

İ.Ü.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENETİK ANABİLİMDALI

Danışman

Prof.Dr.Seniha Hacıhanefioğlu

KML VAKALARININ SİTOGENETİK, MOLEKÜLER
SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER GENETİK
YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Tıbbi Biyolog R. Dilhan Kuru (Msc.)

118837

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İstanbul, 2002

TEŞEKKÜR

Lisans, Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince derslerini büyük bir zevk ve heyecanla izlediğim, derin bilgi birikiminden her zaman yararlandığım, bilim adamı olma yolunda ilk tohumları atan, yetişmemde büyük emeği olan ve emekliliğinden sonra da hiç yalnız bırakmayan değerli hocam Pof.Dr.Asım Cenani' ye,

Tez süresince aynı endişe ve sevinçleri benimle paylaşan, danışman hocam Prof.Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Tezimin laboratuvar aşaması ve yazımı sürecinde büyük yardımını gördüğüm, Doç Dr. Nur Sayhan ve laboratuvar ekibine,

Çalışma örneklerinin temininde büyük titizlikle katkıda bulunan Doç.Dr.Zafer Başlar ve ekibine,

Tez oluşturulması ve yazımı sırasında vakit ayırarak yol gösteren Doç.Dr.Uğur Özbek'e,

Doktora eğitimi boyunca derslerine zevkle katıldığım, tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarını sonuna kadar sunan Prof.Dr.Seher Başaran'a ve çok yoğun temposuna rağmen her zaman vakit ayıran, deneyimlerinden faydalandığım Dr.Birsen Karaman'a ayrıca yardımlarından dolayı tüm PRETAM çalışanlarına,

Tezimin istatistik değerlendirmelerindeki katkılarından dolayı Dr.Pembe Çağatay'a

Tezimin planlanmasındaki katkılarından dolayı Doç Dr.Aslı Silahtaroğlu'na, her zaman gösterdikleri destek ve anlayışları için başta Uzm.Tıbbi Biyolog Ayşe Çırakoğlu olmak üzere tüm Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü ailesine,

Gösterdiği büyük özveri ile bu günlere gelmemi sağlayan, hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora süresince de hep yanımda yer alan ve en sıkıntılı dönemlerde dahi güler yüzü ile moral kaynağım olan canım anneme ve hiç bir zaman ilgi ve desteklerini eksik etmeyen ailemin diğer fertlerine sonsuz teşekkürler...

***Bu tez çalışması, Araştırma Fonu tarafından (ProjeNo: T-474/071197)
kısmen desteklenmiştir.***

KISALTMALAR

A: Alfa

ALL: Akut Lenfositik Lösemi

AMCA: Aminomthyl Cumarine

AML: Akut Myeloid Lösemi

BCR: Breakpoint Cluster Region

bç: baz çifti

Biotin-11-dUTP: Deoksyuracil trifosfat

Brdu: 5-Bromo-deoksiuridin

CBG: Centromere-Barium-Giemsa

cDNA: Complementary DNA

CGH: Comparative Genome Hybridization

D: Dalton

DAPI: 4,6-Diamino-2-fenil-indol

dl: Desilitre

dm: Double minute

DNA: Deoxyribonükleic asit

dNTP: 2'-Deoksinükleotid 5'-trifosfat

EDTA: Etilendiamintetraasetikasit

EtBr: Etidyum Bromür

FA: Formamide

FCS: Fetal Calf Serum

FISH: Fluorescence in situ hybridization

FITC: Fluorescein izotiyocyanate

GTG: Giemsa-Tripsin-Giemsa

GTL: Giemsa-Tripsin-Leishman

HRBT: High Resolution Banding Technique

hsr: Homogeneously Staining Regions

ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature

i: İzokromozom

kb: Kilo baz

KMML: Kronik Myelo Monositik Lösemi

KML: Kronik Myeloid Lösemi

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
M: Molar
Mb: Mega baz
MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin
MCV: Mean Corpuscular Volume
mg: Miligram
mM: Mili molar
µl: Mikro litre
MRD: Minimal Residual Disease
NOR: Nucleolar Organiser Region
ONC: Over Night Culture
p: Kromozomun kısa kolu
pcd: Premature centromere division
Ph¹: Philadelphia
PHA: Phytoheamagglutinin
PI: Propidium İodide
pmol: pikomol
PSI: Perspective Scientific Inc.
PZR. Polimeraz Zincir Reaksiyonu
q: Kromozomun uzun kolu
QFA: Quinacrine-Fluoresan-Atebrin
RB: Retinoblastoma tümör supressör geni
RBG: Reverse-Barium-Giemsa
RNA: Ribonucleic Acid
SCE: Sister Chromatid Exchange
SCLC: Small cell lung cancer
SDS: Sodyumdodesilsülfat
SSC: Saline Sodium Citrate
TEB: Tris-EDTA-Borikasit
TEMED: N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin
TRITC: Teramethyl-Rhodamine-Isothiocyanate
UV: Ultraviole
YAC: Yeast Artificial Chromosome

İÇİNDEKİLER

Teşekkür

I.Giriş

II.Genel Bilgiler

II.1.Hemopoez(Kan Hücrelerinin Yapımı)

II.2.Kanser

II.3.Lösemi

II.3.1 KML (Kronik Myeloid Lösemi)

II.3.1.1 Philadelphia (Ph¹) Kromozomu

II.3.1.2 c-abl Onkogeni

II.3.1.3 bcr Geni

II.3.1.4 bcr-abl Füzyon Geni Ve Füzyon Proteini

II.3.1.5 Minimal Residual Hastalık

II.3.1.6 KML'li Olgularda Uygulanan Tedavi Yöntemleri

II.3.1.7 KML Olgularında Kullanılan Tanı Yöntemleri ve Klinik Uygulamalar

II.3.1.7.1 Sitogenetik Analiz Yöntemleri

II.3.1.7.2 Moleküler Sitogenetik Yöntemleri

II.3.1.7.3 Moleküler Genetik Teknikleri

III. Gereç Ve Yöntem

III.1 Gereç

III.1.1 Örnek

III.1.2 Çözeltiler

III.1.2.1 Kemik İliği Aspirasyonu Direk Preparasyon Ve Overnight Kültürü İçin

Kullanılan Çözeltiler

III.2.1.2 Perifer Kan Kültürü İçin Kullanılan Çözeltiler

III.2.1.3 GTL Bant Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

III.2.1.4 Fluoresan İn Situ Hibridizasyon Çözeltileri

III.2.1.5 RT/PZR (Reverse Transkriptaz/Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Çözeltileri

III.2 Yöntem

III.2.1 Direk Preparasyon

III.2.2 Over Night Kültür

III.2.3 Perifer Kan Kültürü

III.2.4 Preparatların Hazırlanması

III.2.5 GTL Bantlama

III.2.13 Agaroz Gel Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi

IV Bulgular

V. Tartışma ve Sonuç

VI.zet

VII.Summary

VIII. Kaynaklar

IX.zgemiř



I.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser,hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Hemapoetik sistemdeki anormal hücre çoğalması ile karakterize olan lösemilerde oluşan kromozomal değişikliklerin analizi, löseminin tipinin doğru olarak belirlenmesi, remisyon ve relaps durumlarında hastalığın prognozunun anlaşılması ve minimal residual hastalıkların hücre seviyesinde takibinde yardımcı olmaktadır.

Lösemi alt grublarından biri olan Kronik Myeloid Lösemi (KML) spesifik bir kromozom anomalisi ile tanımlanan ilk kanser tipidir. KML'li olguların % 90 dan fazlasında Philadelphia kromozomu görülmektedir. Hastalığın ortaya çıkması ve ilerlemesi ile ilgili yakın ilgisinin olduğu düşünülmektedir. Philadelphia kromozomu kısaca "Ph¹" olarak gösterilir ve 9q34 deki *abl* protoonkogeninin 22q11 deki *bcr* geni ile resiprokal translokasyonu sonucu oluşan bcr-abl füzyon genine sahiptir. Füzyon geninin oluşmasını sağlayan genlerden bcr geni farklı kırılma bölgelerine sahiptir. *Major Break Point Cluster Region* (M-bcr) ve *Minor Break Point Cluster Region* (m-bcr) KML olgularında gözlenen kırılma bölgeleridir. bcr-abl füzyon geninin kodladığı füzyon proteini tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hastalığın prognozunda rol oynamaktadır.

Sitogenetik olarak Ph¹ kromozomu gözlenemeyen %5lik KML grubu ise *Ph¹(-)* olarak isimlendirilir. Ph¹(-) bulunan fakat klinik tablosu KML'ye uyan hastaların çoğunda, moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi ile ortaya çıkan Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleri ile bcr-abl füzyonu saptanmıştır.

KML'li olguların yanısıra yetişkin ALL olgularının %17-25'inde Ph¹ kromozomunun gözleendiği bildirilmiştir. Bu nedenle de Ph¹ kromozomu bu hastalık gruplarında prognostik indikatör olarak kabul edilmektedir.

Sitogenetik olarak normal görülen hücrelerdeki bcr-abl füzyon geninin tesbiti, bu olgularda tanının doğru konması ve prognozunun takibi açısından oldukça

önemlidir. Kemik iliği transplantasyonu, klasik ilaç tedavisi veya interferon α tedavisi protokollerinden birinin uygulandığı bu olgularda tedavinin seçimi ve izlenmesinde Ph¹ kromozomu yol göstermektedir. Hastanın remisyona girdiği dönemde ortaya çıkan minimal residual hastalığının ileri moleküler tekniklerle tesbit edilmesi bundan sonraki tedavi protokolünün belirlenmesinde önem kazanır.

FISH yöntemi, moleküler genetik ile sitogenetik arasında köprü oluşturmaktadır. Kromozomların belli bölgelerine yada tamamına spesifik proplar kullanılarak interfaz ve metafaz hücrelerinde tesbiti mümkün kılan güçlü ve hassas bir tekniktir.

KML olgularında bcr-abl füzyon geninin hızlı ve çok daha hassas olarak tesbit edilebilmesi için moleküler genetik tekniklerine başvurulmaktadır. Başlangıçtan bu güne bir çok teknik denenmiş ve daha güvenilir olanı aranmıştır. Bu gün kullanılan yöntemler içinde en güvenilir teknik Reverse Transkriptaz/Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT/PZR) dur. Hastanın kan yada kemik iliği hücrelerindeki bcr-abl füzyon gen mRNA'sından reverse transkriptaz enzimi ile cDNA ları elde edilip, PZR tekniği ile amplifikasyonu sonucu bcr-abl füzyon geni tespit edilmektedir.

Bu tez çalışmasında merkezimize refere edilen KML olgularından elde edilen kemik iliği aspirasyonu ve perifer kanı örneklerinde GTL batlama tekniği ile sitogenetik analizleri yapılarak Ph¹ kromozomunun gösterilmesi, bcr-abl translokasyon DNA probları kullanılarak FISH tekniği ile interfaz ve metafazlarda bcr-abl füzyonunun tespit edilmesi, RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin ortaya çıkartılması ile elde edilen verilerin materyal ve teknik açıdan karşılaştırılması amaçlandı.

Özellikle Ph¹(-) bulunan olgularda farklı yöntemler kullanılarak bcr-abl gen füzyonunun gösterilmesi ile çeşitli tekniklerin birbirlerine üstünlüklerinin ve birbirlerini tamamlayıcılıklarının, tanının doğru konması, prognozunun takibi ve tedavinin saptanmasındaki önemi belirtildi.

II.GENEL BİLGİLER

2.1.HEMOPOEZ(KAN HÜCRELERİNİN YAPIMI)

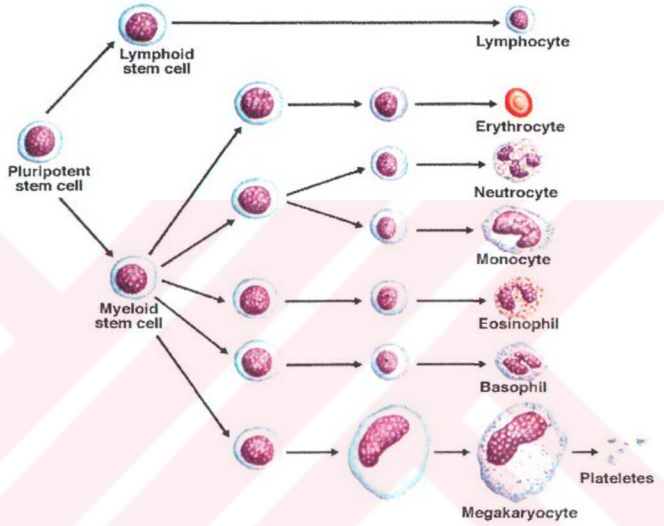
Kan hücrelerinin yapımı (hemapoez), insanın yaşına göre değişik yerlerde olmaktadır. Fetal hayatta umbilikal kese, karaciğer ve kemik iliği iken, gebeliğin 24. haftasından sonra kemik iliği en önemli kan yapım yeri haline gelir. Bütün kan hücrelerinin kemik iliğinde bulunan ilkel bir pluripotent kök hücresinden oluştuğu kabul edilmektedir. Kök hücreleri kemik iliğinde morfolojik olarak birbirine benzeyen, fakat fonksiyonel açıdan birbirinden farklı, kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerden ibaret bir havuz oluştururlar. Pluripotent kök hücreleri morfolojik açıdan küçük lenfositlere benzerler. T ve B özelliği taşımazlar ve dolaşan kanda çok az sayıda bulunurlar. Pluripotent kök hücresi farklılaşarak bir taraftan lenfoid kök hücrelerini bir taraftan da multipotent hemopoetik hücreleri oluştururlar. Lenfoid kök hücrelerinin farklılaşması ile B ve T lenfositlerini yapmak üzere yönlendirilmiş unipotent lenfoid kök hücreleri oluşur. Multipotent hemopoetik kök hücreleri de farklılaşarak, eritroid, granülositik, monositik ve megakaryositik hücreleri vermek üzere yönlendirilmiş unipotent kök hücrelerini meydana getirirler. Kendi kendini yenileyebilme yetenekleri sınırlı olan unipotent kök hücreleri de her hücre serisinin morfolojik olarak ayırt edilebilen genç ana hücrelerine (proeritroblast, myeloblast, monoblast, megakaryoblast ve lenfoblast) dönüşürler. Blastik hücreler kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip değildir. Bu hücrelerin belli aşamalardan geçerek gelişmeleri sonucu olgun kan hücreleri meydana gelir. Normalde kemik iliğindeki hücrelerin ancak %1 inde mitoz görülür. Oysa hiperplaziye uğrayan bir ilikte mitoz oranı %5 e kadar yükselebilir.

Kan hücreleri üç evreden geçerek gelişmelerini tamamlarlar. Bunlar sırası ile;

1-Çoğalma :

2-Olgunlaşma :

3-Olgunlaşmış hücrelerin kemik iliğinde dolaşıma verilmesi (98) .



Şekil 2.1.1 Kemik iliğinde kan hücrelerinin yapımı

2.2.KANSER

Kanser kompleks ve kalıtsal bir hastalık ailesidir. Hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Normal hücrelerin kanser hücresine dönüşümü kompleks ve çok aşamalı bir olaydır ve karsinogenezis olarak isimlendirilir (80, 7) .

Kanserleşen hücre kalıtsal olarak bir sonraki generasyona aktaracağı bir takım yeni özellikler kazanmıştır. Bu özellikler aşağıda sıralanmıştır:

1-Kanserleşen hücre, normal hücrelerdeki inhibisyon mekanizmasını kaybetmesi ile çoğalma kontrolünü yitirmiştir.

2-Kanserleşen hücre, dokuya özgüllüğünü kaybetmiştir. Kökeni ne olursa olsun artık tamamen farklı özelliklere sahiptir. Kan ve lenf yolu ile her hangi bir dokuya yerleşebilir.

3-Kanserleşen hücrede, farklılaşma gerilemiştir.

4-Kanserleşen hücrenin, metabolizması değişmiştir.

5-Kanserleşen hücrenin, antijenik özellikleri değişmiştir.

6-Kanserleşen hücrenin, morfolojisi değişmiştir.

Kanserdeki temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybıdır. Çoğalma ve büyüme gen kontrolü altında olduğundan dolayı gen ekspresyonunun değişimi ile kontrol dışına çıkmaktadır.

Gen ekspresyonunun değişimi DNA'nın direkt etkilenmesi (gen mutasyonları, translokasyonlar ya da amplifikasyonlar) ve gen transkripsiyonu yada translasyonu gibi mekanizmalardan biri ile oluşur.

Kanser sebebi açıkça bilinmemekle beraber, hem dış (çevresel kimyasallar, radyasyon) hem de iç (immün sistem defektleri, genetik yatkınlık) rol oynamaktadır. İlk olarak 1914' te Boveri tarafından, kanserin kaynağında somatik mutasyonun olduğu hipotezi ortaya atıldı. Bu hipoteze göre kanser hücrelerinin kaynağı somatik hücrelerde oluşan kromozom düzensizliklerinin sonucudur. Bu düzensizlikler ise aşağıda sıralanan hücresel kontrol mekanizmasının bozulması ile anormal hücre proliferasyonuna yol açar. Orijinal kanser hücresinden oluşan tüm somatik hücrelere bu genetik değişiklikler aktarılır. 1960' ta Nowel ve Hungerford tarafından, kanserle ilişkili bulunan ilk kromozom anomalisi olan Philadelphia (Ph¹) kromozomu bildirilmiştir.

Kromozom bant tekniklerinin gelişmesi ile kanser hücrelerinde bulunan kromozomların yeniden yapılandırılmalarının belirlenmesinde ilerleme kaydedilmiştir.

Tüm kanser tiplerinde görülen genetik değişimler, translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ve duplikasyonlar yada kromozomların kaybı yada artışı (aneuploidi) şeklinde olmaktadır (80).

Kanser oluşumunda etkili olan 3 tip gen bulunmaktadır.

1-Tümör Baskılayıcı Genler: Tümör baskılayıcı gen ürünleri normalde anormal büyüme ve maling malformasyonları bloke eder. Bu genler inaktif olduklarında hücrenin büyüme ve bölünmesini baskılayıcı etkileri ortadan kalkar. Kansere oluşabilmesi için her iki allelin kaybedilmesi gerekmektedir.

2-Onkogenler: Normal hücre büyümesini ve gelişmesini etkileyen genlerdir. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen denen normal genlerin mutasyona uğramış (aktive edilmiş) formlarıdır.

3-Diğer Genler: Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerinin dışındaki diğer genler de kanser oluşumundaki rollerinden dolayı sorumlu tutulmaktadır (7, 96).

1-Tümör Baskılayıcı Genler:

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasının negatif kontrolünü yapan genlerdir. Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve temel diğer hücre fonksiyonlarında düzenleyici rol oynar.

Normal koşullarda hücrelerin gereğinden fazla çoğalmasını önleyen tümör baskılayıcı genleri herhangi bir şekilde (kromozomal delesyonlar, translokasyonlar, nokta mutasyonları, heterozigosite kaybı vs.) inaktifleşir veya kaybolursa, hücre çoğalması normal sınırlarda tutulamaz ve kanser ortaya çıkar.

