNA'nın değişik bölgelerinden komplementerlikler yapabilmektedir. Bu yöntem ile toplam RNA'ların tamamının cDNA'ları yapılabilir (32,35,36).

## **2.13. PZR AMPLİFİKASYONU**

### **2.13.1. PZR İçin Primer Sentezi**

cDNA'da primerlerin yerleşimi birkaç bakımdan çok önemlidir. Bunlar;

1. Primerler PZR ürününün uzunluğunu belirler. Genellikle 400-2000 bp arası PZR ürünü verebilen primerler kullanılmalıdır. 400 bp'den küçük ürünler veren primerler kullanılırsa; görev almamış primerlerin kendi amplifikasyonları agaroz jelde anlamsız bantlar verebilir. Diğer yandan, Taq DNA polimerazın uzun sentezlerde kalıptan ayrılma eğilimi vardır. Bu nedenle 2000 bp'den daha büyük PZR ürünü elde edilmesinde amplifikasyonun etkinliği azaltılmaktadır.

2. cDNA, oligo dT yöntemi ile yapılmış ise, 3' primerin yeri PZR ürününün uzunluğunu belirler. Reverse-transkriptazın uzun kalıpları sentez yapmada zorluğu nedeni ile bu yöntemde 2-3 kb'dan daha uzun PZR ürünü sentezlenmesinden problemlerin olabileceği bildirilmektedir.

3. Primerin yeri cDNA ve genomik DNA'dan elde edilen ilk PZR ürününün içinden de seçilebilir.

4. mRNA'nın ikincil yapısı Reverse-transkriptazın aktivitesini önleyebilmektedir. Bu bakımdan RT-PZR'in etkinliğini artırmada mRNA'nın stabil olduğu bölgelerden primerlerin yerleşim yerinin seçilmesinin önemli olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, RNA'nın ısıtılması da bu problemin çözülmesinde yardımcı olabilmektedir (2,39).

Optimum bağlanma sıcaklığı için tipik PZR primerlerinin 22-30 nükleotid uzunluğunda, A/T, içeriği yaklaşık G/C içeriğine eşit olmalıdır (17). Primer sekanslarının diğer genler ile de uyuşmaması gereklidir, aksi takdirde birden fazla PZR ürünü elde edilebilir (23,25). Bütün bunlar dikkate alınarak cDNA ile belirli yerlerden eşleşebilen primerlerin yapılması gereklidir.

## 2.14. PZR'IN REAKSİYON İÇERİĞİ

PZR tüpünde bulunanlar.

- Reaksiyon tamponu(Tamponun kompozisyonu değişmekte, ancak genelde; KCl, Tris-HCl, Triton x-100 ve MgCl<sub>2</sub> bulunmaktadır).
- dNTP'ler,
- primerler,
- cDNA kalıbı
- ısıya dayanıklı DNA polimeraz.

PZR'in üç temel parametresi, denatürasyon, annealing ve sentez zamanları ve sıcaklık dereceleri çalışmanın amacına göre değişebilmektedir. Denatürasyon zamanı 94 °C'de 1 dk'dan az ve sentez zamanını 72°C'de de 2 veya 3 dk'dan az olmalıdır (17,36). PZR'in en kritik basamaklarından birisi de annealing sıcaklığıdır. Yüksek annealing sıcaklığı uygulandığında agaroz jelde non-spesifik bantlar elde edilebilmektedir. Bazı araştırmacılar, PZR'a başlamadan önce PZR içerenlerinin ısıtılması, PZR ürününüm miktarını ve spesifitesini önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir (22).

Diğer bir kritik basamak ise, döngü sayısıdır. Eğer döngü sayısı az tutulursa çok az ürün, çok tutulursa non-spesifik bantlar elde edilebilmektedir (39).

## 2.15. Nükleik Asit Kontaminasyonu

RT-PZR uygulanırken çeşitli nedenlerden dolayı nükleik asit kontaminasyonların olabileceği bildirilmiştir (36,40). Bu kontaminasyonlar ya dışardan, (pipetlerden, elden, havadan, reaksiyondan) veya içerden (genomik DNA'dan) olabilmektedir.

RT-PZR'da nükleik asit ve ribonükleaz kontaminasyonu mutlaka kontrol edilmelidir. Bir kural olarak eldiven daima giyilmeli ve sıklıkla değiştirilmelidir. Yarı steril teknikler adapte edilmeli, RNA solüsyonunda ve Reverse-Transkriptaz reaksiyonunda kullanılan su diethylpyrocarbonate ile muamele edilmelidir. Diğer yandan, PZR'da kullanılan su iki defa filtre edilmelidir, ayrıca şebeke suyu ve otoklavda kullanılan suların nükleik asitler ile kontamine olabileceği daima düşünülmalıdır (15).

## 2.16. Genomik DNA Kontaminasyonu

RT-PZR'ın en büyük problemlerinden birisi RNA preparasyonu esnasında genomik DNA kontaminasyonudur. Bu problem özellikle hedef mRNA'nın çok az ifade edildiği ve yüksek PZR amplifikasyonunun gerekli olduğu zaman daha da önemlidir. Bu konuda ilave basamakların uygulanması, DNA kontaminasyonunu çözebilir. Bunu gerçekleştirebilmek için amplifiye edilen cDNA ve DNA arasındaki farklardan yararlanılabilir. Primer dizilimi belirlenirken iki primerin kontrol ettiği bölgede eğer bir intron bölgesi varsa, bu durumda genomik DNA ile kontamine olmuş örnekte introndan dolayı iki farklı PZR ürünü elde edilecektir. Bunlardan büyük bp PZR ürünüde genomik DNA kontaminasyonu (introndan dolayı PZR ürünü bp artmıştır), küçük olanda ise mRNA PZR ürünü gözlenebilir. Başka bir yol da mRNA'nın 3' ucunda proteine çevrilmeyen bölgeye uygun primerlerin düzenlenmesidir. Diğer bir yaklaşım da RT-PZR'da kullanılan RNA'ların RNaz ile sindirilip jelde yürütülmesidir (35).

Tüm titizliklere rağmen, yine de PZR'da sıklıkla non-spesifik bantlar elde edilebilir. Bu olay RT-PZR için de geçerlidir. Non-spesifik bantlar belki farklı RNA kesimleri (splice) veya non-spesifik primer annealingi nedeniyleledir.

Bununla birlikte, PZR tüpündeki bir çok kimyasalların non-spesifik primer annealingini hızlandırarak spesifitesinin azalmasına neden olduğu iddia edilmektedir. Bunlardan dimethylsulfoxide (DMSO), tetramethylammonium chloride (TMAC) annealingi azaltırken, formamid'in artırdığı bildirilmiştir. Özellikle DMSO'ın DNA sarmallarının annealingini azaltarak çift sarmallı yapıların oluşmasını engellediği bildirilmiştir (25).



### **3. GEREÇ-YÖNTEM**

#### **3.1. GEREÇ**

Bu çalışmada farklı safhalarda bulunan 25 KML hastasının kan veya kemik iliği örnekleri alınmıştır. 2004 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Kliniğine, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalına, Manisa Devlet Hastanesi ve Yeşil Yurt Devlet Hastanesi Hematoloji Servisine başvuran KML tanısı konan 25 hasta bu çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların 10'u kadın, 15'i ise erkektir.