İlk kez retinablastom üzerinde yapılan çalışmalar sonucu tarif edilmiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar resesiftir. Kanserin ortaya çıkabilmesi için her iki allelin de görev yapamaz hale gelmesi gerekir. Önce allellerden birinin fonksiyonunu kaldıran başlangıç mutasyonu oluşur. Daha sonra da aynı hücrede oluşan yeni bir mutasyonla ikinci allelin de ortadan kalkması sonucu tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu tamamlanmış olur. Bir çok kanser tipinde tam bir maling fenotipin oluşabilmesi için bir tümör baskılayıcı genindeki bir başlangıç mutasyonun olması, aynı genin ikinci allelinin de ve ayrıca diğer tümör baskılayıcı genlerinde inaktifleşmesi ve onkogenlerin aktivasyonu gerekmektedir (74, 80, 85). Bilinen ve aday olan tümör baskılayıcı genlerin bazıları *tablo 2.2.1 de gösterilmiştir.*

2-ONKOGENLER:

Normal hücre büyüme ve gelişmesinde rol oynayan hücresel genlerin (protoonkogen) aktifleşmesi ile ortaya çıkan bazı onkogenlerin malign oluşumlara yol açtığı biliniyor. Onkogenler ilk kez fare, kedi ve maymunlarda kansere neden olan onkogenik retrovirüslerin moleküler analizleri sonucu keşfedilmişlerdir.

İnsanda normal genomda bulunan onkogenler (c-onc) RNA tümör virüslerinde (retrovirüs) bulunan genlere homologdur. Bu gün için 100'ün üzerinde c-onkogen (c-onc) izole edilmiş, insan kromozomlarında haritalanmıştır. Protoonkogenleri aktive eden üç mekanizmadan söz edilmektedir.

1-Amplifikasyon: Yapısal olarak normal onkogenlerin artan kopyaları sitogenetik olarak küçük kromozom parçaları (double minutes, dmin) şeklinde yada normal kromozomlar içinde inversiyon yapmış olarak (Homogeneously Staining Regions, HSR) görülür (91). Böylece protoonkogenlerin aşırı ekspresyonu ortaya çıkar. Normal hücrelerde hemen hemen hiç görülmeyen bu olay kanser hücrelerinde çoğu kez görülür. Nöroblastomlarda N-myc protoonkogeninin 200 kez artması bu mekanizmaya örnek olarak verilebilir (96). Bu mekanizmanın görüldüğü diğer protoonkogenler *tablo 2.2.2* de gösterilmiştir.

2-Nokta mutasyonları: Tümör dokusundaki c-onkogenlerinin DNA dizilerinin diğer somatik dokularla karşılaştırılması sonucunda, spesifik nokta mutasyonlarının farklı tümör tiplerine neden olabileceği kabul edildi. (*tablo 2.2.3*)

3-Kromozomal yeniden düzenlemeler: Burada iki ayrı mekanizma söz konusudur.

Birinci durumda; c-onkogenlerinin immunoglobulin yada T-cell reseptör lokusuna translokasyonudur. Antigen reseptörleri de denilen bu reseptörlerin normal süreci esnasında onkogenler aktifleşirler. Bu durum Burkitt lenfomada gözlenir. 8 numaralı kromozomda (8q24) bulunan myc oncogeni; immunoglobulinin 2p11 de bulunan hafif zincirinin K parçası t(8;2), 14q32 de bulunan ağır zincirinin enhancerı t(8;14) ve 22q11 de bulunan hafif zincirinin λ parçaları t(8;22) ile oluşturduğu translokasyonlar sonucu aktive olmaktadır.

İkinci mekanizma ise; Kromozomal translokasyon sonucu 2 geni kodlayan bölgelerin füzyonu ile füzyon proteinin üretilmesidir . Buna eniyi örnek KML olgularında görülen 9q34 deki c-abl onkogeninin 22q11 de bulunan bcr (breakpoint

cluster region) ile füzyonu, t(9; 22) sonucu ortaya çıkan bcr-abl füzyon proteindir (13, 7). *Tablo 2.2.4*

Kanserlerdeki kromozomal anomaliler üzerine yapılan çalışmalar kromozom bant tekniklerindeki ilerlemelerle paralellik göstererek gelişmiştir. 1960 larda, bant teknikleri bulunmadan önce sadece KML olgularında Ph¹ kromozomu gösterilebilmiştir. 1970'lerde bant tekniklerinin başlaması ile 30 dan fazla neoplastik olayda kromozom anomalileri gösterilmiştir. 1980'lerin ilk yıllarında, kromozomal defektlerin bir çok kanser tipinde bulunduğu ve her kanserin spesifik bir kromozomal lezyonla ilişkili olduğu kabul edildi. Günümüzde ise, gen klonlama, insitu hibridizasyon, restriksiyon endonükleaz gen haritalaması ve PZR analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanması ile daha güçlü bulgular elde edilmiştir. Bu tekniklerin kullanımı birçok neoplazi ile ilişkili kromozomal anomalilerin gösterilmesi ve onkogenlerin bulunmasını sağlamıştır (13, 80, 11)

3-Diğer Genler:

Bu genlere ilişkin en iyi örnek sitokrom P450 ve DNA tamiri enzim genleridir. Sitokrom P450 gen ailesi tarafından oluşturulan ilaç metabolize eden enzimler, vücuda giren yabancı kimyasalların detoksifikasyonundan sorumludur. P450 genlerin büyük kısmı polimorfiktir ve ilaç metabolizmasındaki farklılığın temelini oluştururlar. Bunlardan en iyi incelenen genetik polimorfizm akciğer kanserine eğilimle ilgili olan *aril hldrokarbon hidroksilaz (AHH)* dır (7, 96).

Tablo2.2.1 Bazı bilinen yada aday Tümör baskılayıcı genler (80)

Gen	Kromozom	Kanser Tipleri	Ürün Yeri	Fonksiyonu	Kalıtsal Sendrom
APC	5q	Kolon kanseri	Sitoplazma?	?	Ailesel adenomatous polyposis
DCC	18q	Kolon kanseri	Membran	Hücre adezyon molekülü	-
NF1	17q	Nörofibrom	Sitoplazma	GTPase-aktivatör	Nörofibromatozis tip 1
NF2	22q	Schwannoma ve meningioma	Membran içi	Membranın hücre iskeletine bağlantısı	Nörofibromatozis tip 2
P ⁵³	17p	Kolon kanseri ve bir çoğu	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü	Li-Fraumeni sendromu
RB	13q	Retinoblastoma	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü	Retinoblastoma
RET		Tiroid kanseri	Membran	Reseptör tirozin kinaz	Multiple endokrin neoplazi tip 2
VHL	3p	Böbrek kanseri	Membran ?	?	von Hippel-Lindau hastalığı
WT-1	11p	Nefroblastoma	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü	Wilms Tümörü

Tablo 2.2.2 İnsan tümörlerindeki onkogen amplifikasyonu

Onkogen	Tümör	Protein fonksiyonu
c-myc	SCLC Promyelositik lösemi Glioblastoma	Transkripsiyon faktörü
N-myc	SCLC Nöroblastoma Glioblastoma	Transkripsiyon faktörü
L-myc	SCLC*	Transkripsiyon faktörü
EGFR	Glioblastoma	Reseptör tirozin kinaz
HER-2	Meme Mide Yumurtalık	Reseptör tirozin kinaz
cyklin D1	Karaciğer Özefagus Boyun ve baş bölgesi squamous hücre karsinomu	Hücre siklüsü düzenleyicisi

* SCLC Küçük hücreli akciğer kanseri

Tablo 2.2.3 İnsan tümörlerinde belirlenen nokta mutasyonları (80)

Onkogen	Mutasyon	Tümör	Protein fonksiyonu
H-ras	Düşen GTPase aktivitesi ve/veya artan nükleotid oranları	Mesane	GTPase
K-ras	Düşen GTPase aktivitesi ve/veya artan nükleotid oranları	Akut myeloid lösemi	GTPase
ret	Extracellular domain	Multiple endokrin neoplasisi tip 2A	Reseptör tirozin kinaz
ret	Kinaz domain	Multiple endokrin neoplasisi tip 2B	Reseptör tirozin kinaz
met	Kinaz domain	Kalıtsal papiller böbrek karsinomu	Reseptör tirozin kinaz
kit	Kinaz domain	Mast hücre lösemisi	Reseptör tirozin kinaz
edk 4	p16 ile birlikte etkileşim kaybı	Melanoma	Hücre siklusü düzenleyicisi

Tablo 2.2.4 İnsan tümörlerinde yaygın oluşan translokasyonlar (80)

Onkogen	Translokasyon	Tümör	Protein fonksiyonu
c-myc	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	Burkitt's lenfoma	Transkripsiyon faktörü
bcr-abl	t(9;22)(q34;q11)	Kronik myeloid lösemi	Non reseptör tirozin kinaz
trk	haritalanmadı	Papiller tiroid karsinomu	Reseptör tirozin kinaz
ret	inv(10)(q11.2;q21) diğerleri haritalanmadı	Papiller tiroid karsinomu	Reseptör tirozin kinaz
PDGFR	t(5;12)(q33;p13)	Kronik myelo monositik lösemi	Reseptör tirozin kinaz
bcl-1 (cyclin D1)	t(11;14)(q13;q32)	B-cell lenfoma	Hücre siklusu düzenleyicisi
PRAD-1 (cyclin D1)	inv(11)(p15;q13)	Paratiroid adenom	Hücre siklusu düzenleyicisi
bcl-2	t(14;18)(q32;q21)	Foliküler lenfoma	Hücre ölümü düzenleyicisi

2.3.LÖSEMİ

Lösemiler kan hücrelerinin sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde bölünüp ve çoğalması sonucu oluşan neoplastik hastalık grubudur. Bu hastalık çoğalan hücrelerin farklılaşmasına göre (genç yada olgun) iki gruba ayrılır. Genç ve olgunlaşmamış hücrelerin neoplastik proliferasyonu sonucu "Akut", kısmen yada tamamen olgun hücrelerin neoplastik proliferasyonu sonucu da "Kronik" lösemiler oluşur (98). Lösemiler hücresel farklılaşma ve içerdiği hücre tipine göre de Akut yada Kronik Myeloid Lösemi (AML, KML); Akut yada Kronik Lenfositik Lösemi (ALL, KLL) olarak sınıflandırılır. Monositik, bazofilik, eosinofilik ve eritroid lösemi gibi nadir formları da vardır. AML ve lösemilerin bir grubu, predominant olabilen myeloid, monositik, eritroid yada megakatyositik hücre tipleri olan primitiv hematopoetik kök hücreleri ile karakterizedir.

Lösemilerin görülen tipleri ile çevresel ve genetik risk faktörleri arasında yakın ilişki vardır. Diğer maligneteler gibi lösemi de klonal artış yeteneğindeki bir hücrede genetik değişiklikler sonucu oluşur. Çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlerin DNA kırıklarını indükledikleri ve daha sonrada resiprokal translokasyonlara yol açtığı bilinmektedir. Örneğin Akut Non Lenfositik Lösemi (AML olarak da bilinir) daha çok yetişkinlerde görülür. Bu yüzden radyasyon, toksik kimyasallar ve genetik yatkınlık ile ilişkili bulunmuştur. Radyologlar ve Japonya' ya atılan atom bombalarından canlı kurtulanlarda, benzen gibi kimyasallara maruz kalanlarda ve Down sendromlu bireylerde AML görülme riski yüksektir. Fanconi anemisi, Bloom sendromu ve Ataxia telangiectasia gibi kromozomal kararsızlığa sahip bazı otozomal resesif hastalıkların görüldüğü kişiler de yüksek lösemi riski taşırlar.

Kanser oluşum mekanizmalarından biri olarak kabul edilen ve onkogenleri aktive ettiği bilinen viral enfeksiyonlar ile yetişkinlerde görülen Tcell lenfosit lösemi ve hairy cell lösemiler arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Ancak virüslerin indüklediği lösemilere çocuklarda açıkça rastlanılamamaktadır. En yaygın ve en geniş karakterize edilen ve lösemilere yol açan genetik düzensizlikler, onkogenik proteinleri kodlayan füzyon genlerini oluşturan kromozomal translokasyonlardır. Onkogenleri aktive ettiren kromozomal translokasyonlardan bir çoğuna lösemilerin değişik formlarında rastlanılmaktadır. Bu düzensizliklerin klasik örneği KML' de bcr-

abl füzyon genini oluşturan 9 ve 22 numaralı kromozom arasındaki resiprokal translokasyon $t(9;22)(q34;q11)$ dur. Bu genin tirozinkinaz aktivitesi ve transformasyon yeteneği vardır. Ayrıca lösemilerde tesbit edilen bir çok translokasyon ve füzyon geni bulunmaktadır. Bunlara $t(1;19)$ sonucu oluşan PBX1-E2A geni; $t(1;11)$ sonucu oluşan MLB-AFIP geninin ALL 'de; $t(8;21)$ sonucu oluşan AML1-ETO geni ve $t(6;9)$ sonucu oluşan DEK-CAN geninin AML'de görülmesi örnek olarak verilebilir. Bu translokasyonlarda bir hücre serisinin morfolojik alt tipi ile sınırlıdır. Örn: $t(15;17)$ ve PML-RAR-X geninin oluşmasının AML-M₃' te gözlenmesi gibi. Bu translokasyonlarda hep bir füzyon gen oluşmakta ve bu genin transformasyon yeteneği bulunmaktadır.

Lösemnin genetik değişikliklerle gelişimi inisyasyon, promosyon ve progresyon olarak sıralanabilecek çok aşamalı bir süreçtir. İnisyasyonda lösemi fenotipinin oluşabilmesi için genetik anomaliliğin oluşması gerekir. Bu anomaliye sahip hücre, normal hücrelere göre daha fazla gelişebilmekte ve/veya yaşamsal avantajlara sahip hale geçmektedir(11).

2.3.1 KML (KRONİK MYELOİD LÖSEMİ)

KML (Kronik Myeloid Lösemi), pluripotent kök hücre düzeyindeki neoplastik transformasyondan kaynaklanan klonal bir myeloproliferatif hastalıktır. Klinik olarak granülositlerin çok fazla üretilmesi sonucu perifer kanında yüksek lökosit sayısı ve dalak büyümesi ile karakterizedir. Lökosit sayısının yüksek olmasına karşın farklılaşmasını tamamlayabilmektedir. İlk kez 1845'te Craigie, Bennett ve Virchow tarafından tarif edilmiştir. O yıllarda dalak büyümesi ile kendisini gösterdiğine dikkat çekilmiş ve "kanın iltihaplanması", "suppuration of the blood" olarak adlandırılmıştır. Virchow bu hastalığa lösemi adını vermiştir. O zamandan beri KML, kanserlerin anlaşılabilmesi için model hastalık olmuştur.

1960' ta Nowell ve Hungerford bu tip hastalıklarda 22 numaralı kromozomun delesyonundan kaynaklanan küçük bir kromozomun (Philadelphia kromozomu)(Ph¹) bulunduğunu bildirmişlerdir. Tipik klinik gelişim ve spesifik kromozom anomalisi nedeni ile KML, en iyi tanımlanan myeloproliferatif hastalıktır.

Batı ülkelerinde 1/100.000 insidansı bulunduğu ve tüm lösemilerin %20-30 unu oluşturduğu bildirilmektedir. Görülme yaşı 40'ların ortaları olmakla beraber 40-

60 yaş arasında pik yapmaktadır. Nadiren çocuklarda görülür. Belirli bir cinsiyeti seçmemektedir (30, 50, 51, 98, 52).

KML hastalarının %90'ından fazlasında Philadelphia kromozomu görülmektedir. İlk yıllarda kanserle ilişkili bir sitogenetik anomali olarak kabul edilen Ph¹ kromozomunun daha sonraları 9 ve 22 numaralı kromozom arasındaki resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11) ile oluştuğu anlaşıldı ve KML nin spesifik sitogenetik bulgusu olarak kabul edildi (37, 30) *şekil 2.2.3.1.1.*

Yapılan invitro çalışmalar, normal hematopoetik hücrelerin transformasyonu ile oluşan lösemi hücrelerinin hızla çoğalarak, normal hücrelerin azaldığını ve olgun granülositlerin yaşam sürelerinin normal hücrelerden daha uzun olduğunu göstermektedir. KML'deki yönlendirilmiş kök hücrelerin artışının özellikle perifer kanında normalden 10-20 kat daha fazla olmaktadır. Karyotipleme ve Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz (G6PD) izozim analizleri KML'li hastalardaki myeloid kolonilerin lösemi hücrelerinden kaynaklandığını, normalden fazla çoğaldığını ve tüm metafazlarda Ph¹ kromozomunun görüldüğünü göstermiştir. Sadece T lenfositlerinde malign oluşum görülmemekte ve Ph¹ kromozomunun görülmemesinin sebebi bilinmemektedir. Çok az sayıda Ph¹(+) hücrelerin olabileceği, ancak tesbit edilemediği düşünülmektedir. Ph¹ kromozomun kemik iliği, fibroblast ve diğer mezenşimal dokularda bulunmadığı bildirilmiştir. KML'de neoplastik hücrelerin büyümesi otonom değildir. Yine yapılan invitro çalışmalar KML'li hücrelerin normal kemik iliği gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir (50, 16).

KML bifazik gelişim göstermektedir.

1-Kronik faz: Bu faz prelösemi dönem olarak düşünülüyor. Bu dönemde çeşitli hemopoeitik alanlardaki (myeloid, eritroid, megakaryositik, T ve B lenfoid) farklılaşma yeteneğini kaybetmemiş pluripotent kök hücrelerinden gelen Ph¹ (+) lösemi klonunun çok fazla artması söz konusudur. Bu hücrelerin farklılaşması, sonuna kadar devam etmekte ve yüksek miktarda olgun granülosit dolaşımında yer almaktadır. Özellikle myelosit ve bazofili gibi granülositik formdaki lökositlerin sayısında artış ve düşük nötrofilik alkali fosfataz değeri görülmektedir(24).

Bazı hastalarda spesifik olmayan belirtiler görülmektedir. Hipermetabolizma, anemi yada büyük dalak gibi trombositopeniden daha çok trombositoz belirtileri yaygın bulgulardır.

Bu fazda hasta tolere edecek ilaçlarla normale yakın yaşam kalitesine sahiptir. Bu dönemde Ph¹(+) hücrelerin normal hücreler üzerine bir üstünlüğü bulunmaktadır. bcr-abl füzyon gen ürünü olan füzyon proteininin rolü söz konusudur.

bulunan bu tümör baskılayıcı genindeki (Tp53) mutasyonun hematolojik kanserlerdeki bir çok tümör tipinde gösterilmesi, aynı zamanda KML'de de yapılan çalışmalarla bu mutasyonun belirlenmesi, blastik krizde bu düzensizliğin görülmesinin oldukça anlamlı olduğunu göstermektedir (77, 25, 52). Ancak yapılan bazı çalışmalar bazı hastalarda p53 geninin bu transformasyonda rol oynayabileceği yönündedir. Blastik krizdeki hastalarda, lösemi hücrelerinin ~%25-30 unda p53 geninde anomaliler gösterilmektedir. En yaygın olarak da p53 allellerinden birinin kaybolup, diğerinde ise nokta mutasyonunun gelişmesidir (13).