#### **3.2.YÖNTEM:**

##### **3.2.1. Kimyasallar Ve Kitler**

##### **3.2.1.A.Moleküler Çalışma:**

- Ethidium bromide A1161 Applicem
- Ethanol MBG A3878 Applicem
- 2-mercaptoethanol A1108 Applicem
- Agorose A2114 Applicem
- TBE buffer MBG A1228 Applicem
- Nucleo spin RNA II 740955 M&N
- RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit K 1622 MBI Fermantas
- 10mM dNTP Mix-0,2ml. R0191 MBI Fermantas
- Taq DNA Polymerase (recombinant) 5µ/µl EP0402 MBI Fermantas
- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder-0,05mg. SM0241 MBI Fermantas
- 0,2µmol-(10-20 OD) HPLC Purifiye 122 baz Interactiva
- Distile su, Molecular Biology Grade Water (DNAase, RNAase and protease free)
- Ph-pozitif olduğu bilinen K-562 hücre hattı.
- Ph-negatif olduğu bilinen kontrol hücre hattı.

### 3.2.1.A.1.Oligonükleotid Primerleri:

- Primer  $\beta$ -actin1(HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'  
ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol
- Primer  $\beta$ -actin2(HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'-  
CATCTCCTGCTCGAAGTCCA-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol
- Primer KML3 (HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'-  
CGAGCGGCTTCACTCAGACC-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol
- Primer KML4 (HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'-  
CTGAGGCTCAAAGTCAGATG-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol
- Primer KML1 (HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'-  
GCTTCTCCCTGACATCCGTG-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol
- Primer KML2 (HPLC purifiye 0,2 $\mu$ mol, liyofilize 5'-  
GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3' GENOSYS 0,2 $\mu$ mol

### 3.2.1.A.2. Diğer Araç Ve Gereçler

- Soğutmalı mikrosantrifuj
- Santrifuj
- Plastik tüpler
- Steril Eppendorf tüpleri
- Steril PZR tüpleri
- Otomatik pipetler
- Steril plastik pipet uçları
- Disposable enjektörler
- Derin dondurucu (-20°C)
- Programlanabilir ısı bloğu
- Agarose jel elektroforez tankı



- Elektroforez için güç kaynağı
- Vortex
- +4°C soğutucu
- Steril eldiven
- UV. ışık kaynağı

### 3.2.1.A.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA II kit kullanıldı. RNA izolasyonu için kan ve kemik iliği örnekleri kullanıldı. Her iki örnek alındıktan hemen sonra K<sub>3</sub>EDTA'lı toplama tüplerine (2ml.) alındı. RNA izolasyonuna hemen başlanılmıyacaksa +4°C'de 1-2 saat bekletilebilir. (bekletme süresi 2 saat'ten fazla olursa RNA kalitesinde bozulmalar olabilir.)

### 3.2.1.A.4. RNA İzolasyon Protokolü

- 400µl. materyal (kan veya kemik iliği) ependorf tüpüne kondu.
- 350µl. RA1 tamponu ilave edilir ve 10-20 sn. vortekslendi.
- 3,5µl. β-mercaptoethanol ilave edilir ve 10-20 sn. vortekslendi.
- Viskositeyi azaltmak için ayırma ve toplama tüpleri kullanıldı.
- Materyal 11.000 rpm'da 1dk. santrifüj edildi.
- 350µl. %70'lik ethanol ilave edildi ve 10-20 sn. vortekslendi.
- Materyal ayırma tüpündeki filtreden bütün örnek geçinceye kadar işlem tekrarlandı.
- Bu işlemden sonra elde edilen örneklerden 600µl. alındı ve 30sn. 11.000rpm' da santrifüj edildi.
- 350µl. Membrane Desalting Buffer (MDB) ilave edilir ve 1dk. 11.000 rpm'da santrifüj edildi.

- Steril mikrosantrifüj tübüne 10µl. DNase I ve 90µl. DNase reaction buffer ilave edildi ve mixlendi. Bu karışımdan 95µl. DNase reaction mixture alındı ve materyalin tam ortasına gelecek şekilde ilave edilerek oda sıcaklığında 15dk. inkübasyona bırakıldı.
- 200 µl. RA2 tamponu ilave edildi ve 30sn. 11.000 rpm'da santrifüj edildi.
- 600 µl. RA3 tamponu ilave edildi ve 30sn. 11.000 rpm'da santrifüj edildi.
- 250 µl. RA2 tamponu ilave edildi ve 2dk. 11.000 rpm'da santrifüj edildi.
- 60 µl. H<sub>2</sub>O (Rnase-free) tamponu ilave edildi ve 1dk. 11.000 rpm'da santrifüj edildi.
- Tüpün dip kısmında kalan sıvı bizim elde ettiğimiz saf RNA'dır.

Elde ettiğimiz RNA'ların spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı. Böylece mRNA'yı cDNA'ya dönüştürmek için ne kadar kullanacağımız belirlendiğinden ilk 10 hasta için ölçümler belirlendi (Tablo 8), bunların ortalama değerleri alınarak diğer hastalarda da bulduğumuz ortalama değer göz önüne alınarak cDNA'ya çevrildi.

RNA= A260 x 40 x dilüsyon katsayısı (40 sabit sayı, dilüsyon katsayımız 25)

formülü kullanarak cDNA'ya çevirmek için ne kadar miktarda RNA kullanacağımız belirlendi.

Örneğin 1.hastanın RNA'sını cDNA'ya çevirmek için

$$A260=0.224 \times 40 \times 25 = 224\text{ng.}$$

Biz bu çalışmamızda tüm hasta RNA'ları için ortalama 3µg.≈15µl.RNA kullanıldı.

Tablo 8: İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik analiz değerleri

Hasta no.	A260	A280	Ratio	Kons.
1	0.224	0.204	1.098	8.960
2	0.185	0.185	1.00	7.400
3	0.185	0.188	1.00	7.520
4	0.195	0.192	1.015	7.800
5	0.202	0.197	1.023	8.08
6	0.199	0.198	1.005	7.960
7	0.218	0.206	1.088	8.720
8	0.204	0.203	1.004	8.160
9	0.214	0.210	1.019	8.560
10	0.207	0.109	1.040	8.280

### 3.2.1.A.5. Primerlerin Sulandırılması:

Çalışmamızda kullanılacak tüm primerler 100pmol. olacak şekilde sulandırıldı.

- KML1 64.8 nmol için; 648µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.
- KML2 49.0 nmol için; 490µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.
- KML3 65.5 nmol için; 655µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.
- KML4 64.1 nmol için; 641µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.
- B-actin1 45.1 nmol için; 451µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.
- B-actin2 112.5nmol için; 1125µl. Distile su ilave edildi ve kısa süre vortekslendi.

Elde edilen bu karışımlar tekrar 1/10 oranında sulandırıldı. 90µl. distile su, 10µl. primer bir tüpde vortekslendi.

### **3.2.1.A.6. RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi**

RT-PZR'ın kritik basamaklarından birisi olan cDNA yapılmasında olası bir kontaminasyonu önlemek için her zaman pudrasız eldiven giyildi ve sık sık değiştirildi.