KML blastik hücreleri genellikle normal hücrelerden daha yavaş bölünmekte ve olgunlaşmamış hücreler hızla artmaya başlamaktadır. Bu fazdaki granülosit-monosit klonlarının üretimindeki düşüş, klinik ve morfolojik bulgularda 2-6 ay önce görülmektedir. Transformasyon esnasındaki blastların fenotipi KML'de hangi hematopoetik kök hücrelerinin dominant olduğunu göstermektedir. Bu durum hastadan hastaya farklılık göstermekle birlikte, olguların %65'inde myeloid blastlar, %30'unda lenfoid, %5'inde ise eritroid, megakaryositik veya farklılaşmamış blastlar bulunmaktadır (50, 51). Olguların büyük bir kısmında KML'nin sonu genellikle bir kaç aylık yaşamları olan Akut Lösemidir. Bu dönemde p53 mutasyonlarının yanı sıra Retino Blastoma (RB) delesyonu ve RAS aktivasyonu, spesifik olmayan genetik değişiklikler ve başka tümör baskılayıcı genlerinin delesyonları da gösterilmektedir. Bunlardan p16 tümör baskılayıcı genin delesyonunun homozigot olduğu durumlarda lenfoid transformasyonla bağlantı kurulmaktadır. Bu dönemde görülen yeniden düzenlemeler sonucu füzyon yapan genlere örnek olarak; t(16;21)(p11;q22) FUJ-ERG; t(3;21)(q26;22) EVI 1-AML 1; inv (16)(p13;q22) MYH1 1-CBF β verilebilir (80,23).

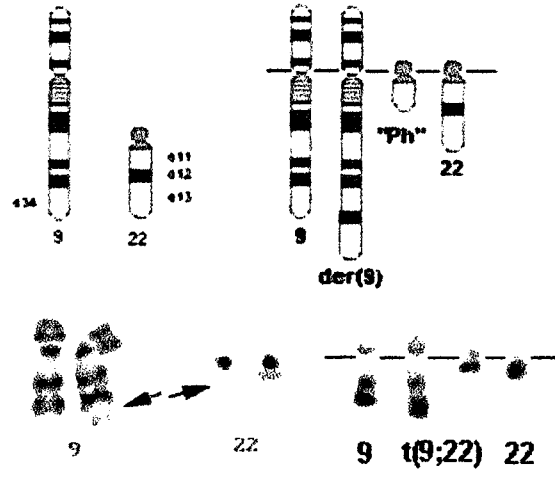
Bu protein Ph¹(+) prekürsörlerde, apoptozisi inhibe etmektedir. Yapılan moleküler çalışmalar bcr-abl proteininin kronik faza sebep olan bir ajan olarak kalmadığını, aynı zamanda hastalığın ilerlemesinde de rol oynayan birincil mekanizma olduğunu göstermektedir (30, 50, 51, 52).

2-Blastik faz; Bir kaç hafta ile bir kaç yıl (ortalama 3,5 yıl) sürmektedir. Belirtilerin ilerlemesinden sonra hızla üretilen myeloid hücrelerin son farklılaşma kapasiteleri düşmektedir. Hastalığın acceler fazı (kemoterapiye direncin olduğu faz) başlamaktadır. Bu blastik krizin habercisidir ve tanıdan birkaç hafta sonra oluşabildiği gibi, kronik fazda 27 yıl kalan hasta olduğu da rapor edilmektedir. Hastalığın ilerlemesi, kötüleşen klinik belirtiler, aneminin derecesinin artması, trombositopeni ve kemik iliği fibrozisi ile ilişkilidir.

Erken kronik fazda Ph¹(+) hücrelerin bulunması yada bcr-abl füzyonunun blastik krizin oluşması için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu fazın temel özellikleri olan trombosit ve bazofillerin artışına ek olarak ikinci klonal sitogenetik anomaliler tesbit edilmektedir (51 , 52 , 16) .

Bu vakaların % 80'inde Ph¹(+) hücrelerin görülmesine ek olarak bir kromozomal düzensizlik görülmektedir. Bu bulgular blastik krize yaklaşıldığının habercisidir. En yaygın görülen kromozomal değişiklikler, ikinci Ph¹ kromozomu, 8 numaralı kromozomun trizomisi (+8) ve 17 numaralı kromozomun uzun kolunun izokromozomu, i(17q) dur *resim 2.2.3.1.2*. Daha az yaygın olarak da 19 numaralı ve 21 numaralı kromozomların trizomileri (+19, +21) görülmektedir. Vakaların %20 sinde p53 geninde değişiklik gözlenmiştir (52, 16).

KML olgularında, özellikle blastik fazda çok yaygın olarak ikinci bir Ph¹ kromozomunun görülmesinin sebebinin, KML olgularında görülen 22 numaralı kromozomun bcr bölgesinin 5' uçtan kırılarak oluşan birinci Ph¹ kromozomunun duplikasyonu ile yada 3' uçtan kırılarak oluşan ilave bir translokasyon olabileceği ve ikincil düzensizlikler olarak gözlenen en yaygın izokromozomdur. KML'nin blastik kriz fazında görülen bu düzensizliğinin, hastalığın prognozunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer hematolojik kanserlerde de sıklıkla görülmesi, lösemi gelişiminde birinci genetik değişiklik olarak önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Çünkü 17 numaralı kromozomun kısa kolunda bir tümör baskılayıcı gen olan Tp53 geninin lokalize olduğu bilinmektedir. l(17q) da da kromozomun kısa kolu kaybedildiği için tümör baskılayıcı genin fonksiyonu da kaybedilmektedir. Tercihen myeloid blastik krizde p53 geninde nokta mutasyonu oluşmakta ve ikinci p53 alleli de i(17q) oluşumu sırasında kaybolmaktadır. 17p13 te



Şekil 2.2.3.1.1 t(9;22)(q34;q11) diagram ve kırık noktaları (üst); G- bantlama (sol) R- bantlama (sağ) (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)(39).



Şekil 2.2.3.1.2 i(17q) G-bantlama (sol) R- bantlama (sağ) (Atlas of Genetics and and Cytogenetics in Oncology and Haematology)(39).

KML GENETİĞİNİN TARİHÇESİ

1845; Craigie, Bennet, Virchow tarafından KML ilk kez “Kanın iltihaplanması” “Suppuration of the blood” şeklinde tanımlandı.

1914; Boveri tarafından kanserin orjininde somatik mutasyonun olduğu ortaya atıldı.

1960; Novel ve Hungerford tarafından Ph¹ kromozomu gösterildi, ancak delesyona uğramış 21 numaralı kromozom olduğu düşünüldü.

1973; Rowley tarafından 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon gösterildi ve Ph¹ kromozomu adı verildi.

1976; Fitzgerald tarafından 22 numaralı kromozomdaki kırık noktası bulundu.

1982; Heisterkamp ve ark. tarafından 9 numaralı kromozomda c-abl geni bulundu.

De Klein ve ark. tarafından abl geninin 9 numaralı kromozomdan 22 numaralı kromozoma transloke olduğunu gösterildi. KML gelişiminde abl geninin rolü olduğu bildirildi.

Swan ve ark. tarafından 22 numaralı kromozomdan da 9 numaralı kromozoma sis onkogeninin transloke olduğu düşünüldü.

1983; Collins ve Groudine tarafından blastik krize girmiş KML’li hastalarda Ph¹ (+) hücrelerde abl dizilerinin 4-8 kez arttığı gösterildi.

1984; Prakash ve Yunis tarafından translokasyona giren kromozomların kırık noktalarının 22q11.21 ve 9q34.1 subbantlarında lokalize olduğunu bildirildi. 22 numaralı kromozomdaki kırık noktasına “breakpoint cluster region “ adı verildi.

Jhanwar ve ark. tarafından germline kromozomlarında insitu hibridizasyon ile abl geninin 9q34.1 de olduğu ve buradan kırılarak Ph¹ kromozomuna gittiği gösterildi.

Shtivelman ve ark. tarafından abl geninin bcr genine transloke olduğu refere edildi ve spesifik 8 kb. lık RNA' nın 2 genin füzyonunun transkripti olduğunu bulundu.

1985; Kanapka ve ark. tarafından Ph¹(+) KML hastalarında füzyon gen ürününün tirozin kinaz aktiviteli bir protein olduğu bulundu ve bu proteinin maling tranformasyonda anahtar rol oynayabileceği bildirildi.

1987; Bernards ve ark. tarafından PFGE ile abl eksonları tesbit edildi ve bcr-abl proteininin 210 kd. olduğu gösterildi.

1991; Scot ve ark. tarafından farede de abl geninin aynı şekilde hematolojik maligniteye yol açtığı gösterildi.

1992; Haas ve ark. tarafından Ph¹ (+) lösemi olgularında bir parental orjin eğiliminin olduğu gösterildi.

1993; Melo ve ark. tarafından RT/PZR ile bcr-abl ve abl-bcr füzyon genlerinin ekspresyon yaptıkları gösterildi.

Welchand Wang tarafından nükleer abl geninin tirozin kinaz aktivitesinin hücre siklusünde retinoblastomanın spesifik inaktivasyonu ile düzenlendiği gösterildi.

Feinberg ve

1994; Fioratas ve ark., Litz ve Copenhaver tarafından Ph¹ (+) lösemi olgularında imprinting olduğu görüşü desteklendi.

Melo ve ark. tarafından abl geninde imprinting olmadığı bildirildi.

1995; Haas ve ark. tarafından abl-bcr de imprinting olduğu ispatlandı.

Chissoe ve ark. tarafından bcr geninin tamamı ve abl geninin %80 den fazlasının dizilendirilmesi gerçekleştirildi.

2000; Claudia S.Huetner ve ark. tarafından bcr-abl geni ile indüklenerek lösemi geliştirilen transgenik farelerde bcr-abl füzyon geninin ekspresyonu baskılanarak tamamen remisyona girdikleri bildirildi (40)

2.3.1.1 PHILADELPHIA (Ph¹) KROMOZOMU

Kanserle ilişkili bulunan ilk kromozom anomalisi Philadelphia kromozomu (Ph¹) dur. Nowel ve Hungerford KML hastalarında bu kromozomun görüldüğünü bildirdiler (80).

Bant tekniklerinin 1970' lerde gelişmesi ile 1973' de Rowley bu kromozomun 9 ve 22 numaralı kromozomların resiprokal translokasyonu sonucu oluşan derivatif 22 olduğunu bildirdi ve *Philadelphia kromozomu (Ph¹)* adını verdi (26, 96). Sitogenetikte kullanılan tekniklerin gelişmesi ile kromozomlarda daha detaylı bant seviyelerine ulaşılması sonucu, bu iki kromozomdaki kırık noktaları tesbit edilerek, 9 numaralı kromozomun uzun kolu (q34.1) ve 22 numaralı kromozomun uzun kolu (q11.7) arasındaki resiprokal translokasyon olduğu anlaşıldı. Bunun sonucu küçük bir 22 (Ph¹) ve daha uzun 9 numaralı kromozom ortaya çıkmaktadır (16).

KML olgularının %90, yetişkin ALL olgularının %25-30 ve çocuk ALL ile AML vakalarının %6'sında t(9;22)(q34.1; q11.7) görülmektedir (74). 9q34.1 de lokalize olan c-abl onkogeninin 22q11.7 de lokalize olan "breakpoint cluster region" kırılma noktalarından Major kırılma bölgesine (M-bcr) transloke olduğu ilk olarak 1982 Hagemeijer ve ark. tarafından gösterildi (80). Bu translokasyon sonucu bcr-abl füzyon geni ve bu genin ürünü olarak da bcr-abl füzyon proteini oluşur. Burada inaktif durumda olan c-abl protoonkogeninin kromozomal translokasyonu sonucu onkogene dönüşmesi söz konusudur. *resim 2.3.1.1.1*

Normal hücrelerde bu genin ürününün hücre gelişiminde kontrol edici bir görevi olduğu ve translokasyon sonucu bu fonksiyonunun bozulduğu ve tümör oluşturu potansiyelinin aktive olduğu bilinmektedir (63, 51). Bu translokasyon sırasında iki hücresel gen olaya karışır. Bunlar 9 numaralı kromozomda c-abl ve 22 numaralı kromozomda c-sis protoonkogenleridir. c-sis bir Smian sarkoma virüs onkogeninin homoloğudur. Normalde 22q12.3 ile q13.1 bölgesinde lokalize olmaktadır. Bu bölge bcr kırık noktasından uzaktadır. Ancak Ph¹ kromozomu oluşumu esnasında 9 numaralı kromozoma eklenmektedir.. c -sis, trombosit kaynaklı büyüme faktörünü kodlar. Bu gen ürününün KML ile birlikte sıklıkla görülen myelofibroziste rol oynayabileceği düşünülmektedir (55, 16).

bcr-abl füzyon proteini en iyi anlaşılan proteinlerdendir. Bu konuda yapılan çalışmalar c-abl geninin tirozin kinaz aktiviteli bir protein kodladığı ve bcr-abl füzyon geninde tirozin kinaz aktivitesinin çok arttığı göstermektedir. Bu özelliğin hastalığın prognozunda oldukça etkili olabileceği düşünülmektedir (13, 50).

KML olgularının büyük bir kısmının sitogenetik bulgusu Ph¹ kromozomudur. Oluştığı kök hücrelerine göre myeloid, eritroid, megakaryositik ve lenfoid hücre tiplerinden biri görülür (18). Ph¹ kromozomu, özellikle KML olgularında tanınan konması, prognozunun izlenmesi açısından oldukça önemli bir sitogenetik bulgudur. Tedaviden önce ve sonrasında belli sürelerle özellikle kemik iliğinde incelenmesi, klinik olarak oldukça önemlidir (83, 82, 79, 72, 28, 84).

Son yıllarda bir grup araştırmacı Ph¹ kromozomunun oluşumunda genomik imprinting görüldüğünden söz etmeye başlamışlardır. Tercihli olarak baba orjinli 9 numaralı kromozom ile anne orjinli 22 numaralı kromozomun resiprokal translokasyonu sonucu Ph¹ kromozomunun oluştuğunu 1993' te Feinber, 1994' te Fioretas ve ark., yine 1994' te Litz ve Copenhagen çalışmaları ile desteklemektedirler (58). Aslında ilk olarak 1992' de Haas ve ark. Ph¹(+) lösemi olgularında baba orjinli eğilim olduğunu gösterdi. Daha sonraları Wilms tümör, Rabdomyosarkoma, Osteosarkoma ve Retinoblastoma'da da genomik imprinting gözlemlendi ve babadan gelen allellerin tercihli olarak alındığı belirlendi. Bir grup araştırmacı da bu fikre karşı gelmektedir. 1994'te Melo ve ark., yine aynı grup 1995'te bu konuda hiç bir bulgu bulmadıklarını belirttiler. Ancak 1995' te Haas abl-bcr füzyonunda genomik imprinting olduğunu ıspatladi.

Varyant Ph¹ KROMOZOMU:

Varyant Ph¹ kromozomu ilk kez 1973'te bildirilmiştir (10). Varyantların büyük bir kısmında delesyona uğrayan 22 numaralı kromozom tesbit edilmektedir. 22 numaralı kromozom ile resiprokal translokasyona uğrayan kromozom 9 numaralı kromozomdan başka bir kromozom yada kromozomlardır (51).

Ph¹ kromozomu bulunan olguların %5'inde bir yada daha çok kromozomun olaya karıştığı kompleks translokasyonlar sonucu oluşan varyant Ph¹ kromozomu görülmektedir(74, 32). Y kromozomu hariç tüm kromozomların varyant Ph¹ translokasyonları görülmüştür.

Ph¹ ve varyant Ph¹ kromozomlu KML olguları arasında hematoloji ve prognoz açısından hiç bir farklılık bulunmamaktadır (52, 31).

Ph¹ KROMOZOMU (-) KML OLGULARI: Morfoloji tablosu ile KML olan olguların %5' inde sitogenetik olarak Ph¹ kromozomu bulunmamaktadır, Ph¹(-) (74). Bu hastaların 1/3 ünde moleküler teknikler ile bcr-abl füzyonunun gerçekleştiği belirlendi.

Başlangıçta Ph¹(-) KML olgularının kısa yaşam süresi, tedaviye yeterli cevap verememe, basofil eksikliği ve trombositopeni gibi farklı klinik bulgulara sahip oldukları rapor edilirken, bir çok araştırmacı tarafından da, hematolojik indeksler, klinik gelişim, tedaviye cevap ve yaşam süresi açısından Ph¹(-) fakat bcr-abl füzyonu (+) hastaların Ph¹(+) hastalardan farksız olduğunu bildirmektedir. bcr-abl füzyonunun (+) olduğu bu hasta grubunda c-abl geninin bcr genine 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasında resiprokal translokasyon yapmaksızın interstitial insertion yaptığı gösterildi.

Sitogenetik olarak Ph¹(-) bulunan hastaların geriye kalan 2/3 lük kısmı ise, myeloproliferatif Myelo Displastik Sendrom (MDS), Kronik Myelo Monositik Lösemi ve doğru sitogenetik olarak Ph¹(-) ve moleküler genetik olarak da bcr-abl (-) bulunan KML olguları ile hematolojik remisyona girmiş KML olguları oluşturmaktadır. Yine bu grupta Ph¹(+) KML hastalarına benzemeyen, %25-50 daha düşük bir oranda blastik transformasyona giren, KMML ile KML arasında ara bir prognoza sahip sitogenetik olarak Ph¹(-) bulunan bir hasta grubu bulunmaktadır (43, 51).

Morris ve ark. Ph¹(-) bulunan hastalarda bcr-abl füzyonunun oluşabileceğini moleküler teknikler kullanarak göstermiştir (67). Bu nedenle moleküler teknikler bu hastaların tanılarının konmasında, prognoz ve tedavilerinin takibinde önemli rol oynamaktadır (68)

Ph¹(-) ve bcr-abl füzyonu (+) bulunan KML olgularının bir kısmında hücreler varyant translokasyon taşıdıkları için Ph¹ kromozomu maskelenmektedir. Sadece KML değil ALL de de Ph¹(-), bcr-abl (+) sonuçlar alınmaktadır. Translokasyonun sitogenetik olarak tesbit edilemediği durumlarda moleküler tekniklere başvurulmaktadır. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), Southern Blotting ve Reverse Transkriptaz/Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT/PZR) teknikleri ile bu hücreler tesbit edilebilmektedir (95).

2.3.1.2 c-abl ONKOGENİ

c-abl onkogeni 9q34.1 de lokalize olur (102). İnsan ve diğer omurgalılar dışında, *Drosophila melanogaster*'de bulunmuştur. Bu filogenetik korunma bize normal c-abl onkogeninin insan ontogenezi için oldukça önemli rol oynadığını göstermektedir (51). Abelson murine lösemi virüsünün transformasyon geni olan v-abl geninin insanladaki homologudur. Tirozinkinaz protoonkogenlerinin src ailesine üyedir (83). Normal hücrelerde protoonkogen olarak bulunan c-abl, nonreseptör tirozinkinaza sahiptir. Bu enzim, substratları fosforilliyebilmektedir. Fakat hücre membran düzeyinde reseptör fonksiyonuna sahip değildir (30). Fare, pre B cell lösemisinden izole edilen v-abl onkogenine homoloji gösterdiğinden dolayı c-abl adı verilmiştir. Heisterkamp ve ark. bu onkolojik virüs geni olan v-abl geninden elde edilen bir prob kullanarak translokasyon bölgesine "kromozomal walking" tekniği uygulayarak, bu genin dizi analizini yapmışlardır (80) .

abl geni (c-abl) ~225 kb. dır ve 11 exon içermektedir. Exonlar 5' tan sentromere doğru uzanmaktadır. İki alternatifli 1.exonu (exon 1a ve exon 1b) ve bu exonlara alternatif exon a2 bulunmaktadır. Exon 1a exon2 nin 19 kb. lık ve exon 1b ise exon2 nin 200 kb.lık proksimalinde bulunmaktadır (52). Bu genomik konfigürasyonun sonucu olarak 2 büyük (6 kb. ve 7 kb. lık) c-abl mRNA' sı transkribe olmaktadır (Şekil 2311).

c-abl geni çeşitli dokulardaki hücrelerde olmakla beraber, en yüksek mRNA düzeyleri dalak, timus ve testiste bulunur. abl proteini stoplazmik ve çekirdek düzeyinde bulunmaktadır. Bu proteinin sentezi ve hücre içi lokalizasyonu, abl proteininin hücre biyolojisinde anahtar rol oynayabileceğini ve çeşitli hücre komponentlerinde birçok fonksiyonunun olabileceğini göstermektedir.

Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda, homozigot abl gen delesyonu taşıyan bu farelerin abl ptoteininin yokluğuna bağlı olarak hayvanın normal gelişimini tamamlayamadığı ve ciddi gelişim geriliği, lenfoid organların hipoplazisi ve adrenal yetersizlikten dolayı prenatal dönemde öldüğü gösterildi.

Normal bir c-abl proteini 145kd. ağırlığındadır ve p145^{abl} olarak adlandırılmaktadır. c-abl proteini, tirozin proteinkinaz ailesine aittir (Şekil2.3.1.2). Bilindiği gibi proteinkinazlar ATP'nin son fosfatının, substrat proteininin amino asit

ucuna transferini katalizlemektedir. Bu enzimler genellikle serin yada threonine amino asitine fosfat eklemektedirler. Tirozin fosfokinaz aktiviteli proteinlerin bu enzimatik özelliği epidermal büyüme faktörü, trombosit büyüme faktörü ve koloni stimüle edici faktör reseptörleri gibi çeşitli büyüme faktörü reseptörleri ile ilişkilidir. Ayrıca bazı onkogenlerin tümör oluşturuucu potansiyelleri ile de yakından bağlantılı bulunmaktadır. ABL proteininin N terminal ucunda SH₃ ve SH₂ (src homoloji 3ve 2 zinciri) bulunmaktadır. Bu bölgeler proteinlerle etkilişime girmektedir. SH₃ özel proline zengin diziler içeren proteinler, SH₂ fosforizoin kalıntıları ile etkilişime girmektedir.

C terminal bölgesinde DNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Transgenik farelerdeki deneysel çalışmalar, bu bölgenin kaybında abl proteininin çekirdek fonksiyonlarının kaybettiğini göstermiştir. Ancak bu fonksiyonlar hakkında herşey bilinmemektedir. Bu özelliklerinden dolayı c-abl geni ve proteininin hücre büyümesinin kontrolünde etkili olabileceği düşünülmektedir. Hücre siklüsü esnasında proteininin spesifik bir regülasyonunun bulunduğunu gösteren çeşitli veriler bildirilmektedir. Özellikle bu DNA bağlanma bölgesi hücre bölünmesi esnasında sikline bağlı kinaz aktivitesi ile fosforillenerek inaktiflenmektedir.

Çekidek abl proteininin tirozin kinaz aktivitesi RB (Retinoblastoma tümör supressör geni) proteini ile düzenlenmektedir. RB proteini ile abl proteini hücre siklüsünün G₀ fazında kompleks oluşturmaktadır. G₀ dan G₁ fazına geçiş esnasında RB fosforillenerek inaktifleşirken, RB den ayrılan abl proteinindeki tirozinkinaz aktifleşir (30, 51, 95).

2.3.1.3 bcr GENİ

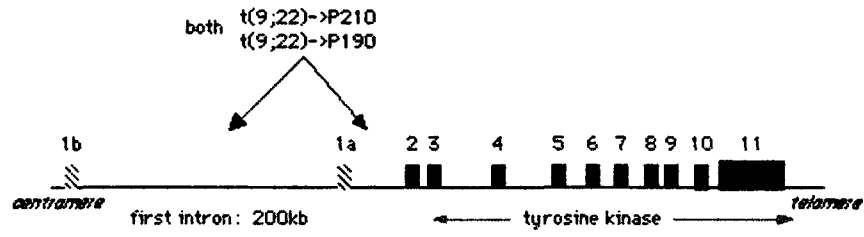
1984'de Groffen ve ark. tarafından Ph¹(+) bulunan KML olgularında 22 numaralı kromozomda 5,8kb.lık DNA içeren breakpoint cluster region (bcr) olarak adlandırılan bir kırık noktası rapor edildi. 22q11.21de lokalize olan bcr geninin 5,8kb.lık kısmının, aslında 90 kb.lık bir genin etkili parçası olduğu 1985'de Heisterkamp ve ark. tarafından gösterildi. Bu genin bazı yazarlar tarafından Ph¹ geni olarak da isimlendirildiği bildirildi. 22 numaralı kromozomda 135 kb.lık bir bölgede bulunan bcr geni 4,5 ve 6,7 kb.lık mRNA' larının bulunduğu moleküler çalışmalarla

gösterilmiştir. Translasyon ürünü 160 kd.ağırlığında ve p160^{bcr} olarak isimlendirilmektedir. bcr geninin 23 exonu bulunmaktadır (şekil 2.3.1.3). Li ve ark. büyüklüğü 83-190kd. arasında değişen bir kaç farklı bcr proteinini insan hücrelerinde gösterdiler. bcr transkriptleri fibroblastlar, myeloid ve lenfoid hücre kültürlerinde ve epitel hücrelerinde tesbit edildi. bcr proteininin hücre siklusu regülasyonunda rolü olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle mitozda iken kromozomlar çevresinde, bölünme dışındaki hücrelerde ise stoplazmada bulunmaktadır. bcr proteini tek tip serin/threoninkinaz aktivitesine sahiptir. Böylece bu aminoasitleri fosforilliyebilmektedir. 2SH₂ bağlanma bölgesi, ilk exonunda kodlanmaktadır. P21 için GTPase aktivasyon proteini (GAP) olarak fonksiyonu olan bir C terminal bölgesi bulunmaktadır. Bu proteinin bir membran reseptörü görülmemektedir.

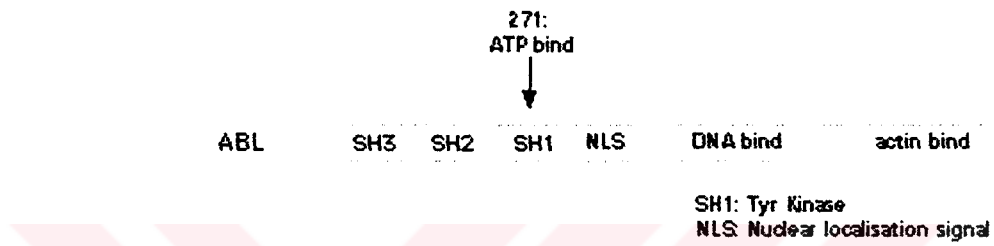
bcr geninde üç farklı kırık noktası tesbit edilmektedir. KML olgularının büyük çoğunluğunda kırık noktası 5,8 kb.lık *Major breakpoint cluster region (M-bcr)* bölgesindedir ve exon b1'den b5'e kadar uzanan 5 exonu bulunmaktadır. Fakat son yıllarda exon 12 den exon 16'ya uzandığı şeklinde ifade edilmektedir. Oluşan bcr-abl füzyon proteini 210 kd. ağırlığındadır ve p210^{bcr-abl} şeklinde belirtilmektedir (51, 52, 95).

KML olgularında en sıklıkla görülen kırılma noktası exon b2 ve b3 yada b3 ve b4 arasındadır. bcr genindeki ~3kb.lık bir bölgedeki bu intronik kırılma noktasındaki küçük farklılık, füzyon proteininin aminoasit dizisinde bir değişikliğe yol açmaktadır. Bazı yazarlara göre KML olgularının klinik durumunu, bcr kırık noktasının lokalizasyonu etkilemektedir. Ancak yapılan çalışmalarla hastalığın klinik gelişimi ile kırık noktaları arasında kesin bir ilişki gösterilememekle birlikte, bu konu araştırmacılar arasında tartışma konusu olarak devam etmektedir (26,103).

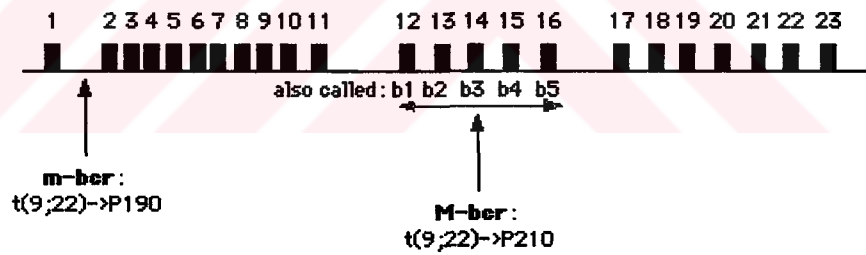
Ph¹(+) bulunan ALL olgularının 2/3'ünde ve nadiren KML olgularında, kırık noktası exon e1 ile exon e2 arasında uzanan intron bölgesine sahip *minör breakpoint cluster region (m-bcr)* bölgesinde bulunur. Oluşan bcr-abl füzyon proteini 190 kd. ağırlığındadır ve p190^{bcr-abl} olarak ifade edilmektedir. bcr genindeki üçüncü kırık noktası *μ-bcr* bölgesindedir. Bu kırık M-bcr bölgesinin alt kısmına denk gelmektedir. e19a2 birleşimi ile oluşan bcr-abl füzyon geninin en geniş olanıdır. Oluşan proteinin ağırlığı 230 kd.dur ve p230^{bcr-abl} şeklinde belirtilmektedir. p230^{bcr-abl} proteinine sahip lösemilere çok nadir rastlanılmaktadır (28).



Şekil 2.3.1.1 c-abl protooncogeninin şematik yapısı (39)



Şekil 2.3.1.2 c-ABL proteinin şematik yapısı (39)



Şekil 2.3.1.3 c-bcr geninin şematik yapısı (39)

2.3.1.4 bcr-abl FÜZYON GENİ VE PROTEİNİ

bcr abl genlerinin özel bölgelerinden kırılması ve birleşmesi sonucu ortaya çıkan bcr-abl füzyon geni, hematolojik malignitelerle birlikte söz edilmektedir. Oysa bu 2 gen arasındaki füzyon insanlarda sıklıkla görülmektedir. Biernaux PZR yöntemi ile normal hücrelerin ~ %20' sinde bcr-abl füzyon genini göstermiştir (12). Yapılan çalışmalarla bu füzyonun görüldüğü olguların küçük bir kısmını hematolojik olgularının oluşturduğu gösterilmiştir.

Genellikle KML olgularında gözlenen tüm bcr-abl füzyon genleri 5'bcr dizisi ile ilk 26 kodonluk kısmı hariç 3'abl gen dizilerinin füzyonu ile oluşur. KML olgularının büyük bir kısmının yanısıra ALL olgularının da 1/3'lük kısmında gözlenen bcr-abl füzyonunda M-bcr olarak adlandırılan 5,8kb.lık gen bölgesi ile abl gen bölgesinin translokasyonu söz konusudur. M-bcr bölgesinde 1'den 5'e kadar numaralandırılan 5 exon bulunmaktadır. Tarihsel olarak b1'den b5'e kadar ifade edilirken, şimdi exon 12 den exon 16'ya kadar numaralandırılmaktadır. Farklı 2 tipte bcr-abl birleşmesi gerçekleşmektedir. M-bcr'ye ait exon 2 (b2) ile abl'ye ait exon 2 (a2) nin birleşmesi (b2a2) ve / veya M-bcr'ye ait exon 3 (b3) ile abl'ye ait exon 2 (a2) nin birleşmesi (b3a2) sonucu ortaya çıkan füzyon mRNA 8,5kb. uzunluğundadır ve 210kd. ağırlığındaki füzyon proteinini kodlamaktadır. P210^{bcr-abl} olarak adlandırılan bu proteinde, füzyona katılan M-bcr'ye ait exon 3'ün bulunması ile füzyon mRNA'sında 75 bp.lık bir farklılık ortaya çıkmasına bağlı olarak 25 amino asitlik bir fark gözlenir (44, 74, 64). P210^{bcr-abl} bir fosfoproteindir ve tirozinkinaz aktivitesinin regülasyonu bozularak, artmıştır (18). İn vitro çalışmalarla, bcr-abl gen ürününün Abelson murine lösemi virüsü (Ab-MuLv) tarafından sentezlenen GAG-ABL füzyon proteinine benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Bu da P210^{bcr-abl} füzyon proteininin hematopoetik hücrelerin gelişiminin stimülasyonunda ve KML'nin patogeneğinde anahtar rol oynadığını göstermektedir (63, 70).

KML olgularında nadiren, ancak yaşlı ALL olgularının % 70'inde gözlenen bir başka bcr-abl füzyon proteini de p190^{bcr-abl} dir. m-bcr geninin ilk exonu (e1) ile abl'nin exon 2 (a2)'si arasındaki translokasyon sonucu oluşan (e1a2) füzyon proteini 190 kd. ağırlığındadır (103, 28). P190^{bcr-abl} kodlayan bcr-abl füzyon mRNA'sı p210'a göre 7,5 kb. daha kısadır. Sadece yaşlı ALL olgularında değil Ph¹(+) bulunan ALL'li

çocukların büyük bir kısmında da bu füzyon proteini gözlenmektedir. İn vitro çalışmalar p190 proteininin p210 proteinine göre daha fazla tirozinkinaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmektedir (44).

bcr-abl füzyonu sırasında amino uçtaki delesyonlarla tirozinkinaz aktivitesi artmış onkogen ürünü ortaya çıkmaktadır. Her iki proteinde de bu artış gözlenirken, p190 proteininde daha fazla tesbit edilmesi, onun daha fazla transformasyon aktivitesine sahip olduğunun göstergesi olabileceği invitro / invivo çalışmalarla gösterilmektedir. Bu durum belki de p190'nın niçin özellikle Akut lösemilerde gözlemlendiğini açıklamaktadır. Çünkü yapılan çalışmalar bcr-abl füzyonu tespit edilen Akut lösemilerde çok daha aktif tirozinkinaz ve çok daha fazla hematopoetik hücreler ve fibroblastlarda transformasyon aktivitesi bulunduğunu bildirmektedir. Kronik fazda nadiren p190 görülen KML olgularının çoğunluğu KMML fenotipi göstermektedir (30, 101, 59).

bcr-abl transkriptinin nadir görülen başka varyantları da bulunmaktadır. 1990'da Saglio ve ark. tarafından bir KML olgusunda³. Bir kırık noktası (μ bcr) bulunduğu rapor edilmektedir. 3' bcr'nin büyük bir kısmı (e19) ile abl geninin exon 2 (a₂)'si arasındaki füzyon sonucu (e19a2) büyük bir füzyon geni ve 230 kd. luk p230^{bcr-abl} füzyon proteini oluşmaktadır (81). Çok nadir olarak görülen bu proteinin KML'nin çok hafif formu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nötrofilik KML adı verilen bu grup hastalarda Ph¹(+) klasik KML ve Kronik Nötrofilik Lösemi (KNL) ile çakışan klinik ve hematolojik bulgular görülmektedir. Bu bulgulara ilave bcr dizileri içeren füzyon proteinlerinin lösemi klonlarının farklılaşmasında önemli rol oynayabileceklerini işaret etmektedir (28, 30, 64).

bcr-abl füzyon geninin diğer bir tipi de Hochhaus ve ark. tarafından bildirilmiştir. Daha yeni bulunan bu gen, tanıdan hemen sonra myeloid blastik kriz gelişen, WBC değerleri daha düşük olan KML hastalarında gösterilmiştir. bcr'nin exon 6 (e6) sı ile abl' nin exon 2 (a2) si arasında oluşan bu füzyon geninin proteini p219'dan daha kısa olup, 287 amino asitlik olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan moleküler çalışmalarla KML ve ALL olgularında yeni, farklı kırık noktalarının füzyonu ile oluşan bcr-abl füzyon genleri bildirilmektedir.

bcr-abl füzyon gen tipleri ile lösemi fenotipi arasında kesin bir ilişki kurulmazken, olaya katılan bcr'nin büyüklüğüne bağlı olarak ortaya çıkan füzyon proteininin, löseminin kronik yada akut fenotipini belirleyen kritik bir özelliği olabileceği düşünülmektedir (30, 61,4).

hücreler growth faktör yokluğunda proliferere olabilmekte ve ortama antisense oligonükleotidler eklendiğinde p210^{bcr-abl} ekspresyonu inhibe edilmektedir. Daha sonra da apoptotik hücre ölümleri oluşmaktadır. Apoptozisin baskılanması sonucu neoplastik ilerlemeyle yol açan ikinci genetik değişiklikler (KML'de blastik kriz) görülmektedir.

Bir çok sitotoksik ajan apoptozisi indükliyerek hücre ölümüne yol açar. Sitotoksik ajanların hücreler üzerindeki etkileri, apoptozisi düzenleyen çeşitli genetik faktörlerle değişebilmektedir. Bu nedenle apoptozisinin bcr-abl proteini ile inhibisyonu, klonal artış, tümör progresyonu ve sitotoksik ajanlarla tedaviye direnç göstermede önemli bir rol oynamaktadır. Bu önemli özellik, tümör gelişiminin mekanizmasını anlamamıza yaradığı gibi bu hastalıkların tedavi yolları hakkında da bilgi vermektedir (62,8, 22,29).

2.3.1.5 MİNİMAL RESİDUAL HASTALIK (MRD)

Minimal Residual Hastalık (MRD), mümkün olan metodlarla devam eden, klinik remisyonda tesbit edilebilen en düşük düzeydeki hastalığın mevcudiyeti olarak ifade edilmektedir.

MRD'lerin tesbiti için, bir çok teknik üzerinde yapılan çalışmalarda 2 amaç üzerinde durulmaktadır ;

1 - MRD'nin tesbitinde hassas ve spesifik metodların geliştirilip, standartize edilmesi,

2 - Bu yolların, hastalıkların klinik gelişimlerini önceden belirlemesidir.

Lösemi hücreleri, kendi temel morfolojik, immunofenotipik ve genetik karakterleri ile normal hematopoetik hücrelerden ayırt edilmektedir. MRD'lerin tesbiti için birkaç metodolojik yaklaşım vardır. En yaygın kullanılan yöntem, kromozom anomalilerinin konvansiyonel sitogenetik analizi ile residual hastalığın izlenmesidir. Tipik sitogenetik relaps, hematolojik relapstan önce ortaya çıkmaktadır. Ancak hassasiyeti düşüktür (%1-5). Sınırlı sayıda metafaz çalışıldığı için, residual hastalık taşıyan hücreler gözden kaçabilmektedir. Yine de sitogenetik analizinin güvenilirliği, Southern Blott benzeri teknikler, flow sitometri veya immünolojik markerların ölçüldüğü tekniklerden daha düşük değildir.

Moleküler sitogenetik teknikleri (FISH, İntefaz FISH, Hipermetafaz FISH(h.FISH)) çok sayıda hücrenin (> 500) analizine izin vermektedir. $1/10^3$ maling hücre yakalama hassaslığına sahiptir. Ancak bu tekniklerdeki yanlış negatiflik, relaps riski taşıyan hastalar için riskli olabilmektedir.

Bir çok merkez hassaslığı daha yüksek olduğu için MRD'lerin tesbitinde PZR yöntemini seçmektedir. 10^5 - 10^6 hücre popülasyonunda 1 maling hücre (teorik olarak) tesbit edebilme yeteneğine sahiptir.