- PZR tüpüne öncelikle 1µl. random hexamer ilave edildi.
- Üzerine 15µl. RNA ilave edildi ve örnekler Thermal Cyclers 'da 70°C 5dk. inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler inkübasyondan sonra 2dk. buz üstünde tutuldu.
- 5µl. 5x reaksiyon buffer ilave edildi.
- 1µl. Ribonükleaz inhibitör ilave edildi.
- 2µl. 10mM dNTP mix ilave edildi.
- Thermal Cyclers'da 25°C 5dk. inkübasyona bırakıldı.
- Thermal Cyclers'dan çıkan örneğe 1µl. Reverse-Transkriptaz ilave edildi.
- 42°C 60dk. ve 70°C 10 dk. inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.1.A.7. Nested PZR**

- Toplam hacim 25 µl. olacak şekilde hazırlandı.
- 15 µl. distile su
- 2,5 µl. 10x buffer
- 2,5 µl. MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl. primer1 (KML1)
- 1 µl. primer2 (KML3)
- 0,5 µl. dNTPmix
- 0,5 µl. Taq DNA Polymerase iave edildi.
- Bu karışıma 2µl. cDNA ilave edildi.

### 1. Step PZR'da

- 94°C'de 4 dk.
  - 95°C'de 40 sn.
  - 56°C'de 40 sn.
  - 72°C'de 40 sn.
  - 72°C'de 5 dk. thermal cycler inkübasyona bırakıldı.
- 20 siklus

1.Stepdeki örneklerle karışmaması için PZR tüplerine başka bir numara verilir. 20 döngü sonunda çıkan hasta örneklerini 2.step PZR için kalıp olarak kullanıldı, sadece B-Actinler kullanılmadı.

### 2.Step PZR

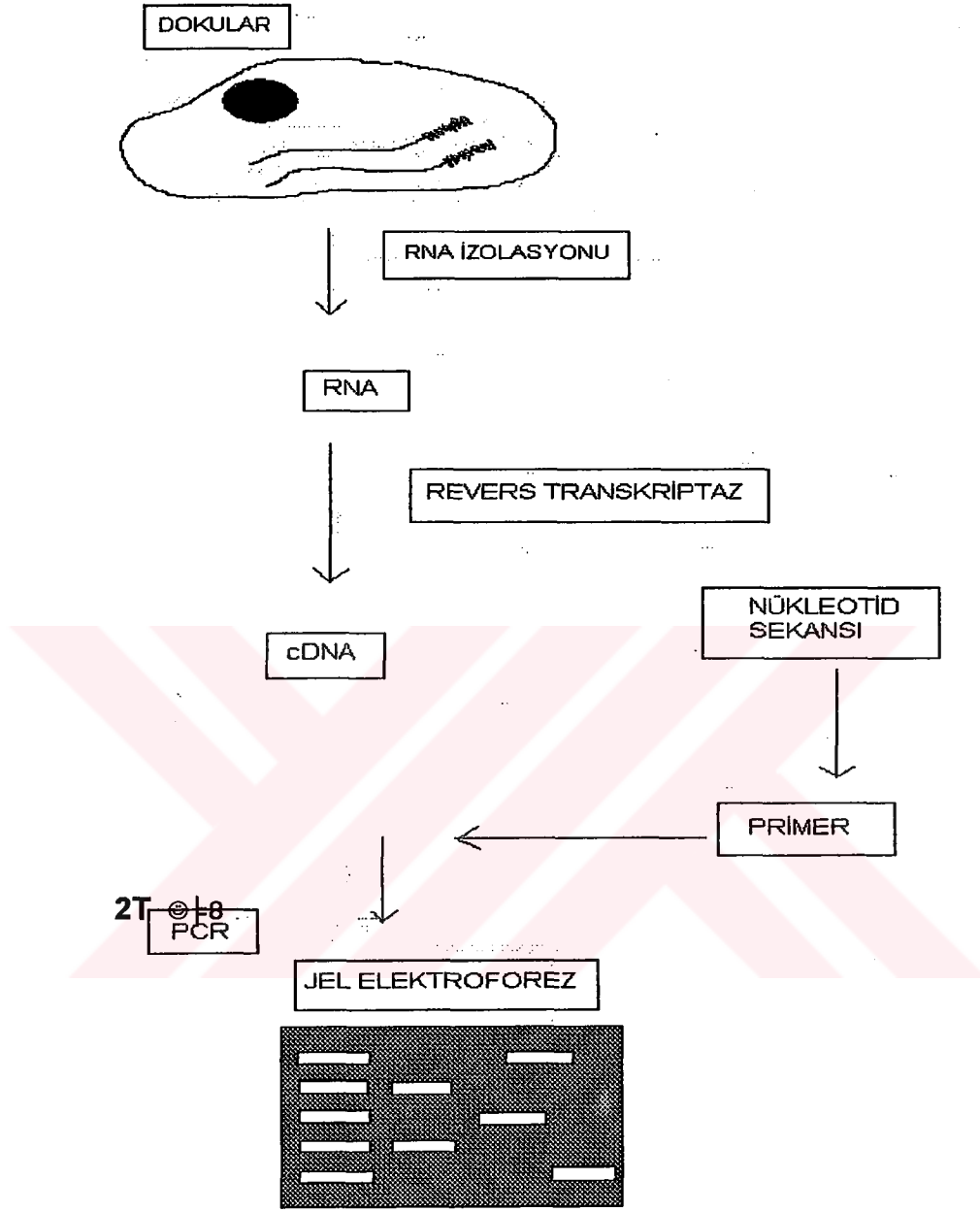
- 94°C'de 4 dk.
  - 95°C'de 40 sn.
  - 56°C'de 40 sn.
  - 72°C'de 40 sn.
  - 72°C'de 5 dk. thermal cycler inkübasyona bırakıldı.
- 30 siklus

30 döngü sonunda  $2^{30}$  gen amplifikasyon ürünü elde edilmiş oldu. Son ürün -20 °C'de saklandı.

### 3.2.1.A.8. Jel Dökümü Ve DNA'nın Yürütülmesi

- Jel dökümü için %2'lik agaroz hazırlandı.
- 0.6gr. agarozu 30ml. TBE tamponunda çözüldü.
- Bu karışım mikrodalga fırın içerisinde kısa sürelerle ısıtıldı.
- 10mg/ml. Ethidium bromürden 1.5µl. alındı ve hazırladığımız tamponun içine ilave edildi.

- Bu karışım yavaş bir şekilde suyun altında karıştırılarak soğutulması sağlandı.
- Soğuyan jel agoroz kabına döküldü ve taracları takıldı.
- Soğuması için oda sıcaklığında 15dk. beklendi.
- Jelin rengi matlaştığında jelin soğuduğu anlaşıldı böylece materyali elektroforez küveytine yerleştirildi.
- Bu işlem hem hasta hem de B-actin için yapıldı.
- B-actinden 4 $\mu$ l., elde ettiğimiz PZR ürününden 6 $\mu$ l. alındı.
- Bu örnekler 1,5 $\mu$ l 5x loading buffer'ın üzerine pipetle kondu ve karıştırıldı.
- Bu karışım jelin içinde oluşturduğumuz bölmelere sıra ile kondu.
- bcr-abl için pozitif olduğu bilinen marker ve negatif kontrol olarak da distile su bölmelere ilave edildi.
- Elektroforez 80 V. akımla 30dk. çalıştırıldı.