Remisyonda görülen hücrelerde MRD'lerin belirlenmesi klinik relapsın tesbitinde önemli rol üstlenmektedir. Kemik iliği transplantasyonu sonrası hastanın izlenmesi, relapsın erken safhada yakalanması açısından çok önemli olmaktadır. Yine kemoterapi alan hastalarda remisyonun gerçek olup olmadığının tesbiti bu tekniklerin güvenilirliğine bağlıdır. Dolayısı ile MRD'nin tesbiti, hastalığın prognozunun izlenmesi ve relapsa girdiğinde tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir (tablo 2.3.1.5) (53, 37, 75, 13, 30,100,90, 14, 54, 104).

Tablo 2.2.1.5 MRD tesbitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

METOD	DUYARLILIĞI
FACS	%1-5
SİTOGENETİK	%1-5
FISH	$1/10^3$
SOUTHERN BLOTTİNG	%1-5
PZR	$1/10^5$ - 10^6

2.3.1.6 KML'Lİ OLGULARDA UYGULANAN TEDAVİ YÖNTEMLERİ

KML' li hastaların tedavisinde bugün için kullanılan 3 farklı yol bulunmaktadır

Bunlar ;

- 1 – Konvensiyonel ilaç tedavisi
- 2 – IFN α tedavisi
- 3 – Allogenik Kemik İliği transplantasyonu dur .

1 – Konvensiyonel İlaç Tedavisi; 1980'e kadar en yaygın olarak *hydroxyurea* ve *busulfan* kullanılmıştır. Özellikle kronik fazda maling hücrelerin gelişmesi tek bir ajan ile baskılanmaktadır. Kullanılan bu ajanlar hem alkileyici hemde antimetabolittir. Genellikle granulositozis ve trombositosisi kontrol etmektedir (16).

Busulfan, hastalığın uzun peryodlarla kontrol altına alınmasını sağlamakla beraber, hastalığın %10 yada daha azında myelosupresyon, akciğer, kalp ve kemik iliği gibi organların fibrozisi ve Addison's like hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kemik iliği transplantasyonu (KİT) için uygun olmayan hastalarda daha sıklıkla kullanılmaktadır.

Hydroxyurea, KİT için aday olan hastalarda tercih edilmektedir. Çünkü daha tolere edilebilir toksik profili olduğu bildirilmiştir (43). Bu hastaların %90' nında bu semptomlar bu ilaçlarla kontrol altına alınır, ancak hastalığın ilerlemesi önlenememektedir (52).

2 – IFN α Tedavisi; Interferonlar hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Bu nedenle de kanser hücrelerinin proliferasyonunu bozdukları bilinmektedir. Son yıllarda tedavi edici bir ajan olarak görülmektedir. Proteinlerdeki aminoasit dizilerine bağlı olarak 3 sınıfta toplanmaktadır. Sınıflandırma, interferon α (IFN α), interferon β (INF β) ve interferon gamma (IFN γ) şeklinde yapılmaktadır. Alfa ailesi en geniş ve en değişken gruptur. Yaklaşık olarak 20'den fazla çeşidi bulunmaktadır (41). Interferon α tedavisinin diğer tedavi protokollerine göre daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Kronik fazdaki hastalarda kullanıldığında tam bir hematolojik cevabın %70, sitogenetik cenabın da %40 oranında olduğu bildirilmektedir. Konvansiyonel ilaç tedavisi ile karşılaştırıldığında inteferon tedavisinde hastaların yaşam sürelerinin ortalama 20 ay uzadığı görülmekle birlikte etkili bir tedavi yaklaşımı olmakla beraber bu konudaki araştırmalar devam etmektedir (45,43, 87, 52).

3 –Allogenik Kemik İliği Nakli; KML'de özellikle kronik fazda uygulandığında tedavi edici olmaktadır. Ancak kemik iliği nakli (KİT) riskli bir uygulama olduğu için tartışılmaktadır. Her hastaya uygulanamamaktadır. Özellikle ;

- Genç hastalarda uygulandığında,

- Erken kronik fazda uygulandığında,
- Hasta busulfan tedavisi almamışsa, başarılı sonuçlar alınmaktadır (43). KİT sonuçları hydroxyurea yada inteferon tedavisi ile karşılaştırıldığında, ilk 18 ay da KİT yapılan hastaların yaşam süreleri daha kısadır, 18 ile 56 ay arasında da benzer sonuçlar alınmaktadır. Fakat özellikle 56 aydan sonra alınan sonuçlar daha iyi olmaktadır (87).

2.3.1.7 KML OLGULARINDA KULLANILAN TANI YÖNTEMLERİ VE KLİNİK UYGULAMALAR

Sitogenetik analiz, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemleri KML olgularında kullanılan ve birbirini tamamlayan tanı yöntemleridir.

2.3.1.7.1 SİTOGENETİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

Yaşayan ve çekirdeği olan, bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokular kromozom çalışmalarında kullanılabilir. Perifer kanı lenfositleri, deri, kemik iliği, amniyositler ve koryon villi hücreleri invitro olarak laboratuvar koşullarında en çok kullanılan dokulardır. Sitogenetik çalışmalar için gerekli olan metafaz kromozomlarının eldesinde temel olarak, iki farklı yöntem kullanılmaktadır ;

1 – Direkt Yöntem: Kemik iliği hücreleri ile sitotrofoblastlar gibi spontan mitotik aktivitesi olan dokularda uygulanabilmektedir.

2- Kültür Yöntemi: Perifer kanı, amniyositler, gonad dokusu ve deri fibroblastlarından ancak kültür edilerek kromozom elde edilebilmektedir. Bu amaçla medyum adı verilen protein, vitamin, hormon ve minerallerle zenginleştirilmiş ortamlar kullanılmaktadır.

Postnatal kromozom anomalilerinin saptanmasında kullanılan perifer kanı lenfosit çalışmalarında, kullanılacak besi yerine normal şartlarda bölünmeyen lenfositleri uyatarak, mitozaya sokmak için Phytohaemagglutinin (PHA) eklenmektedir (Moorhead ve ark. 1960). Perifer kanı lenfositleri için ideal kültür süresi 72 saattir. Uzun süreli kültürlerde ise bu süre daha uzun ve dokuya özeldir. Hücre kültürlerinde

kolşisin (colsemid) ilave edilerek iğ iplikçiklerinin protein yapısı bozulmakta ve mitoz metafaz evresinde durdurulmaktadır. Böylece daha fazla sayıda metafaz elde edilmektedir. Hücre zarının yarı geçirgen özelliğinden yararlanılarak hacmini genişletmek için hipotonik solüsyon uygulanması ve hücrelerin fiksasyonu ile daha kaliteli metafazlar elde edilmektedir. Bundan sonraki adım kromozomların bantlama teknikleri ile tek tek tanınip sayısal ve/veya yapısal bir anomalinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

Metafaz kromozomları konvansiyonel yöntemle düz olarak boyanarak ancak sayısal anomaliler ile özgün olmayan büyük yapısal anomaliler görülebilmektedir.

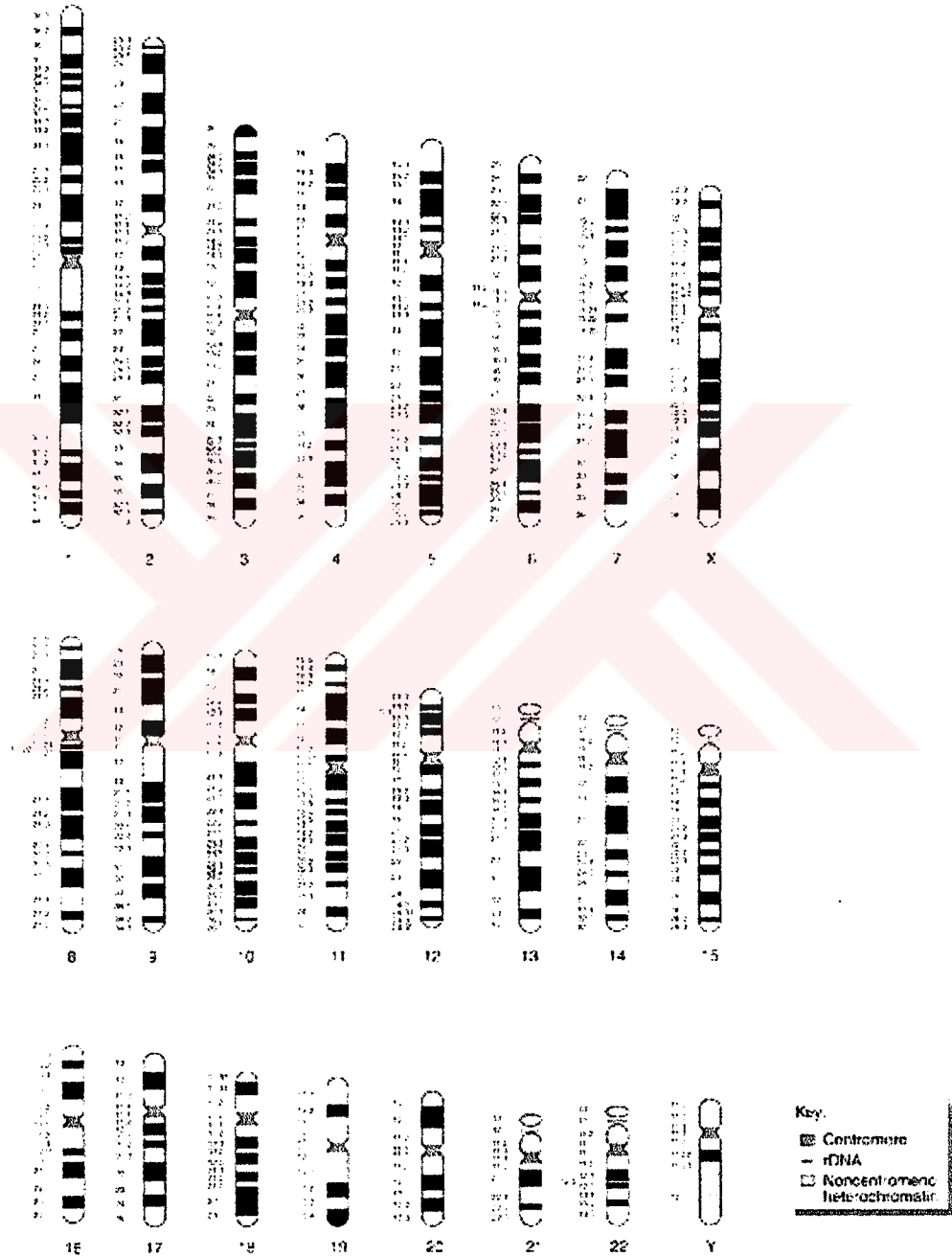
Kromozomlarda daha ayrıntılı tanıya gidebilmek için bantlama yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Uygulanan bantlama yöntemleri GTG/GTL (Giemsa-Tripsin-Giemsa)/(Giemsa-Tripsin-Leishman); QFA (Quinakrin-Fluoresan-Atebrin); CBG (Centromer-Barium-Giemsa); RBG(Reverse-Brdu); NOR (Nukleolar Organiser Region); HRB (High Resolution Bantlama) ve SCE Yöntemi (Sister Chromatid Exchange:Kardeş Kromatid Değişimi) dur.

Bu tez çalışmasında GTL bantlama yöntemi uygulandığı için, sadece bu yöntem açıklanmıştır.

GTL (Giemsa – Tripsin – Leishman) Bantlama Yöntemi

Sitogenetik laboratuvarlarında en yaygın kullanılan bantlama tekniğidir. Yöntemde, kromozomal proteinler olan histonlar ve nonhistonlar tripsin ile denatüre edilerek açıkta kalan DNA'nın Adenin ve Timin bazlarınca zengin tekrarlarından oluşan bölgelerine Leishman'ın girmesi sonucu bu bölgeler koyu boyanmakta ve heterokromatin bölgeler olarak adlandırılmaktadır. Boyanmayan bölgeler ise ökromatin bölgelerdir ve yapısal genleri içermektedir. Yapısal kromozom anomalisi görülen olgularda anomali, ökromatin bölgede oluşursa fenotipin daha fazla etkilendiği bilinmektedir. Bu işlemden sonra her kromozom çiftine özgü açık ve koyu bantlar görünür hale gelmektedir. İlk kez 1971 yılında, Paris'te yapılan ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) konferanslarının 1995 yılındaki toplantısında kabul edilen sınıflandırmaya göre bantlı analizleri yapılmakta ve karyotip yazımında da aynı toplantıda standardize edilen yazım kuralları kullanılmaktadır (27, 60, 65). Şekil 2.3.1.7.1.1 de İnsan kromozomlarının G bantlama ile elde edilen idiogramı gösterilmektedir.

Bu sitogenetik analiz yöntemi ile genomun genel görünümü belirlenmektedir. Kullanım alanlarından birisi olan kanser genetiğinde de, hastalıkların tanısının konması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Tedavinin yanı sıra, hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal düzensizliklerin tesbitine imkan sağlamaktadır (52) .



Şekil 231711 İnsan kromozomunun G bantlı idiogramı.(38)

2.3.1.7.2 MOLEKÜLER SİTOGENETİK YÖNTEMLERİ

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin keşfedildiği 1970'lerin başlarında Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile moleküler sitogenetik yöntemlerinin ilk adımları da atıldı. Bu dönemdeki ilerlemelere ortam hazırlayan 3 temel gelişme ;

- 1- DNA'nın spesifik bölgelerinden restriksiyon enzimleri ile kesilmesi,
- 2- Saflaştırılmış DNA parçasındaki tüm nükleotidlerin dizilendirilmesi,
- 3- Nükleik asitlerin kendilerine komplementer olan diğer bir nükleik asit ile yani DNA-DNA, DNA-RNA yada RNA-RNA arasındaki hibridizasyonun gerçekleşmesi şeklinde sıralanabilmektedir.

Belirli bir hücre popülasyonu veya dokudan izole edilen nükleik asitlerin in vitro hibridizasyonu farklı DNA ve RNA gruplarının belirlenmesini sağlamakla birlikte, incelenen spesifik dizilerin hücreler arasındaki dağılımları yada kromozomlar üzerindeki yerleri hakkında bilgi verememektedir. Bunun için hibridizasyonun doku yada hücrede yapılması gerekmektedir. In Situ Hibridizasyon (ISH) adı verilen bu teknikte spesifik DNA veya RNA dizileri, doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nüvelerinde morfolojik olarak gösterilmektedir. In situ hibridizasyonu diğer hibridizasyon tekniklerinden ayıran bir özellik de nükleik asitlerin kendi doğal hücresel ortamlarında incelenmesidir (6).

Sitogenetik ile moleküler genetik arasında bir köprü oluşturan ISH, klasik sitogenetiğin önemli bir tamamlayıcısı olarak çok hızla gelişmiştir. Moleküler genetikteki ilerlemeler çok sayıda özgün DNA dizilerinin klonlanmasına olanak sağlamış ve bu sayede belirli bölgelere özgün tek iplikli DNA oligonükleotidleri (prob) elde edilmiştir. Bu problemlerin radyoaktif yada nonradyoaktif maddeler ile işaretlenerek DNA'nın uygun koşullarda komplementer oluşturma özelliğine dayanarak sitolojik preparatlar üzerinde, interfaz nükleuslarında yada metafaz kromozomlarında hibridizasyonu sayesinde bu özgün bölgeler görüntülenebilmektedir. Bu teknik gen lokalizasyonunda kullanıldığı gibi, bantlama teknikleri ile tanımlanamayan çok sayıda anormal kromozom çeşidinin (submikroskobik delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar) aydınlatılmasında vazgeçilmez bir teknik haline geldi.

Gall ve Pardue'nin 1969'da, işaretlenmiş 18+28S ribozomal problemlerini, *Xenopus laevis* nükleosundaki genlerle hibridize etmeleri, bu yöntemin başlangıç noktası olmuştur. Jones 1970'de fare satelit DNA'sını sentromerik heterokromatin bölgelere hibridize ederek ilk olarak DNA problemlerinin kromozomlar üzerinde görüntülenmesini başardı. Radyoaktif işaretlenmiş pek çok diğer tekrarlayan DNA dizileri ile bir çok türdeki hibridizasyon çalışmaları (Wimber ve Steffensen , 1970 ; Henderson ve ark. , 1972 ; Steffensen ve ark. , 1974 ; Gosden ve ark. , 1975 ; Szabo ve ark. , 1977 ; Yu ve ark. 1978 ; Elder ve ark. 1980 ; Burk ve ark. ,1985) bunu izledi. Tekniğin ilk geliştirildiği yıllarda henüz moleküler klonlama çalışmaları başlamadığından, daha çok ribozomal RNA türleri ve arka arkaya tekrarlayan DNA satelit dizilerinden yararlanıldı. Böyle diziler, kimyasal modifikasyonlarla direkt veya radyoaktif işaretlenebildi. Ancak radyoaktif maddelerle çalışmanın yarattığı güçlükler (maddenin yarılanma ömrü, otoradyografi süresinin çok uzun olması, çalışanlar üzerindeki radyasyon riski, atıkların problem yaratması, nükleustaki çok düşük bir sinyalin değerlendirilmesinde yetersiz kalınması gibi) nedeni ile yöntem yaygın bir şekilde kullanılamadı ve nonradyoaktif işaretleme moleküllerinin arayışına gidildi.

İnsan kromozomlarındaki kantitatif çalışmalar, Cote ve ark. tarafından 1980 yılında başlatıldı. İlk kez Gerhard ve ark. 1981'de alfa-globin genini 16. kromozomda, Malcom ve ark. ise beta globin genini 11. kromozomda gösterdiler.

Bu arada radyoaktif işaretleycilerin kullanıldığı ISH yöntemine alternatif olarak geliştirilen ve nükleik asit problemlerinin haptenler veya diğer işaretleyciler ile modifikasyonu ve bunu takiben florokrom enzim veya koloidal altın partikülleri ile deteksiyonundan oluşan Nonizotopik ISH (NISH) yöntemi daha çok uygulanır hale geldi.

1981 yılında Langer'in Nick translasyonu yöntemini geliştirerek gerçek anlamdaki ilk radyoaktif olmayan DNA işaretleme sistemini başarı ile uygulamasıyla çalışma süresi kısaldığı bu sistem dTTP'nin biotinlenmiş analogu biotin (dUTP) ile yer değiştirmesi esasına dayanmaktadır.

Biotin-avidin sisteminin bulunması, monoklonal antikor teknolojisindeki gelişmeler, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin, florokrom enzim yada koloidal altın gibi aracı moleküller ile belirgin hale getirilmesi ISH tekniğinin hassasiyeti ve güvenilirliğini arttırdı. Biotinin yanı sıra dioxigenin ve fluorescein ile de işaretleme yapılmaktadır. 1991 yılında fluorezanlanmış nükleotid analoglarının direkt ve indirekt ISH yöntemleri ile kullanılmaya başlanması ile Fluoresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) adı verilen yeni bir yöntem geliştirildi.

DNA'nın çift sarmal yapısı normal koşullarda stabildir, fakat ısı ve formamid gibi bazı maddelerle etkileşimi sonunda bu stabil yapının bozulduğu, iki DNA iplikçliğini bir arada tutan hidrojen bağları koparak tek zincir haline gelirken, eski koşullar yerine getirildiğinde ise iki iplikçğin hidrojen bağları tekrar birbirine bağlanmaktadır. FISH'teki temel prensip, işte bu DNA'nın komplementlerini oluşturabilme özelliğine dayanmaktadır. Nick translasyon metodu ile işaretlenmiş DNA'nın komplementlerini oluşturabilme özelliğine dayanmaktadır. Nick translasyon metodu ile işaretlenmiş DNA molekülü (prob), rutin sitogenetik yöntemlerle hazırlanmış preparat üzerindeki hedef DNA ile hibridizasyona sokulur ve probun hedef DNA üzerindeki sinyallerinin immünohistokimyasal boyalarla ortaya çıkarılarak izlenmesi sağlanır. Şekil 2317121 de in situ hibridizasyon protokolü ve prob DNA'sı ile hedef DNA'nın oluşturduğu hibrit moleküllerinin görüntülenmesi için gerekli bir dizi işlem gösterilmiştir.