Şekil 8: RT-PZR'ın algoritması

### 3.2.1.B. Sitogenetik Çalışma

#### 3.2.1.B.1. Kimyasallar

- RPMI 1640 besi ortamı F1213 Biochrom
- Fetal Calf Serum S0113 Biochrom
- Fitohemaglutinin M5030 Biochrom
- Penicilin-Streptomisin A2212 Biochrom
- L-glutamin Biochrom
- Distile su
- KCl
- Etil alkol
- Metanol
- Asetik asit
- Giemsa
- Leishman
- Tripsin
- Entellan
- NaCl
- $C_6H_5Na_3O_7$  Sodium citrate
- $Na_2HPO_4$  Sodyum fosfat (PH↑)
- $KH_2PO_4$  Potasyum fosfat (PH ↓)
- Serum Fizyolojik
- Metanol ve asetik asit 3/1 (v/v) oranında taze hazırlanıp kullanıldı.

#### 3.2.1.B.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Laminar flow
- Etüv



- Santrifüj
- Ph metre
- Su banyosu
- Elektronik tartı
- Manyetik karıştırıcı
- Hücre kültür tüpü

### **3.2.1.B.3. Besi Ortamı Protokolü**

Steril şartlarda;

- RPMI 1640 besi ortamına;
- 25cc. Fetal Calf Serum
- 1cc. Penicilin
- 1cc. L-glutamin

ilave edildi.

Bu karışım kısa bir süre karıştırıldı ve 5ml. Hücre kültür tüplerine steril enjektörle dağıtıldı. -20° C'de saklandı.

### **3.2.1.B.4. Metafaz Kromozomların Eldesi**

Çalışmada kullanılan metafaz preparatları, olgulardan steril şartlarda alınan kemik iliğinde yapılan lenfosit kültürlerinden elde edildi.

### **3.2.1.B.5. Kültür Aşaması (Kemik İliği)**

Stok olarak hazırlanıp -20 °C'de bekletilen özel besiyerine; Heparin kemik iliği hücreleri için sitotoksik etki gösterdiğinden steril şartlarda sodyum içermeyen heparinli enjektöre alınan materyal (olgunun lökosit tablosuna göre) genellikle 3-4 damla çok seri bir şekilde ekim yapıldı.

Ekim işlemi direkt ve 24 saatlik inkübasyon süreli 2 tüpe uygulandı ve 37° C'de etüvde bekletildi. Direkt ekimde kolsemid ilave edildi. Diğer tüpde ise 23. saatte kolsemid ilave edildi. 750 µl kolsemid ilave edildi ve 1 saat 37° C'de bekletildi. Bekletilen kültürler 1100 rpm.da 10 dk. santrifüj edildi. Süpernant kısmı pastör pipetiyle atıldı ve vorteks ile karıştırılarak 5ml. hipotonik solüsyon ilave edilerek 1/2 saat 37° C'deki etüvde bekletildi. Süpernantant kısmı atılıp vorteks yardımıyla karıştırılarak 5 ml. Metanol-asetik asit solüsyonuyla fikse edildi. Fiksatifle yıkama işlemi 4 defa tekrarlandı.

Son santrifüj işleminden sonra tüplerde yaklaşık 1 cc. süpernantant bırakıldı. Dip materyal pipetle iyice karıştırılarak alkolde bekletilmiş, silinerek temizlenmiş ve soğutulmuş lamlara yaklaşık 30 cm yükseklikten 3-4 damla damlatılarak yayıldı. Preparatlar GTG bantlama için oda sıcaklığında 72 saat yaşlandırıldı.

#### **3.2.1.B.6. GTG Bantlama:**

#### **3.2.1.B.7. Kullanılan Solüsyonlar**

- KCl çözeltisi:  
KCl 4,6 gr.  
Distile su 1000ml.  
İyice karıştırılıp oda sıcaklığında bekletildi.
- Sodyum sitrat -Sodyum klorid (SSC) çözeltisi:  
0,4 gr. C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> –0,8 gr. NaCl 100ml. Distile su

#### **Tripsin solüsyonu :**

- 95ml. Serum Fizyolojik 95 ml.
- Tripsin 5cc.
- Tripsin solüsyonu hazırlanıp -20° C'de bekletilerek buz blok içinde kullanıldı.

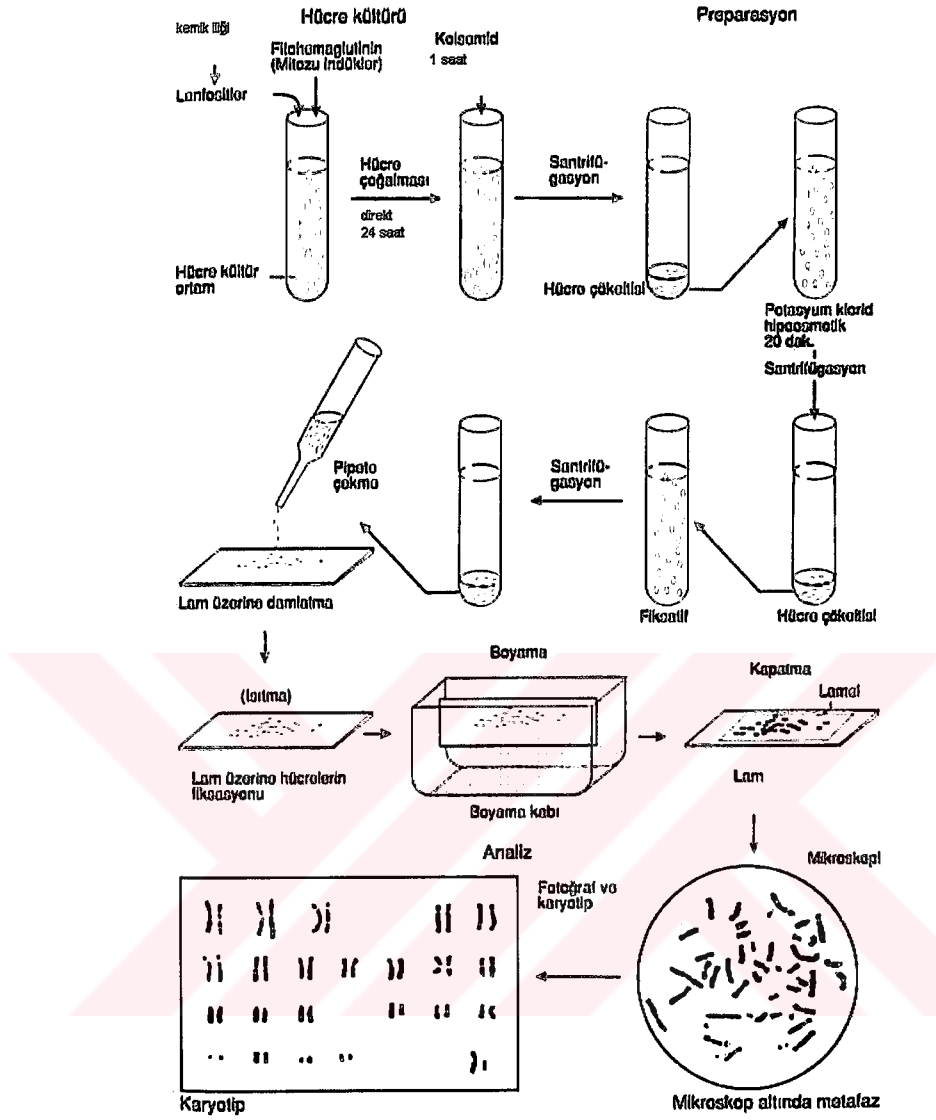
## **Boya solüsyonu :**

### **Giemsa**

- Leishman (0,1gr. toz Leishman,100 ml. Metanolde çözülür).
- 4/1 oranında Giemsa/Leishman hazırlanır.