FISH tekniğindeki gelişmeler her geçen gün yeni tekniklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. FISH tekniğinin kullanım alanları;

1-Tanısal amaçlı kullanılan FISH

2 -Araştırma amaçlı kullanılan FISH olmak üzere ikiye ayrılabilir.

1-Tanısal Amaçlı Kullanılan FISH;

- Klinik sitogenetik
- Prenatal tanı
- İnterfaz sitogenetiği
- Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
- Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısı
- Kanseri sitogenetiği
- Dokuda mRNA düzeyinde onkogenlerin değerlendirilmesi

2 – Klinik Amaçlı Kullanılan FISH;

- Gen haritalaması
- Tümör biyolojisi
- Mikrobiyoloji / Viroloji
- Gen ekspresyon analizi
- Somatik hücre hibrit analizleri
- Mayoz / Mitoz analizleri
- Hücre tanımlaması

İn situ hibridizasyonda sistemin duyarlılığı hedef dokunun geçirgenliği, görüntüleme tekniği ve probun özelliklerine bağlıdır (6, 46).

Bu teknikte kullanılan proplar elde ediliş kaynaklarına ve sitogenetikte kullanım alanına göre gruplandırılmaktadır.

Elde ediliş kaynaklarına göre şu şekilde isimlendirilirler ;

- Plazmid propları
- Cosmid proplar
- Yac proplar
- PZR proplar
- Somatik hücre propları
- Sentetik oligonükleotid proplar
- Flow sitometri

Sitogenetikte kullanım alanında 4 farklı prob çeşidi bulunmaktadır. Bunlar;

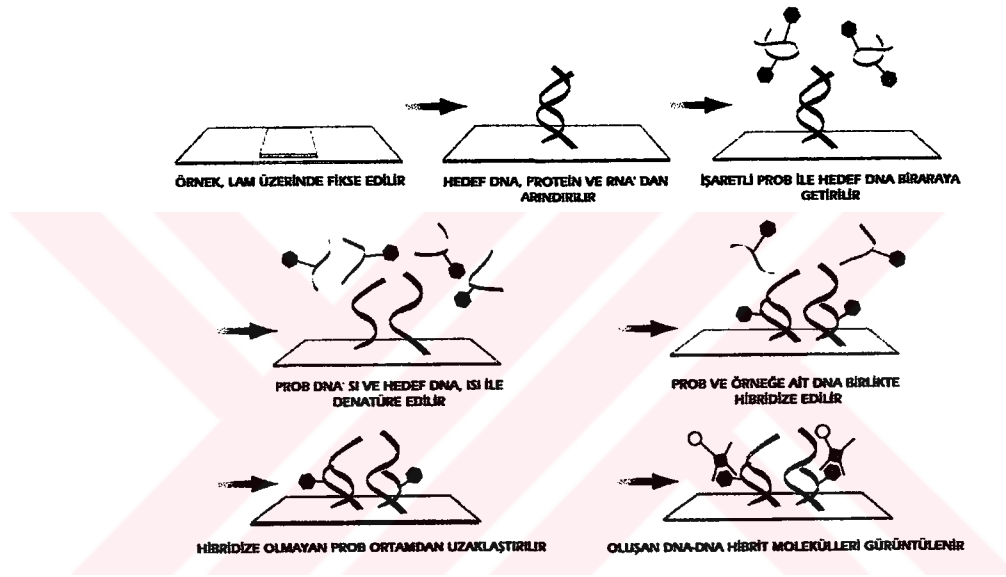
Tekrarlayan Dizi (Satellit) Propları: Kromozomların sentromerik ve perisentromerik bölgelerinde yer alan satellit DNA'ları α satellit , β satellit ve diğer satellit DNA'larını içermektedir. Alphoid DNA dizilerinin kromozomlara özgü tek olmaları nedeni ile kromozomların pek çoğuna özgü klonlanan sentromerik proplar metafaz kromozomlarında kullanıldığı gibi interfaz nükleuslarında da yoğun sinyal verebilmektedir.

Bu proplar, anöploidilerin tanısında, tüm kol ve Robertson tipi translokasyonlarında sentromer değerlendirmelerinde, marker ve ring kromozom orjinlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Lokusa Özgü Proplar; Klonlanmış genlere özgü dizileri içeren bu proplar, ilgili kromozoma ilişkin sayısal düzensizlikler, ilgili bölgeyi içeren yapısal düzensizlikler ve mikro delesyon sendromlarının tanısında kullanılmaktadır. Plazmid, faj, YAC, kozmid klonları ile oligonükleotidler lokusa özgü proplardır.

Tüm Kromozom Boyama (Painting) Proplar; Bu proplar ile ilgili kromozom tümüyle boyanmaktadır. Plazmid, YAC, somatik hücre hibritleri ve flow sorted kromozom kütüphanelerinden elde edilen proplar kullanılmaktadır. Translokasyon değerlendirmelerinde, marker ve ring kromozom incelemelerinde kullanılmaktadır.

Banda Özgü Problar; Şüpheli görülen ve spesifik probun olmadığı durumlarda kullanılmaktadır. Bu yöntemde ilgili kromozom parçası kesilerek çıkartılır. PZR ile çoğaltılarak, prob haline getirilir ve normal metafaz kromozomları ile hibridize edilir. Özellikle kriptik dengesiz translokasyonlarda terminal delesyonların saptanmasında uygulanmaktadır (86).



Şekil 2.3.1.7.1.2.1 İn situ hibridizasyon protokolünün şematik olarak gösterilmesi (6)

KANSER GENETİĞİNDE FISH

Tanı amaçlı kullanılan FISH tekniğinin kullanım alanlarından birisi de kanser genetiğidir.

Bilindiği gibi neoplazilerin başlaması ve gelişmesi ile bazı genetik değişikliklerin ilişkili olması, kanser sitogenetiğinin önemini arttırmıştır. Ancak özellikle solid tümörlerde metafaz kromozomlarının elde edilmesinin zor olması,

buna karşılık FISH tekniğinin interfaz nükleuslarında da kullanılabilmesi bu yöntemin kanser sitogenetiğindeki önemini artırmıştır.

Özellikle hematolojik kanserlerde gözlenen ve tesadüfi olmayan translokasyonlar, tanının konması ve prognozun izlenmesi açısından yol gösterici olmaktadır. Bu tekniğin kullanıldığı alanlara en iyi örnek KML hastalarında 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon t(9; 22) sonucu oluşan bcr-abl füzyon geninin, uygun translokasyon probu ile gösterilmesidir.

Lösemilerde, genellikle kemik iliği preparasyonlarında yapılan karyotipik analizlerde, her zaman yeterli sayıda ve kalitede metafaz plakları elde edilememektedir. Klasik sitogenetik tekniklerinin yetersiz kaldığı böyle durumlarda FISH tekniği bu zorlukları ortadan kaldırmaktadır. FISH tekniğinin, lösemilerde kullanım amaçlarını şu şekilde sıralıyabiliriz (1);

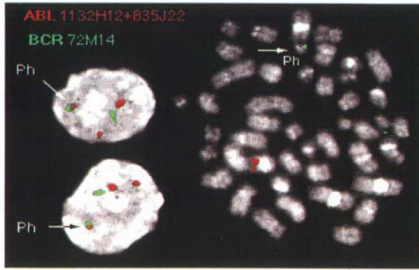
- Lösemi tipine ait karyotipik yapıyı (tanı amaçlı) belirlemek,
- Tedaviye paralel olarak karyotipik değişikliği izlemek,
- Klinik remisyon ile karyotipik remisyonun paralellliğini tesbit etmek,
- Hastalığın relapsında, karyotipik değişikliği belirlemek,
- KİT sonrası, hastanın kemik iliğinde oluşan hücre popülasyonunun tesbit etmek,
- Hücre tiplerini belirliyerek lösemi tipine ait immünofenotipleme yapmak.

FISH analizi, klasik sitogenetik analizlerine ek olarak kullanılmaktadır. Geçmişte çeşitli sayısal düzensizlikleri (+8, -7 ve +12 gibi) tesbit etmek amacı ile sentromerik proplar kullanılmıştır. Bu düzensizlikler interfaz nükleuslarında FISH tekniği (interfaz FISH) uygulayarak tesbit edilmiştir. Sitogenetik olarak normal bulgular alındığında yada uygun metafaz elde edilemediği için sonuç alınamadığı zamanlarda, eğer bir genetik düzensizlik varsa FISH tekniği ile gösterilebilmektedir. Bu nedenle de özellikle kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu sonrasında (alıcı ve vericinin farklı cinsiyetten olduğu zamanlarda) hastaların takibinde tercih edilen bir yöntem olabilmektedir. t(15;17) ve t(9;22) gibi translokasyonlara spesifik kosmid problemlerin geliştirilmesi ve kullanılması FISH tekniğinin lösemilerde tanının konması ve takibinde yer edinmesini sağlamıştır (52).

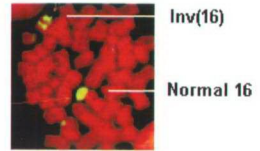
FISH ve onun varyantları olan interfaz FISH ve son yıllarda geliştirilen hipermetafaz FISH (hFISH) çok sayıda hücrenin (>500) analizine izin vermektedir (90). Hipermetefaz tekniğinde kısa süreli (30-60 dakika) colsemid uygulaması ile hücre kültürlerinde analiz için çok sayıda metafaz elde edilmektedir (85).

Tek renkli problemlerin kullanıldığı FISH tekniklerinin yerini bugün çok renkli problemlerin kullanıldığı teknikler (Multi color FISH) almıştır.

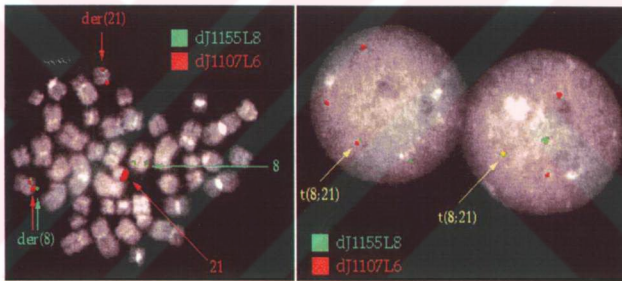
FISH tekniği ile KML'li hastalarda bcr-abl füzyon geninin interfaz hücreleri ve metefazlarda gösterilmesinde kullanılan proplar bir kaç tipte bulunmaktadır. İlk yıllarda farklı renklerde bcr ve abl DNA problelerinin kullanıldığı tek bir bcr-abl füzyon sinyalinin alındığı konvensiyonel FISH tekniğinden (S-FISH) yararlanılmıştır. Bu yöntem metefaz analizleri için yüksek uygunluk gösterirken, interfaz hücrelerinde aynı şey söylenememektedir. Çünkü bcr-abl sinyalleri normal hücrelerin %4'ünde üst üste görölmektedir (yanlış pozitiflik). Daha da öte bcr-abl füzyon sinyalleri bir çok Ph¹(+) hücrede tesbit edilememektedir (yanlış negatiflik). Çünkü S FISH'in füzyon sinyallerinin skorlanması subjektiftir. Bu tekniğin MRD' lerin tesbiti ve tedaviye cevap hastalarda çok düşük yüzdedeki Ph¹(+) hücrelerin belirlenmesindeki uygunluğu yeterli olmadığı için alternatif FISH yöntemleri geliştirildi. Bunlardan birisi de farklı renkte işaretlenmiş bcr ve abl problelerinin kullanıldığı ve t(9;22)(q34;q11.2) nin en yaygın kırık noktalarına spesifik ve translokasyonlu hücrelerde iki renkte bcr-abl füzyon sinyali veren D-FISH tir. Burada derivatif 9 numaralı kromozomda ve Ph kromozomunda da birer tane sinyal görölmektedir. D-FISH'te yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik oranı sıfırdır (19). Bir diğer yaklaşım da 3 renkli FISH tir. Çok düşük yanlış pozitiflik insidansı bulunur. bcr, abl ve ASS (kromozom 9'da abl'nin sentromerik bölgesindeki bir lokustur) spesifik üç farklı renkte 3 prob kullanılmaktadır. Özellikle MRD tesbitinde çok hassastır. Bazen Ph¹(+) hücrelerde, bcr ve abl sinyalleri vardır fakat hücrelerin duruş şekillerinden dolayı farkedilemezler ve bu durumda yanlış negatiflik söz konusu olmaktadır. Oysa aynı hücrelerin üçlü prob ve üçlü renk sistemi ile normal olarak skorlanması için, abl ve ASS sinyallerinin her ikisinde görölmesi gerekmektedir. Bu nedenle daha güvenilir olduğu kabul edilmektedir (88).



a



b



c

Şekil 2.3.1.7.1.2.1 Çeşitli Hematolojik kanserlerde gözlenen kromozom anomalilerinin FISH yöntemi ile gösterilmesi: a; t(9;21), b; inv(16), c;t(8;21) (39)

2.3.1.7.3 MOLEKÜLER GENETİK TEKNİKLERİ

Konvesiyonel sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda yada bu tekniklerle elde edilen sonuçların desteklenmesi için moleküler genetik yöntemlerine baş vurulmaktadır.

KML'li hastalarda, bcr-abl füzyon geninin gösterilmesini sağlayan bu teknikler kısaca anlatıldıktan sonra, bu tez çalışmasında kullanılan metod olan PZR ve RT/PZR tekniklerinden ayrıntılı olarak söz edilecektir.

1-Southern Blotting:

En yaygın kullanılan blotting tekniğidir. E.M. Southern tarafından geliştirilen, genlerin yapısının analiz edildiği güçlü bir yöntemdir. Bir yada bir kaç restriksiyon enzim ile kesilerek elde edilen DNA parçaları agaroz jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrıştırıldıktan sonra, jelden nitroselüloz filtre yada naylon membran üzerine aktarılır. Burada denatüre edilerek DNA iplikçiklerine ayrılır. Saflaştırılmış RNA, klonlanan bir cDNA yada kısa bir sentetik oligonükleotid olan radyoaktif işaretli proplarla hibridize edilerek, otoradyografi ile spesifik DNA dizileri belirlenir. DNA dizilerinin uzunlukları hakkında bilgi veren markerlarla karşılaştırılarak araştırılan genin uzunluğu ve miktarı belirlenmektedir (99).

bcr-abl füzyon geninin tesbitinde kullanılan Southern blotting tekniğinin, hassaslığı sitogenetik analiz yöntemi ile aynıdır. Normal hücre popülasyonunda %5 oranında maling hücre tesbit edilebilmektedir (90, 52).Translokasyona katılan genlerin her birinden elde edilen pobların aynı DNA parçası üzerinde hibridize olmasına dayanan bu tekniğin sonuçlanması için 10-14 gün gerekmektedir. Bu nedenlerle klinik kullanımı çok tercih edilmemektedir (13).

2-Northern Blotting:

RNA'yı analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Total RNA yada poly(A) RNA agaroz jelde boylarına göre ayrılır. Jeldeki bu RNA molekülleri filtre yada naylon membrana aktarılır. Uygun bir prob kullanarak tesbit edilmektedir (99). Spesifik bir hücredeki spesifik bir mRNA'nın uzunluk ve miktarının tesbitinde kullanılmaktadır.

KML'de spesifik 8,5kb.lık mRNA transkriptinin tesbitine imkan sağlamaktadır. Ancak araştırma laboratuvarlarında nadiren kullanılan bir yöntemdir (52).

3-m RNA'nın İn Situ Hibridizasyonu:

Hücredeki gen ekspresyonu çalışmaları için anlamlı olan bu metotta tek yada çift iplikli cDNA yada RNA probları işaretlenir ve hücre içinde hibridize edilir. Bu metod küçük bir hücre topluluğundaki bir genin transkripsiyonal aktivasyonunun tesbitine izin verdiği için Northern blotting ile analiz edilemeyen hücre popülasyonlarına uygulanabilmektedir (52).

4-Western Blotting:

P210^{bcr-abl} proteini bu yöntemle tesbit edilmektedir. Gel elektroforezinde ayrıştırılan proteinler jelden filtreye aktarılarak, İmmünoblotting adı verilen bir yöntemle işaretli antikorlar yardımı ile istenilen protein tesbit edilmektedir.

Ancak KML'de bcr-abl proteinlerinin tesbitinde yaygın kullanılmamaktadır. KML hastalarında olgun myeloid hücrelerindeki parçalayıcı enzimlerin yüksek aktivitesinden dolayı, perifer kandan elde edilen proteinin izolasyonu zordur. Bu metod KML tanısında kullanılırken, MRD 'lerin tesbitinde yetersiz kalmaktadır (52).

5-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

1980'lerin ortalarında Kary Mullis tarafından bulunan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sayesinde spesifik DNA dizisinin klonlanmadan çok sayıda kopyası elde edilmektedir. Bir DNA kaynağında bulunan hedef DNA dizilerinin hızlı ve çok yönlü olarak çoğaltıldığı invitro bir yöntemdir. Amplifikasyonlarda hedef dizinin yakınındaki bölgenin DNA dizisinin bilinmesi gerekir. Çünkü kullanılan iki primer de bu bölgelere bağlanmaktadır. Çok küçük miktardaki DNA, bu yöntem için yeterlidir. Başlangıçta kullanılan materyal çift iplikli DNA molekülüdür. İplikler ısıtılarak ayrılır, soğutularak primerlerin (15-20 nükleotid uzunluğunda) bağlanması sağlanır. Bir DNA polimeraz enzimi olan Taq polimeraz ile kalıp zincire komplementer zincir sentezlenmektedir. Böylece iki orjinal, ve iki yeni zincir oluşmaktadır. Bu olay birbiri üzerine katlanarak gider. Dört nükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) varlığında gerçekleşen bu zincir reaksiyonda yeni sentezlenen DNA iplikleri daha sonraki siklüslerde DNA sentezi için kalıp olacaktır. 30 siklüsten sonra hedef dizinin 10^5 kopyası elde edilmiş olacaktır.

PZR sırasında kullanılanTaq polimeraz ısıya dayanıklı bir DNA polimerazdır. 75°C'deki sıcak su kaynaklarında yaşayan Thermus aquaticus bakterisine aittir. Optimum 72°C'de çalışır ve 94°C'de bile stabil kalabilmektedir. Bu nedenle de PZR için tercih edilmiştir. Çünkü, her bir siklüs değişik suda 3 aşamadan oluşmaktadır.

1-Denatürasyon; 94°C'de 5 dakika sürer. DNA örneği denatüre olarak DNA ipliklerine ayrılır .

2-Primerlerin DNA ipliğine bağlanması; 30-65 °C'de 30 saniye sürer.

3-Yeni DNA ipliklerinin sentezi; 65-75°C'de 2-5 dakika sürer.

Bu siklüsler 30-60 kez tekrarlanmaktadır (91, 99). Bir çok merkez PZR tekniğini kullanmaktadır. $1/10^4$ - $1/10^8$ oranında tümör hücrelerini gösterebilmektedir. Nested PZR, Quantitative PZR, RT/PZR gibi farklı uygulama tipleri bulunmaktadır (90). Bu tez çalışmasında Reverse Transkriptaz/PZR (RT/PZR) tekniğinden yararlanılmıştır.