### **3.2.1.B.8. Tripsin Giemsa Bantlama (GTG-Banding) Aşaması:**

- 3 gün oda sıcaklığında bekletilerek eskitilen preparatlar, sodyum sitrat sodyum klorid (SSC) çözeltisi içinde 10dk. 65° C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Kemik iliği preparatları için 5"-10"(sn.) arasında değişen bir süre tripsin çözeltisinde tutuldu. (En uygun süreyi ayarlayabilmek için her olguya ait bir preparat kullanıldı ve optimize edilerek diğerleri bantlandı. )
- Distile su (Ph=7) ile 2 defa yıkandı.
- Giemsa çözeltisinde 5 dk. boyandı.
- İki defa daha distile suda yıkanarak kurutuldu.
- Kuruyan preparatlar ışık mikroskobunda kontrol edilerek uygun özellikteki (kromozom morfolojisi bozulmamış ve bantları iyi ayırt edilebilen) metafazların analizi yapılarak diğer preparatlarda aynı işlemler tekrarlandı.
- Preparatlar entellan kullanarak lamellerle kapatılarak incelemeye alındı.

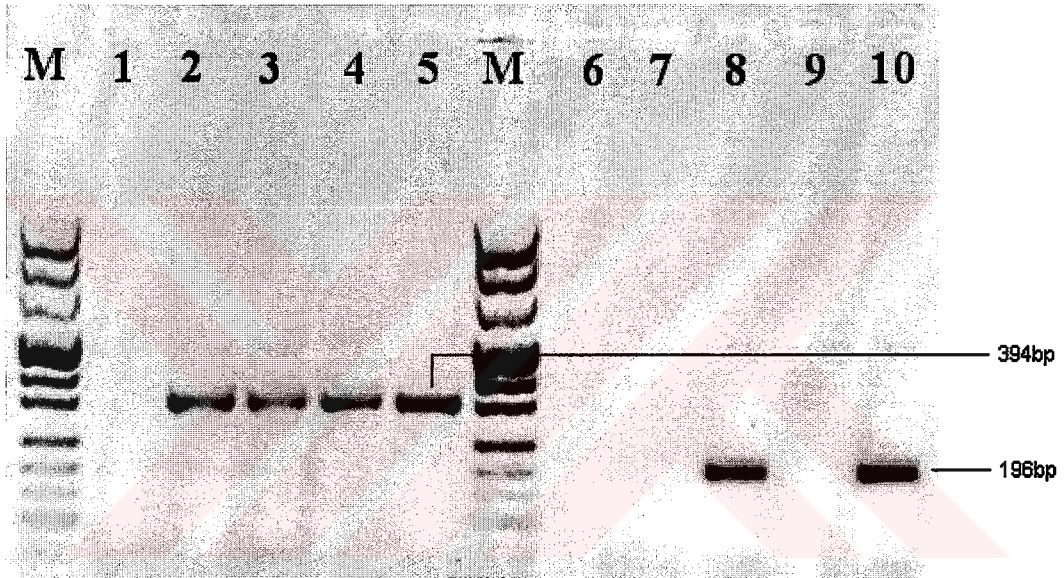


Şekil 9: Kemik iliğinden kromozom analizi şeması (52).  
Renkli Genetik Atlası –179.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların özellikleri Tablo 9'da verilmiştir. Olgularımızın 10'u kadın, 15'i erkekti. Her hastaya ait ortalama 20 metafaz hücresi incelendi.

Ph pozitif olduğu bilinen K562 hücre hattında bcr-abl pozitif, Ph negatif olduğu bilinen distile su da ise bcr-abl negatif olarak bulunmuştur. Olgularda M-bcr/abl pozitifliği oranı 20/25 (%80) olarak bulunmuştur. Ph kromozomunun pozitiflik oranı %80'dir.



Şekil 10: Jel görüntüsü

M-DNA ağırlık belirleyicisi

1-Distile su B-actin pzs

2-Negatif kontrol B-actin

3-Pozitif kontrol B-actin K 562 hücre hattı

4-Hasta 1 B-actin

5-Hasta 2 B- actin

6-Distile su kml primerleri ile

7-Negatif kontrol

8-Pozitif kontrol K 562 hücre hattı

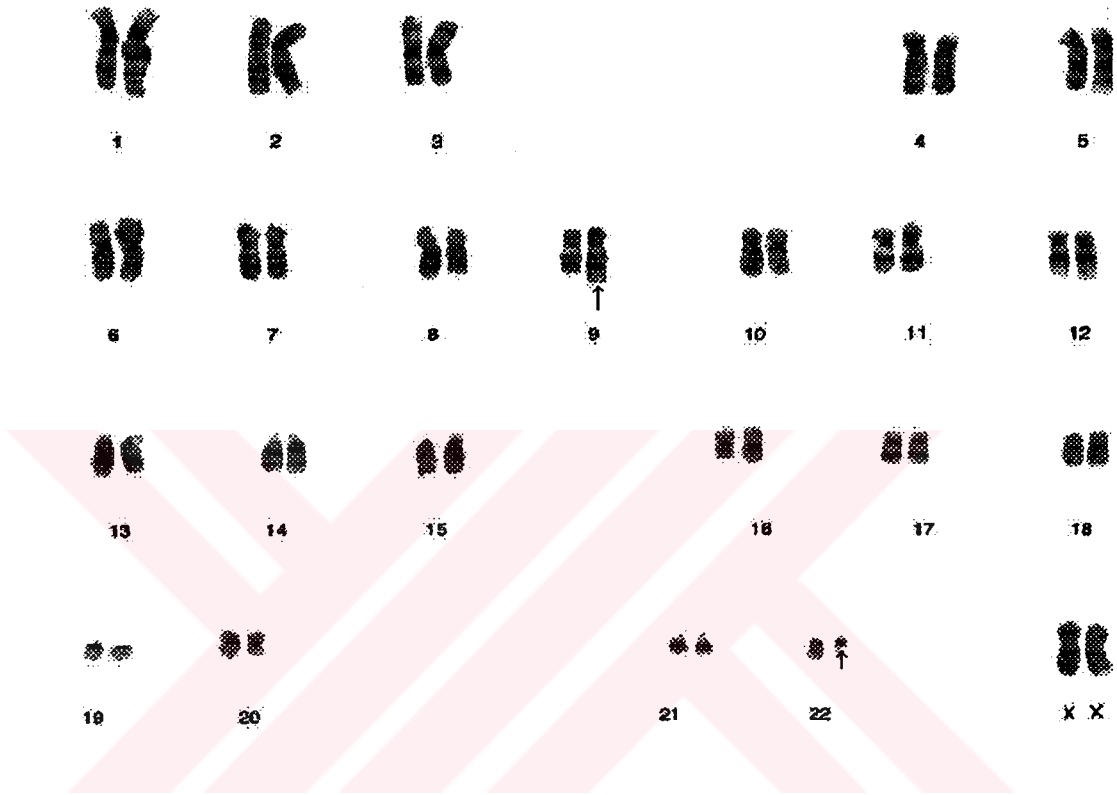
9-Negatif hasta

10-Pozitif hasta

Tablo 9: KML hastalarında Ph kromozomu ve M-BCR/ABL'nin korelasyonları

Hasta no	Yaş-cinsiyet	Tanı	Ph kromozomu	M-BCR/ABL
1	73- ♀	KML	0	+
2	39- ♂	KML	+	+
3	76- ♀	KML	+	+
4	55- ♂	KML	+	+
5	36- ♂	KML ?	-	-
6	45- ♂	KML	0	-
7	58- ♀	KML ?	-	+
8	85- ♀	KML	0	+
9	50- ♀	KML	+	+
10	48- ♀	KML	+	+
11	20- ♂	KML ?	-	-
12	60- ♂	KML	+	+
13	32- ♂	KML	-	-
14	65- ♀	KML	+	+
15	57- ♂	KML	+	+
16	58- ♂	KML	+	+
17	83- ♀	KML	0	+
18	63- ♂	KML	+	+
19	51- ♂	KML ?	-	+
20	49- ♂	KML	+	+
21	42- ♀	KML	0	+
22	38- ♂	KML ?	+	+
23	45- ♀	KML	+	+
24	49- ♂	KML ?	-	-
25	54- ♂	KML	+	+

(0)=üreme yok , (-)= negatif sonuç, (+)= pozitif sonuç



Şekil 11: KML olgulu bir vakada karyotip sonucu 46,XX t(9;22) (q34;q11).

## 5. TARTIŞMA-SONUÇ

Kronik myelositer lösemi pluripotent hematopoetik kök hücrelerinin klonal myeloproliferatif bir bozukluğudur. KML' li hastaların % 90' ında 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasında resiprokal translokasyon t(9;22) (q34;q11) bulunması ile karakterizedir. Bu translokasyon sonucunda 22q- (Ph-kromozomu) ve 9q+ kromozomu meydana gelir (4,42).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda Ph-kromozomunun, 9 numaralı kromozomdaki abl proto-onkogen geni ile 22 numaralı kromozomdaki bcr geninin yeniden düzenlenmesi ile oluşan bcr-abl füzyon geninin sonucu olduğu anlaşılmıştır (3,26).

Sitogenetik bir bulgu olarak bilinen Ph' kromozomunun hibrid bcr/abl onkogeninin oluşumundan sorumlu olduğunun gösterilmesi, KML'de erken dönemde sitogenetik bulgu olarak görülen bu değişikliğin malign transformasyonun hangi aşamasında ortaya çıktığı ve bu sürecin ne kadarından sorumlu olduğuna ilişkin soruların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Bu soruların yanıtlanması ile Ph kromozomunun hastalığın prognozundaki etkinliğinin daha iyi tanımlanabileceği düşünülmektedir. bcr/abl geni taşıyan transgenik farelerde yapılan bir çalışmada, transfeksiyondan sonra gelişen lösemilerin erken döneminde çok fazla sitogenetik değişikliğin olmadığı ve ilerleyen dönemlerde klonal sitogenetik değişikliklerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (35).

X-linked marker'lar ile yapılan çalışmalar Ph' kromozomunun varlığından önce "stem celler"de klonal bir artış olduğunu göstermiştir (17). Bununla birlikte, kemik iliği transplantasyonu geçiren Ph pozitif KML'li hastalarda yapılan çalışmalarda transplantasyon sonrası Ph kromozomunun varlığının relaps için yüksek risk oluşturduğu bildirilmektedir (35). Ph pozitif hastaların standart kemoterapi ile iyi kontrol edilebilmelerine rağmen, bu tedavi ile Ph' kromozomunu tamamen ortadan kaldırmak genellikle mümkün olmamaktadır



(10). Bu hastalar ortalama 3 yıl içerisinde akselere faza girmekte ve blastik krizde sekonder sitogenetik değişiklikler ortaya çıkmaktadır (10,35).

KML'nin asemptomatik nötrofil artışı ile karakterize başlangıç fazında, kronik fazda ve akut blastik krizde Ph' kromozomu'nun varlığı gösterilebilmektedir. Bu ise füzyon geninin hematopoetik sistemde farklılaşmayı etkilemeden çoğalmayı indüklediğini düşündürmektedir. Ph kromozomu varlığı kadar, Ph kromozomu içeren hücrelerin oranı da prognoz açısından değerlendirilmektedir. Ph' kromozomu varlığı moleküler yöntemlerle son derece güvenilir bir şekilde gösterilebilir.

bcr-abl geninin saptanması KML' nin tanısını koymada, Ph-kromozomu negatif KML'nin yeniden sınıflandırılmasında, KİT, IFN veya kemoterapi sonrası minimal reziduel hastalığın saptanmasında, değişik tedavi stratejilerinin planlanmasında yol gösterici olmaktadır (4, 6,)

Sitokimyasal boyalarla hücrelerin işaretlenmesi gibi yöntemlerle dahi, morfolojik incelemede %1'in altındaki neoplastik infiltrasyon genellikle saptanamamaktadır. Klinik öneminden dolayı lösemi ve lenfomalı hastaların gerçekten remisyonda olup olmadıklarının tanısının yapılması gerekmektedir.

bcr-abl füzyonu DNA, RNA ve protein düzeyinde saptanabilmektedir. Çeşitli yöntemler ve sayısız modifikasyonlar geliştirilmiştir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH), konvensiyonel Southern blotting, pulse-field elektroforez, PZR ve immunopresipitasyon bunlardan bazılarıdır. Her yöntemin, araştırmacının kişisel becerisi ve kullanılan hücre örneklerine bağlı olarak avantaj ve dezavantajları vardır. Kullanılan yöntemin duyarlılığının yanı sıra hızlı ve tekrarlanabilir olması da önemlidir.

Minimal reziduel hastalığın saptanmasında PZR tekniğinin duyarlılığı 1:106 olmasına karşın morfoloji ve Southern blotting tekniğinin duyarlılığı %1-5, immunofenotiplemenin duyarlılığı ise 1:104 olarak saptanmıştır (5). Hem hastalığın tanısının konulmasında hem de minimal reziduel hastalığın saptanmasında kullanılabilen PZR yöntemi ile Ph-kromozomu pozitif K562

hücre hattında 1 µg RNA'nın 1:105 dilusyonunda dahi ayırım yapılabilmektedir. Bunun sonucunda tek bir hücreden dahi RNA amplifiye edilerek p210 bcr-abl mRNA saptanabilmektedir (24, 27).

Bu çalışmada RT-PZR yöntemi ve konvensiyonel sitogenetik çalışmaları kullanılarak klinik ve laboratuvar bulguları ile KML tanısı konulan hastalarda bcr-abl füzyon geninin pozitif bulunma oranı her iki yöntem açısından karşılaştırılmıştır.