6-Reverse Transkriptaz/Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT/PZR) :

Özellikle mutasyon taramalarında kullanılan bu teknikle cDNA dizileri çoğaltılmaktadır. Çalışılacak dokudan mRNA izole edilir ve bu mRNA Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak PZR ile cDNA'ya dönüştürülür (79, 91). cDNA bundan sonraki PZR için kalıp görevi görmektedir. Bir grup araştırmacı RT/PZR adı verilen bu tekniği, KML hastalarında bcr-abl füzyon geninin tesbit ve izlenmesinde kullandı. Materyal olarak genellikle perifer kanı kullanılmakla beraber, kemik iliği aspirasyonu ile de çalışılmaktadır. Çalışılacak olan materyalden cDNA elde edilerek ilk sentez gerçekleştirilmektedir. Daha sonra PZR amplifikasyonu ile sadece bcr-abl füzyon cDNA dizilerinin amplifikasyonu sağlanmaktadır. Çünkü normal bireylerde exonlar ayrı ayrı kromozomlardadırlar ve ayrı transkriptleri bulunmaktadır. Ancak bcr-abl füzyonu gerçekleştiğinde RT/PZR için uygun hedef bölge oluşur ve amplifikasyon gerçekleşir (47). RT/PZR tekniğinin aşamalarını aşağıdaki gibi sıralıyabiliriz (92);

- Hücrelerden DNA ekstraksiyonu
- bcr-abl füzyon geninin mRNA'sının izolasyonu ve reverse transkriptaz enzimi ile hedef cDNA'nın sentezi
- Hedef cDNA'nın PZR ile çoğaltılması

Bu teknikle çok daha hızlı, hassas ve spesifik tetkikler yapılabilmektedir. RT/PZR tekniğinde amplifikasyon iki aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada bcr-abl translokasyon bölgesi çoğaltılır ve tekniğin hassasiyeti 10^3 normal hücrede 1 tane Ph¹(+) hücreyi bulabilecek şekildedir. Amplifikasyondaki ikinci aşamada ise bir set primer kullanılarak ilk set içindeki artış sağlanmaktadır. Bu şekilde hassasiyet daha da artarak 10^5 - 10^6 normal hücre içinde 1 tane Ph¹(+) hücre tesbit edilebilmektedir (21, 42, 57).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 ÖRNEK

Bu çalışma KML ön tanısı yada kesin tanı konulan İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hematoloji servisinde merkezimize sitogenetik analiz yapılması için başvuran 52 olgu ile yapıldı. Bu olguların 48'inden sitogenetik analiz yapmak amacı ile kemik iliği aspirasyon ve RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonunun saptanması için perifer kanı, 4' ünden ise her iki yöntemi uygulamak için sadece perifer kanı alındı. Alınan perifer kanlarının 72 saatlik lenfosit kültürlerinin yapılması gerektiği ve hafta sonları kültür çıkış işlemleri yapılamadığından, bazı olgularda da klinik nedenlerle kemik iliği aspirasyonu yapılan tüm hastalardan perifer kanı alınamadı. Sadece 26 olgudan aynı zamanda, sitogenetik analiz yapmak amacı ile perifer kanı da alınabildi.

Kemik iliği aspirasyonu ve perifer kanları, sitogenetik analiz yapmak için heparinli, bcr-abl füzyon geninin varlığının RT/PZR yöntemi ile araştırılması için ise EDTA lı alınarak çalışıldı. Sadece 2 olguda RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığının araştırılması için EDTA'lı perifer kanının yanısıra kemik iliği aspirasyonu da alındı. Ancak kemik iliği aspirasyonunun zor bir işlem olması ve RT/PZR yönteminin kemik iliğinde perifer kanında olduğu kadar iyi sonuç vermemesi nedeni ile RT/PZR yönteminin uygulanması için sadece perifer kanının alınmasına karar verildi.

Aynı zamanda hastaların kan ve kemik iliği aspirasyon örneklerinde FISH tekniği ile bcr-abl füzyonlarının varlığı gösterildi.

Böylece merkezimize başvuran olguların klinik örneklerinde 3 farklı yöntem ile bcr-abl füzyon geni araştırılarak, bu üç yöntem kıyaslandı.

Hastaların özellikleri tablo 3.1'de gösterildi. 21 erkek 31 kadın olgu ile çalışıldı. 14 olgudan bir defadan daha fazla tanı sonrası kontrol amaçlı olarak örnek alındı. 16-78 yaşları arasındaki olguların yaş ortalaması 42 dir. Olgu 2, 4 ve 20 dışındaki tüm hastalar tedavi öncesi merkezimize başvururken, olgu 2 ve 4 Allokit sonrası, olgu 20 ise relaps döneminde başvurdu.



Tablo 3.1 52 olgunun özellikleri

OLGU	YAŞ	SEX	GELİŞ SEBEBİ	ALINAN ÖRNEK		
				KEMİK İLİĞİ	KAN HEPARİNLİ	KAN EDTA'LI
Olgu 1	64	E	KML (Tanı ve takip)	+	+	
Olgu 2	36	K	KML (AlloKİTve Takip)	+	+	+
Olgu 3	26	K	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 4	26	K	KML (AlloKİTve takip)	+	+	+
Olgu 5	35	K	KML (Tanı)	+		+
Olgu 6	42	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 7	19	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 8	48	K	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 9	45	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 10	26	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 11	62	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 12	23	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 13	22	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 14	44	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 15	25	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 16	27	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 17	78	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 18	70	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 19	42	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 20	33	K	KML (Relaps)	+	+	+
Olgu 21	62	E	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 22	28	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 23	70	K	KML (Tanı)		+	+
Olgu 24	33	E	KML (Tanı)		+	+
Olgu 25	43	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 26	65	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 27	23	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 28	16	E	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 29	56	K	KML (Tanı)	+	+	+

Olgu 30	39	K	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 31	34	K	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 32	68	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 33	35	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 34	54	E	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 35	32	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 36	45	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 37	60	E	KML (Tanı ve takip)	+	+	+
Olgu 38	39	E	KML (Tanı)		+	+
Olgu 39	29	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 40	50	E	KML (Blastik dönüşüm)		+	+
Olgu 41	26	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 42	42	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 43	25	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 44	63	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 45	68	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 46	43	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 47	52	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 48	27	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 49	74	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 50	52	E	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 51	39	K	KML (Tanı)	+	+	+
Olgu 52	37	E	KML (Tanı)	+	+	+

3.1.2 ÇÖZELTİLER

3.1.2.1 Kemik iliği Aspirasyonu Direk Preparasyon ve Overnight Kültürü İçin Kullanılan Çözeltiler

Kültür Medyumu: 100 ml RPMI 1640 Medyum
20 ml Fetal Calf Serum (FCS)
2 ml (200 mM) L-Glutamin
0,2 ml (5000 IU) Penicilin
0,2 ml (0,01 gr.) Streptomisin

Hazırlanan kültür medyumu vidalı kapaklı kültür tüplerine 5'er ml olacak şekilde bölünerek kullanılacağı zamana kadar (-20°C'de) saklandı.

Direk Preparasyon İçin Kolsemid: 10µg/ml.' lik çözelti.

Over Night Kolsemid (ONC): Stok kolsemid (1mcg/ml):

1ml kolsemid
9ml RPMI 1640 medyum

ONC (0,02mcg/ml): 1mcg/ml stok kolsemid
5ml kültür ortamı

Hipotonik Çözelti: 0.075 M KCl çözeltisi

Carnoy Fiksatif: Metanol:Asetik asit (3:1)

3.2.1.2 Perifer Kan Kültürü İçin Kullanılan Çözeltiler

Kültür Medyumu: 100 ml RPMI 1640 Medyum
20 ml Fetal Calf Serum (FCS)
2 ml (200 mM) L-Glutamin
1,5 ml Phytohemagglutinin (PHA)

0,2 ml (5000 IU) Penicilin

0,2 ml (0,01 gr) Streptomisin

Hazırlanan kültür medyumunu vidalı kapaklı kültür tüplerine 5'er ml olacak şekilde bölünerek kullanılacağı zamana kadar (-20°C'de) saklandı.

Kolsemid: 10 µg/ml'lik çözelti.

Hipotonik Çözelti: 0,075 M KCl çözeltisi.

Carnoy Fiksatif: Metanol:Asetik asit (3:1)

3.2.1.3 GTL Bant Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Tripsin: 0,04 mg Tripsin 100 ml %9'luk NaCl çözeltisi (salin) içinde çözöldü.

Salin: %9'luk NaCl çözeltisi

Tampon: 0,025 M KH₂PO₄ çözeltisi (pH 6,8)

Leishman Boyası:

Stok çözelti: 0,3 gr Leishman boyası 200 ml metanol içinde, 70°C'de bir gece karıştırılarak çözöldü.

Kullanım çözeltisi: Boya çözeltisi:tampon (1:5)

3.2.1.4 Floresan İn Situ Hibridizasyon Çözeltileri

10x PBS (Phosphat Bufferd Saline):

80 gr NaCl

2 gr KCl

14,4 gr Na₂HPO₄

1000 ml dH₂O'da çözdürölüp, pH 7,2'ye HCL ile ayarlandı. 1:10 oranında sulandırılarak kullanıldı. Çözeltiler oda ısısında saklandı.

20xSSC (Standart Saline Citrat): 3 M NaCl
0,3 M Trisodyum Sitrata

1000 ml d H₂O'da çözdürölüp, pH 7'ye HCl ile ayarlandı. Otaklavlandıktan sonra oda ısısında saklandı.

2xSSC: 20xSSC' nin 1/10 dilüsyonu
(0,3 M NaCl, 0,03 M Tri sodyum sitrata)

%10 Tween 20 Çözeltisi: 10 ml Tween 20 (Sigma P-1379) dH₂O ile 100ml' ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

4xSSC / %0,5 Tween 20: 5 ml %10'luk Tween 20 çözeltisi
20 ml 20xSSC
d H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanarak ve oda ısısında saklandı.

RNAse A:
Stok çözelti: 10 mg/ml RNAse A
Kullanım çözeltisi: 1µl RNAse A stok çözeltisi
9µl 2xSSC

Preparat başına uygulandı.

Pepsin: 10gr Pepsin
100 ml dH₂O₄ içinde çözülerek , -20°C'de saklandı.

%70'lik Formamit/2xSSC: 175 ml Formamide
25 ml 20xSSC
d H₂O ile 250 ml' ye tamamlandı. pH 7'ye HCl ile ayarlandı.

%50'lik Formamit/2xSSC: 250 ml Formamide
50 ml 20xSSC
dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. pH 7'ye HCl ile ayarlandı.

%70'lik Ethanol

%90'lik Ethanol

%96'lik Ethanol

FISH Probları: İki farklı FISH probu kullanıldı.

M-bcr/abl (Major Breakpoint) Translocation DNA Probe (ONCOR):

İnterfaz nükleusları ve metafaz yaymalarında t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluşan Major bcr-abl füzyon genini iki renkli Fluoresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) ile tesbit eder.

bcr geninin (M-bcr) bölgesine spesifik digoxigenin işaretli DNA probu ile abl genine spesifik biotin işaretli probun karışımıdır. bcr lokusu kırmızı (rodamin), abl lokusu sarı yeşil (fluoresan) boyanır.

BCR/ABL1 D-FISH™ Translocation DNA Probe (ONCOR): İnterfaz nükleusları ve metafaz yaymalarında t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyon sonucu oluşan Major ve minör bcr-abl füzyon genini iki renkli FISH ile tesbit eder. Bu prob ile her iki derivatif 9 ve 22 numaralı kromozom da fluoresan füzyon sinyali verir. bcr ve abl1 genlerine spesifik direk işaretli problemlerin karışımıdır.

bcr probu kırmızı fluorokrom ve abl1 probu da yeşil fluorokrom ile direk işaretlenmiştir. bcr lokusu kırmızı, abl1 lokusu yeşil ve bcr-abl füzyon geni sarı renkte sinyal verir.

FISH problemleri (-20°C' de) saklanır.

Deteksiyon ve Amplifikasyon Kitleri:

Rhodamine işaretli Anti-Digoxigenin

Fluorescein işaretli Avidin

Rabbit Anti-sheep antikoru

Rhodamine/Anti-Rabbit antikoru

Anti-Avidin antikoru

Fluorescein-işaretli Avidin

Biotin-Digoxigenin Dual color detection kit

DAPI/Antifade (son konsantrasyonu 0,1µg/ml)

DAPI/Antifade (-20°C'de), diğer kitler ise (+4°C'de) saklanır.

3.2.1.5 Reverse Transkriptaz/Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çözeltileri

Lenfosit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

Histopaq (Sigma1077) (+4°C'de saklanır.)

1xPBS (oda ısısında saklanır.)

mRNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

β Mercaptol etanol

2M NAOAC (Sodyum Asetat) (pH4)

Fenol

Chloroform/Isoamyle alkol (24:1)

t RNA solüsyonu

%100'lük etanol

%70'lik etanol

RNA sinli su

Denatürasyon çözeltisi

Denatürasyon Çözeltisi: 4M GIT

0,025 Na-sitrat

0,5M Sarkozil (%10'luk)

Na-Sitrat sitrik asit ile pH:7'ye ayarlandı.

bcr-abl Füzyon Geninin cDNA'sının Eldesinde Kullanılan Çözeltiler

10 x AMV buffer

d NTP

MgCl₂

RNA sin

AMV

Abl3

Hepsi (-20°C'de) saklanır ve buz üzerinde çalışılır.

%2'lik AgaroZ Jel Elektroforezi Tamponları

10xTEB (Tris-Borat Tamponu): 0,8M Tris
0,02M EDTA
0,97M Borik asit

pH:7,4 olacak şekilde borik asitle ayarlanır.

6xYükleme tamponu: %0,25 BİB (bromo fenol blue)
%40 Sucrose

3.2 YÖNTEM

Çalışma, İstanbul Üniversitesi, Genetik ve Teratoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (GETAM) Sitogenetik ve Moleküler Genetik laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmada kemik iliği aspirasyon örnekleri direk yada overnight kültür (ONC) yöntemi uygulanarak çalışıldı (94, 78). Perifer kan örnekleri ise, Moorhead ve ark. tarafından geliştirilen 72 saatlik kültür yöntemi (97) modifiye edilerek uygulandı. Hazırlanan preparatlar GTL bant yöntemi ile boyanarak, ISCN 1995'e (65) göre değerlendirildi. Ayrıca alınan EDTA'lı perifer kanı ve kemik iliği aspirasyon materyalleri RT/PZR yöntemi ve iki renkli probların kullanıldığı (M bcr-abl, Dual BCR-ABL-1 ,ONCOR) FISH tekniği kullanılarak moleküler sitogenetik teknikleri ile de bcr-abl füzyon genlerinin varlığı araştırıldı.

3.2.1 Direk Preparasyon

Heparinli kemik iliği aspirasyonu ile çalışıldı. 5 ml kültür medyumuna içine 0,1ml heparinli kemik iliği aspirasyonu ve 0,1ml kolsemid ilave edilerek, her hasta için iki tübe ekim yapıldı. Kültürler 37°C'lik inkübatörde 2 saat inkübasyona bırakıldı. İki saatin sonunda kültürler sonlandırılarak, kromozom eldesine geçildi. Bu yöntem *şekil 3.2.1de* şematize edildi.

Cuma günü gelen örnekler, kültür çıkışı işlemleri haftasonu yapılamayacağı için kültür yapılmayıp, direk preparasyon uygulandı.

3.2.2 Over Night Kültür

5 ml kültür medyumuna içine 0,1ml heparinli kemik iliği aspirasyon materyali ilave edilerek her hasta için iki tübe ekim yapıldı. Kültürler 37°C'lik inkübatöre yerleştirildi. Saat 16'da 0,1ml ONC kolsemid çözeltisi ilave edilerek tüpler gece inkübasyonu için yeniden inkübatöre kondu. Ertesi gün sabah *şekil 3.2.1'de*

anlatıldığı hipotonik şok, fiksasyon ve yıkama aşamalarından sonra, preparatlar yayıldı.

3.2.3 Perifer Kan Kültürü

5 ml kültür medyumuna içine 0,2 ml heparinli venöz (perifer) kanı ilave edilerek, her hasta için iki tübe ekim yapıldı. Kültürler 37°C'lik inkübatöre yerleştirilerek, 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Kültürün 70. Saatinde tüpler 0,1 ml kolsemid ilave edilerek, yeniden inkübatöre kaldırıldı. 72 saatin sonunda kültürler sonlandırılarak, kromozom eldesine geçildi. Bundan sonraki aşamalar *şekil 3.2.1*'de anlatıldığı gibi uygulandı.

Preparatların hazırlanması, yaşlandırılması, GTL bantlama ve FISH tekniğinin uygulanması kemik iliği ve perifer kanı lenfosit kültürlerinde aynı şekilde yapılmıştır.

3.2.4 Preparatların Hazırlanması

Lamlar temizlenip, yayma işlemi için hazırlandı. +4°C'den çıkarılan tüpler, santrifüj edilerek üst sıvıları atıldı ve bir kez Carnoy fiksatifi ile yıkandı. Santrifüj edilen tüplerin üst sıvıları atılarak, dipte kalan hücre pelleti üzerine bir kaç damla fiksatif ilave edildi. Lamlar %50'lik Carnoy fiksatifinden geçirilerek, 2-3 cm yükseklikten 2-3 damla pellet konuldu. Preparat üzerinden birkaç damla %50'lik Carnoy fiksatifi geçirilerek, havada kurumaya bırakıldı.

Preparatlar kuruduktan sonra 90°C'lik hot plate üzerinde 30 dakika bırakılarak, yaşlandırıldı.

1200 rpm devirde 7 dak Santrifüj ve supernatal atılımı



7 ml 0.075 M KCl (hipotonik solüsyon) ilavesi(vortex üzerinde)



20 dak 37°C' de inkübasyon



1200 rpm devirde 7 dak Santrifüj
ve üst sıvının atılımı



7 ml Carnoy fiksatif ilavesi (vortex üzerinde)
+4°C' de gece beklemesi



3 kez Carnoy fiksatif ile yıkama



preparatların yayılması

Şekil 3.2.1 Kültür sonrası kromozom eldesi

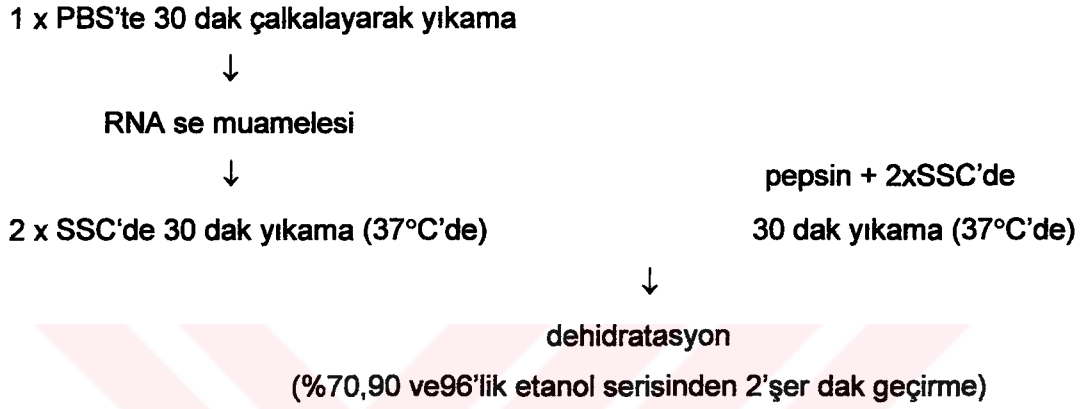
3.2.5 GTL Bantlama

Preparatlar tripsin çözeltisi içinde 2-15 saniye hafifçe çalkalanarak tutuldu (uygun süre her gün için yeniden denenerek saptandı). Daha sonra preparatlar sırasıyla salin ve tampon çözeltide yıkanarak, 3 dak. Leishman boyası kullanım çözeltisi ile boyandı. Akan suda çalkalanan preparatlar havada kurutuldu ve entellan ile kapatıldı.