PZR teknolojisinin gelişmesi ile çok az miktardaki nükleik asit örneklerinin analizinin yapılması büyük oranda kolaylaşmıştır. Çok az miktardaki genomik DNA kullanılarak amplifikasyon sağlanabilir (24). Ph-kromozomu pozitif olan KML hastalarında yapılan RT-PZR çalışmalarında %98'e varan oranda bcr-abl pozitifliği saptanmıştır (26). Bu bulgularla, oluşan moleküler değişikliğin Ph-pozitif KML'de duyarlı bir test olduğunu söyleyebiliriz (27).

Bu çalışmamızda klinik ve laboratuvar bulguları ile KML tanısı konan hastalarda PZR ile bcr-abl füzyon geninin pozitifliği %80 olarak bulunmuştur. Bu sonuç literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında düşük kalmaktadır. Aynı zamanda sitogenetik bulgularımız Ph kromozomu bakımından %80 bulunmuştur. Bununla birlikte 5 hasta da hücre kültürü yapılamamıştır. 25 KML hastasından alınan kemik iliği örneklerinden elde edilen hücre kültür sonuçları; 5 olguda hücre kültürü elde edilememiştir.

15 olguda Ph kromozomu (+) pozitifdir.

5 olguda Ph kromozomu (-) negatiftir.

25 KML hastasından alınan kemik iliği örneklerinden elde edilen M-bcr/abl sonuçları;

20 olguda M-bcr/abl (+) pozitifdir.

5 olguda M-bcr/abl (-) negatiftir.

bcr-abl transkriptinin 20 olguda Ph (+) ve 5 olguda (-) RT-PZR yöntemi ile tesbit edilmesi hastaların sitogenetik analizleriyle uyum göstermektedir. Hücre

kültürü yapılamayan 5 olgunun 4 tanesinde bcr-abl(+) pozitif bulunmuştur. 1 tanesinde bcr-abl negatif bulunmuştur. Sitogenetik açıdan Ph(-) negatif olan 2 olgu moleküler çalışmada bcr-abl (+) pozitif bulunmuştur. Olgularımızın büyük bir kısmı kronik fazda bulunan hastalardan oluşmaktadır. bcr-abl hibrit geninin iki farklı birleşim tipinin (b2a2-b3a2) hastaların kliniği ve yaşam sürelerinde herhangi bir değişmeye neden olmadığı bildirilmektedir (35).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatür sonuçlarından düşük olmasının nedenlerinden birisi olgu sayısının düşüklüğü olabilir. Bunun böyle olduğunu anlamak için olgu sayısı çoğaltarak çalışmaya devam edilmesi gerekir, diğer bir etken de PZR ürünlerinin analizinin ethidium bromit ile boyanmış, TBE-agaroz jelde yapılması olabilir.

PZR, kontaminasyona bağlı olarak yalancı pozitif sonuç verebilir. PZR-pozitif sonuçlar, bağımsız hücre örneklerinin tercihen alternatif metodlarla analizi yapılarak kontrol edilmelidir. Çalışmamızda Ph-pozitif olduğunu bildiğimiz K562 hücre hattında bcr-abl pozitif olmasına karşın Ph-negatif olduğunu bilinen distile su bcr-abl negatif bulduğumuzdan kontaminasyon olduğunu düşünmemekteyiz.

PZR yöntemindeki bir diğer zorluk da yazarlar tarafından çeşitli yöntemlerin kullanılıyor olmasıdır. Siklus sayısındaki değişiklikler, negatif kontroldeki değişiklikler ve bunların eklenme evresindeki değişiklikler, nested primerin kullanılıp kullanılmaması da sonuçları etkilemektedir. Ayrıca bir hastanın PZR sonuçlarının klinik bulguları ile uygunluk gösterip göstermediğine karar vermede zorluk oluşturmaktadır. Örneğin Martiat'ın yapmış olduğu bir çalışmada tam hematolojik ve sitogenetik remisyonda olduğu kabul edilen 10 tane KML hastasının tamamında ilk PZR' da negatif sonuç alınmasına rağmen nested primerle yapılan ikinci PZR' da alınan 17 örnekte 9' unda BCR-ABL pozitif bulunmuştur (32).

Çalışmamızda alınan sonuçların hastaların erken dönem klinik bulguları ile korelasyonunu saptanamamasının nedeni çalışma süresinin kısa olmasından

kaynaklanmıştır. Çalışma sayımızın artırılarak alınan sonuçlarla hastaların klinik seyri arasındaki ilişkinin araştırılması yararlı olacaktır. bcr-abl hibrit geninin hangi mekanizmaları kullanarak hücreleri transforme ettikleri ve diğer proto-onkogenlerle ilişkilerinin aydınlatılması için daha ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Ayrıca PZR yönteminin diğer yöntemlerden daha hızlı ve daha duyarlı olmasından dolayı malign hastalıkların tanısını ve tedaviye cevabın izlenebilmesinde daha etkili olduğunu belirtmekte olup, bu çalışma ile bu sonuca ulaşmayı hedeflemekteyiz.

Sonuç olarak ; Anabilim Dalımızın Moleküler Biyoloji Laboratuvarında RT-PZR yöntemi, tez bitiminde rutin hizmete sokularak hastalıkların tanısı ve tedaviye yanıtın izlenmesinde büyük destek ve olanak sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Say, B., The role of genetics in hematology. *Journal of Medical Sciences.* 24 ,171-175. 1995
2. Başaran, N., *Tıbbi Genetik.* 357-362. Bilim Teknik Yayınevi. 6. Basım. Eskişehir,1996
3. Arrighi. F., Rao., P.,N., *Genes, Chromosomes, and Neoplasia.* Raven Press. New York. 1980
4. Cohen F.,L.: *Clinical Genetics in Nursing Practice,* J.B. Lippincott Company. Philadelphia. 285-302,1984
5. Rowley.,J.,D.: *The Philadelphia Chromosome Translocation.* *Cancer.* Vol.65.2178-2183.1989.
6. Hochhaus, A., Emig, M., Weisser, A., Saussele, S., Muller, M., Rosee, P I., Kuhn, C., Paschka, P., Hehlmann, R., *Monitoring of Residual Disease with Chronic Myelogenous Lukemia Using spesific Fluorescent Hybridization Probes for Real-Time Quantitative RT-PZR.* *Rapid cycle real-time PZR methods and applications;* p:171. 2001
7. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN: *Wintrobe's Clinical Hematology,* 9th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania, 1725-2054, 1993.
8. Nathan DG, Oski FA: *Hematology of Infancy and Childhood.* 4th ed, WB Saunders, Philadelphia, 1101-1450,1993.
9. McGee, J.O.D., Isaacson, P.O., Bright, N. A.: *Oxford textbook of pathology.* Oxford University Press, p 1717-1731 (1992).
10. McKusick, V.A.: *Mendelian inheritance in, man.* The Johns Hopkins University i Press Baltimore and London, p 568-570(1990).

11. Inazawa, J.: Clinical features, chromosomes, and molecular characteristics in Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 53 (8), 1549-1558 (1990).
12. Martial, P., Michaux, J.L., Rodhain, J.: Philadelphia-negative (Ph-) chronic myelo-id leukemia (CML): Comparison with Ph+ CML and Chronic Myelomonocytic leukemia. *Blood* 78 (1): 205-211 (1991).
13. Thompson M V., McInnes RR., Willard HF.: *Genetics in Medicine*. 5<sup>th</sup> ed, WB Saunders, Philadelphia. 1998.
14. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN: *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania, 1725-2054, 1993.
15. Holywood D: Signal transduction. *B Med Bull*, 47:99-115, 1991.
16. Stielgenbauer S, Dohner H, Bulgay Morschel M, et al: High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. *Blood*, 81:2118-2124, 1993.
17. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN: *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9th ed, Lea & Febiger, Pennsylvania, 1725-2054, 1993.
18. Bamett MJ, Eaves CJ: Chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 6. Edition (Ed: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF>, Philadelphia, w B Saunders Company, 535-553, 1996.
19. Chomczynski P., Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
20. Athens JW: Chronic myeloid leukemia. *Wimrobe's Clinical Hematology* 9 Edition (Ed: Lee GR, Bithel, TC. Foerster J, Athens JW, Lukens JNX Philadelphia, Lea and Febiger, 1969-1998, 1993.

21. Kamada N, Uchino H: Chronologic sequence in appearance of clinical and laboratory findings characteristic of chronic myelocytic leukemia. Blood 51 (5): 842-850, 1978.
22. Lichtman MA: Chronic myelogenous leukemia and related disorders. Williams Hematology. 5. Edition (Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, KippsTJ) New York, Me Graw-Hill Inc, 298-324, 1995.
23. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov R, Talpaz M: Chronic myelogenous leukemia: A concise update. Blood 82 (3): 691-703, 1993.
24. Lichtman MA: Chronic myelogenous leukemia and related disorders. Williams Hematology. 5. Edition (Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, KippsTJ) New York, Me Graw-Hill Inc, 298-324, 1995.
25. Müftüoğlu.E: Klinik Hematoloji. Şahin Basım, Diyarbakır, 363,376,391. 1995.
26. Varmius.H., Weinberg. R.A.: Genes and Biology of Cancer. New York, 1993
27. Weinberg R. A.: Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler. Lit. Der. 9:92-96.1989
28. Kastan. M. B:Molecular Biology of Cancer: The Cell Cycle. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5th. Edition. Philadelphia. 121-129.1997.
29. Park. M.: Oncogenes: Genetic Abnormalities of Cell Growth. Cancer and Genetics. Chapter 10.589-604. 1993.
30. Erdem.H.:Minimal residüel Hastalıkta Tanı Yöntemleri. Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp dergisi.1 (2):60-65.1996.
31. Ruddon. W. R.: Cancer Biology 3th. Edition. New York,1992.

32. Albayrak. A.: Hematopoetik Sistemin Neoplastik Hastalıkları. Atatürk Üniv. Yayınları. Erzurum.1983
33. Greaves. M.: Is telomeres Activity İn Cancer Due To Selection Of Stem Cell and Differentiation Arrest? Trends Genet.23(4): 127-128.1996.
34. Axelrod.N.: Of telomeres and tumors. Nature Medicine. 2(2): 158-159.1996.
35. Akyar G.H.: Kronik Myeloid Lösemi Ve Akut Lenfoblastik Ön Tanılı Olgularda Konvensiyonel Sitogenetik Ve Floresan İn-Situ Hibridizasyon Yöntemi İle Analizler,7,11,12. 1999.
36. Özkul Y.:Kronik Miyelositer Lösemide (KML) BCR-ABL Ve ABL-BCR Hibrit Genlerinin RT-PZR Ve Southern Blot Yöntemi İle Gösterilmesi. Gazi Üniversitesi Kütüphanesi.5-28.1994.
37. Elmaagacli A.H., Beelen D.W., Opalka B., Seeber S., Schaefer U:W., et.al. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disage stage. Ann hematol(2000)79:424-431.
38. Barnes DJ.,MELO JV., et al. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukemia. Acta Hematol 2002;108(4):180-202.
39. Pelz A.F., Kröning H., Franke A., Wieacker P., Stumm M., et al. High reliability and sensitivity of the BCR-ABL D-FISH test for the detection of BCR-ABL rearrangements. Springer-Verlag 2002.
40. Artigos CG., Melo A.,Roa JC., Paez E., Vittini C., Arriagada M., Gonzalaz L., Pflaumer Roa L., et.al. Detection of BCR-ABL gene sequences using RT-PZR in patients with leukemia in the IX regipn. Chile.Rew Med Chil Jun; 130(6):623-30. 2002
41. Tchirkov A., Bons J.-M., Bons J.-M., Chassgne J., Schoepfer C., Kanold J., Briançon G., Giollant M., Malet P., Demeocq F., et al. Molecular



- detection of alate-appearing BCR-ABL gene in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol.*(1998)77:55-59.
42. Ören H., Düzovalı Ö., Yüksel E., Sakızlı M., and İrken G., et.al, devolopment of Acute Promyelocytic Leukemia with Isochromosome 17q after BCR/ABL Positive Chronic Myeloid Leukeima. *Cancer Genet Cytogenet* 109:141-143 (1999),1999.
43. Pasternak G., Hochhaus A., Schultheis B., Hehlmann R., et.al. Chronic myelogenous Leukemia: molecular and cellular aspects. *J. Cancer Res Clion Oncol*(1998)124:643-660.
44. Sercan O.H., Eresen Ç., Yüksel E., Sercan Z., Paralı F., Altingöz O., Sakızlı M., et.al. Molecular detection of bcr/abl m-RNA and cytogenetic analysis in cml patients: Comparison of results and factors affecting the methodologies used. *Turkish Journal of Cancer* Vol.28/No.4/1998.
45. Kurzrock, R., Talpoz, M.: The molecular patholgy of chronic myelogenous leukemia. *British J Hematol* 79,34-37 (1991).
46. McGee, J.O.D.,Isaacson, P.G., Bright, N.A.: Oxford textbook of pathology. Oxford University Press, p 1717-1731 (1992).
47. Fitzgerald, H.,Moris, C.M.: Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. *Cancer Gene Cytogenet* 57:143-151 (1991)
48. Lee, J.M., Bernstein, A.:p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90,5742-5746 (1993).
49. Allen, P.B, Morgan, G.J., Wiedemann, L.M.: Philadelphia chromosome-positive leukemia the translocated genes and their gene products. *Bailliere's Clinical Haematology* 5 (1): 897-930 (1992).
50. Melo ,J.V Goldman, J.M.: Specific point mutations that activate v-abl are not found in philadelphia-negative chronic myeloid leukemia 786-790 (1992).

51. Kipreos, E.T., Wang, J.Y.J.: Cell cycle-regulated binding of c-abl tyrosine kinase to DNA. Science 382-384 (1992).
52. P. Eberhard, çevirenler G. Lüleci ve arkadaşları, Renkli Genetik Atlası – 179. Nobel Tıp Kitapevleri Ocak 2000.
53. [www.pathology.washington.edu](http://www.pathology.washington.edu)
54. [www.mcl.tulane.edu...](http://www.mcl.tulane.edu...) LeukemiasCML
55. [wisc.edu](http://wisc.edu) clarkPubFigpub15\_16.jpg
56. [www.hmds.org.ukpzs.html](http://www.hmds.org.ukpzs.html)
57. [www.medscape.com](http://www.medscape.com) viewarticle408451\_print
58. Köksal F., nükleik asit çoğaltma yöntemleri. 21