3.2.6 Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Protokolleri

Hibridizasyonun yapılacağı gün preparatlar yayılarak, aynı gün işleme konuldu.

Preparatların Hazırlanması:Stoplazma sorunu olan olgularda, preparatlar RNase muamelesinden geçirildikten sonra FISH için hazırlandılar. Stroplazma sorununun giderilemediği bazı olgularda ise preparatlar pepsinle yıkanarak, hazırlandı. Bu nedenle her iki yöntem de verilmiştir (şekil 3.2.6.1).



Şekil 3.2.6.1 Preparatların FISH yöntemi için hazırlanması

Denatürasyon:Preparatlar ve kullanılan iki farklı prob ayrı denatürasyon protokolleri ile denatüre edildiler.

Preparatların Denatürasyonu: Preparatlar içinde 72°C'de ısıtılan %70 formamide/2 x SSC çözeltisi bulunan şale içinde 2 dakika tutuldu. Daha sonra -20°C' deki %70, 90 ve 96'lık etanol serisinden 2'şer dakika geçirilerek dehidrate edildi.

Probların Denatürasyonu: İki farklı bcr-abl translokasyon probu kullanıldığı için farklı iki denatürasyon protokolü uygulandı.

M-bcr/abl (Major Breakpoint) Translocation DNA Probu: 37°C'de 5 dakika tutularak denatüre edildi.

BCR/ABL1 D FISH Translocation DNA Probu: 37°C'de 5 dakika tutuldu. Ependorf tüpüne ayrılan prob 72°C'de 5 dakika denatüre edildi. Daha sonra 37°C'de 5 dakika tutularak hibridizasyona hazır hale getirildi.

Hibridizasyon: 10µl prob hedef alana konularak, 25x25mm'lik lamelle kapatıldı. Etrafı yapıştırıcı ile çevrelenip, nemli ve korunaklı bir kutuya konularak, 37°C'deki bir etüve kaldırıldı. Böylece gece boyunca hibridizasyonun devam etmesi sağlandı.

Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar: %50 formamide/2 x SSC önceden 43°C' ye, 2 x SSC' de 37°C' ye getirildi. Bir gece boyunca hibridize olan preparatların lamelleri çıkarılarak sırasıyla bu çözeltilerde yıkandı. Bu aşamadan (şekil 3.2.6.2) sonra sinyallerin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamalarda preparatların kurumamasına dikkat edildi.

%50 formamide/2xSSC 'de 3x5 dakika yıkama (43°C)



2xSSC'de 8 dakika yıkama (37°C)



4xSSC/%0.5 Tween 20'de 3 dakika yıkama

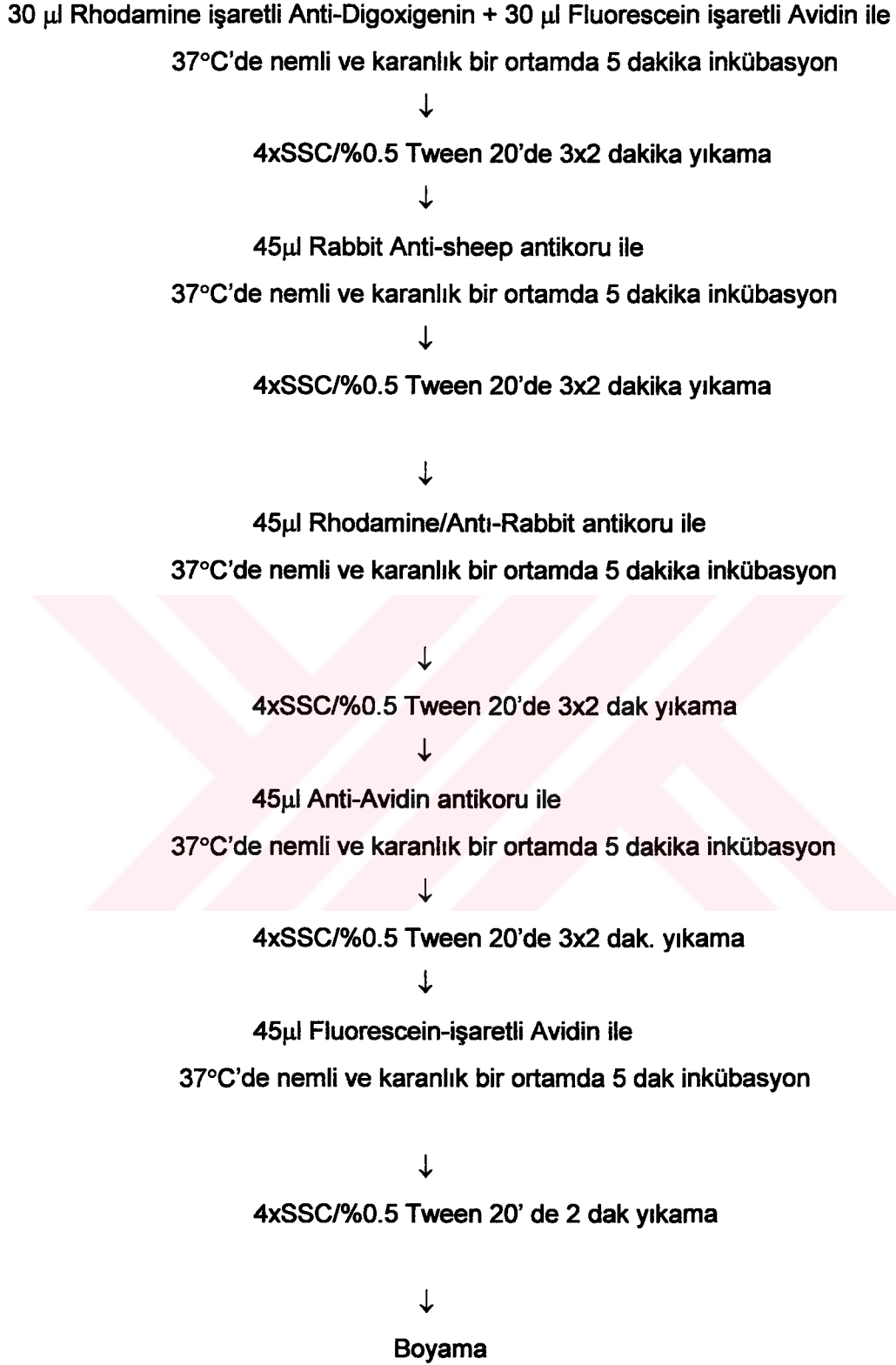
Şekil 3.2.6.2 Hibridizasyon sonrası yıkamalar

Deteksiyon ve Amplifikasyon: Bu aşama sadece M-bcr/abl (Major Breakpoint) Translocation DNA Probu için geçerlidir. BCR/ABL1 D FISH Translocation DNA Probu ise deteksiyonu önceden yapılmış, direk prob olduğu için bu aşama gerekmemektedir. Bu aşamada Rhodamine işaretli Anti-Digoxigenin ve

Fluorescein işaretli Avidin beraber kullanılarak ugulandı. Bazı olgularda daha hızlı ve pratik olan Biotin-Digoxigenin Dual color detection kiti kullanıldı. Her iki yöntemden de söz edildi (şekil 3.2.6.3, şekil 3.2.6.4).

Boyama ve Görüntüleme:

15µl DAPI/Antifade (son konsantrasyonu 0,1µg/ml) hibridizasyon bölgesine konarak, 25x25mm'lik lamelle kapatıldı. Preparatlar fluoresan mikroskobunda inceleninceye kadar +4°C'de karanlık kutu içinde saklandı. Fluoresan mikroskobunda DAPI/ FITCH/ Rodamine üçlü filtrede preparatın tüm yüzeyi kontrol edilerek, uygun metafazlar otomatik görüntüleme (PSI) sisteminde fotoğraflandı. Görüntüleme PRETAM genetik laboratuvarında yapıldı.



Şekil 3.2.6.3 Deteksiyon ve Amplifikasyon

60µl FITCH-Avidin/Rhodamine Anti-Digoxigenin antikorü ile

37°C' de nemli ve karanlık bir ortamda 5 dak. inkübasyon



4xSSC/%0.5 Tween 20' de 3x2 dak yıkama



Boyama

Şekil 3.2.6.4 Biotin-Digoxigenin antikorü ile deteksiyon

3.2.7 Mikroskop İncelemesi

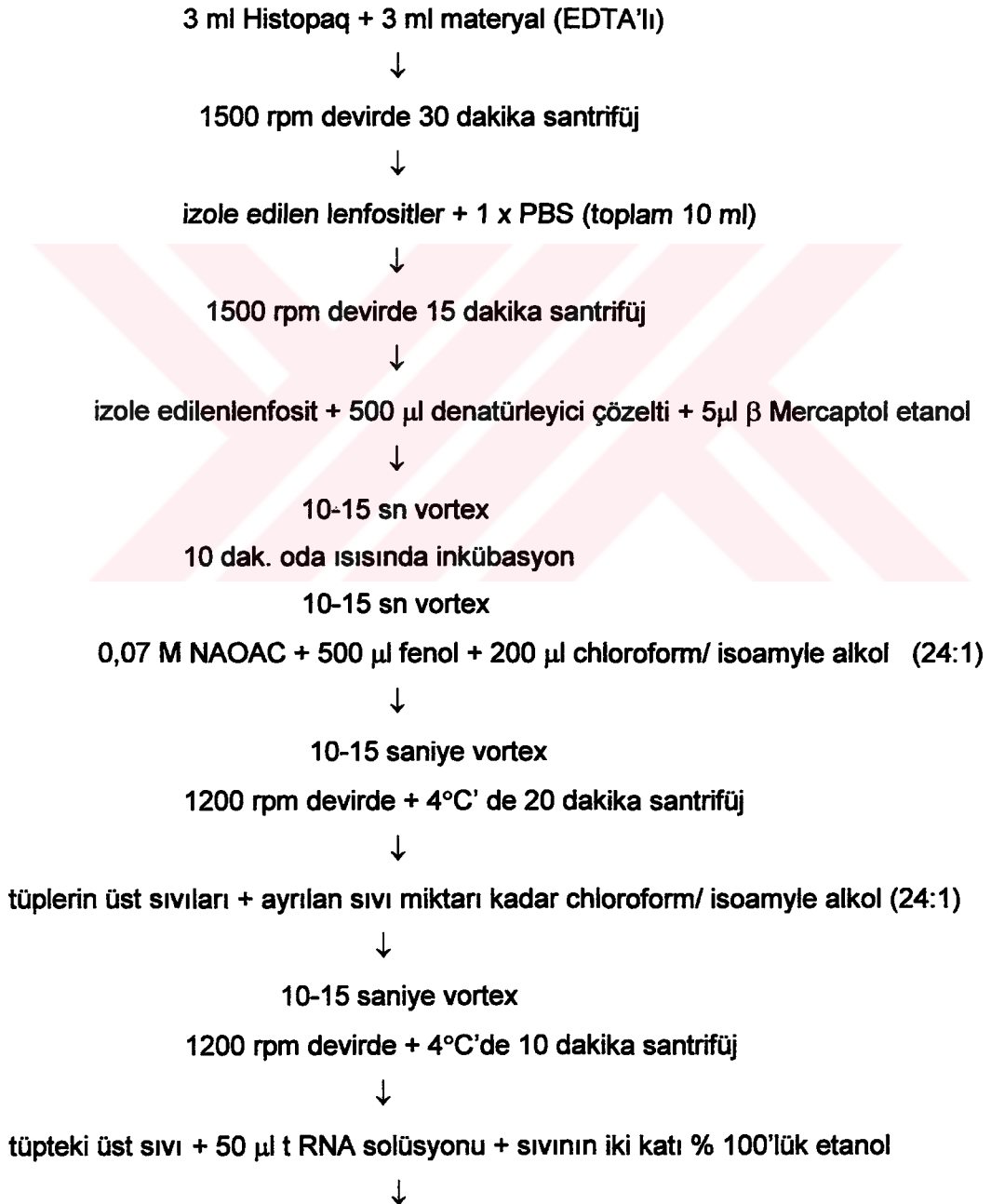
GTL bantlama yapılan preparatlar, Zeis Axioskop ve Olympus Bx50 ışık mikroskopunda x10'luk objektifle taranarak, değeriendirilecek metafazlar x100'lük immersiyon objektifi ile incelendi. Fotoğraflar aynı mikroskoptaki kamera ile, yeşil-siyah filtre ve AGFA ORTHO 25(15 DIN) film kullanarak çekildi. Film ve kartlar (Kentmere Photografic Paper 7x9¹/₂ in), Ilford Multigrade Developer ve Ilford Hypam Rapid Fixer ile prosedürlerine uygun olarak banyo edildi.

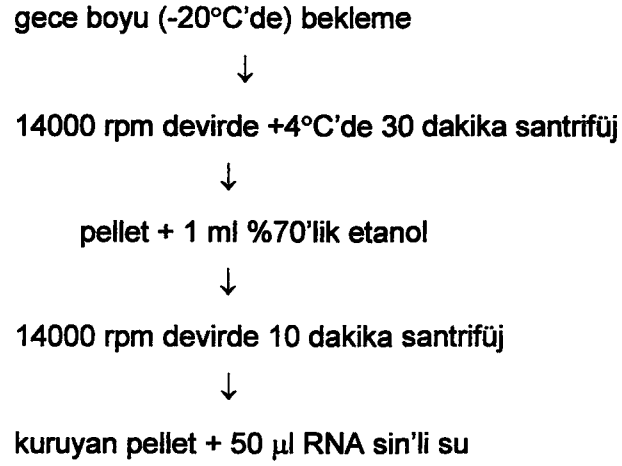
3.2.8 Lenfosit İzolasyonu

Alınan EDTA'lı perifer kanı ve kemik iliğı aspirasyon materyalinin, Ficoll Histopaque sedimantasyon gradyent yöntemi ile lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi ve m RNA izolasyonları yapılıncaya kadar (-20°C'de) saklandı (şekil 3.2.8.1).

3.2.9 m RNA İzolasyonu

Histopaq Ficoll sedimantasyon yöntemi ile ayrılan lenfositlerden, m RNA izolasyonu gerçekleştirildi (şekil 3.2.8.1de lenfosit izolasyonu ile birlikte gösterildi).





Şekil 3.2.8.1 Lenfosit ve m RNA izolasyonu

3.2.10 bcr-abl Füzyon Geninin c DNA Sentezi

Elde edilen m RNA'dan Reverse Transkriptaz yöntemi ile c DNA elde edildi.

Primer : abl geni exon a3' e spesifik Abl3 primeri kullanıldı.

Abl3 5' GGTACCAGGAGTGTTCCTCCAGACTG 3'

Reaksiyon ortamı:

- 2 µl 10 x AMV buffer
- 1 mM d NTP
- 5 mM MgCl₂
- 0,5 µl RNA sin
- 0,6 µl AMV
- 1 µl Abl3
- 10 µl m RNA

Toplam hacim: 20 µl

Döngü:	60 dakika	42°C	
	5 dakika	99°C	
	5 dakika	4°C	şeklinde
programlandı.			

3.2.11 c DNA'nın 1.PZR İle Amplifikasyonu

bcr- abl füzyon genini saptamak amacı ile aşağıdaki primer dizileri kullanılarak ilgili gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Reaksiyon 25µl'lik hacimde, 30 siklüste gerçekleştirildi. Reverse transkriptaz reaksiyonu ile elde edilen transkript PZR ile çoğaltıldı. bcr-abl translokasyonu oluşan örneklerde amplifikasyon gerçekleşti. Bu aşamada 10³ normal hücrede 1 tane Ph¹' li hücre tespit edilebilmektedir.

Primer: bcr geni exon b1'e spesifik NB1+ ve abl geni exon a3'e spesifik Abl3 primerleri kullanıldı.

NB1+	5' GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA 3'
Abl3	5' GGTACCAGGAGTGTCTTCTCCAGACTG 3'

Reaksiyon ortamı:	2.5 µl 10 x Taq buffer
	3mM MgCl ₂
	0.08 mM d NTP
	0.5 µl Abl3
	0.5 µl NB-1
	0.3 µl Taq polimeraz
	2.5 µl c DNA
	15.2 µl d H ₂ O

Toplam hacim:	25 µl
----------------------	-------

Döngü:

Başlangıç;	5 dakika	94°C
	1 dakika	94°C
	1 dakika	58°C
	1 dakika	72°C
Sonlanma;	10 dakika	72°C

Döngü sayısı: 30

III.2.12 2.PZR

Bu 2. aşama bir set primer kullanılarak, PZR ile 1 . amplifikasyon sonucu elde edilen bölge içinde ikinci bir çoğalma (nested PZR) sağlanır. Bu da bu tekniğin hassaslığını 10^6 normal hücrede 1 Ph^{+} hücreye çıkarmaktadır.

Burada 3 ayrı tüpte reaksiyon ortamı oluşturuldu. 1. tüp bcr-abl füzyon geni, 2. tüp pozitif kontrol, 3. tüp ise negatif kontrol için hazırlandı. Elde edilen ürünler %2'lik Agaroz gel elektroforezinde yürütüldü.

Primer: bcr genine spesifik B2A, abl genine spesifik CA3 primerleri kullanılarak bcr-abl füzyon geni tespit edildi (1.tüp). Amplifikasyon sonucu 456 bp'lik b3a2 veya 385 bp'lik b2a2 translokasyon ürünü elde edildi.

PZR reaksiyonunun pozitif kontrolü olarak CA3 A2 primerleri kullanıldı (2.tüp). Bu primerler 275 bp'lik PZR ürününü verir ve translokasyondaki abl bölgesinin dışındadır.

B2A	5' TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT 3'
CA3	5' TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'
A2	5' TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT 3'

Reaksiyon ortamı:	<u>1. Tüp</u>	<u>2. Tüp</u>	<u>3. Tüp</u>
	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl 10 x Taq buffer
	2 mM	2 mM	2.5 mM MgCl ₂
	2 mM	0.2 mM	0.2 mM d NTP
	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl CA ₃
	0.5µl	-	0.5 µl B ₂ A
	-	0.5µl	- A ₂
	0.3µl	0.3 µl	0.3 µl Tag polimeraz
	13.7µl	13.7 µl	13 µl d H ₂ O
	5 µl	5 µl	- çalışılan örnek
Toplam hacim:	25 µl	25 µl	20 µl

Döngü: 1. PZR da uygulanan program kullanıldı.

3.2.13 Agaroz Gel Hazırlanması ve Elektroforez İşlemi

%2'lik Agaroz çözeltileri 0.5 x TEB tamponu içinde kaynatıldıktan sonra 55°C' ye kadar soğutuldu. DNA'yı izleyebilmek için gele son konsantrasyonu 0.5mg/ml olacak şekilde etidyumbromür eklendi. Agaroz çözeltisi donmadan önce üzerine 1 mm kalınlığında 14 dişli tarak yerleştirilen 14 x 11.5 cm boyutlarındaki gel tabağına döküldü. Gel donduktan sonra içinde 0.5 x TEB tamponu bulunan yatay elektroforez tankına yerleştirildi.

Örnekler 6 x yükleme tamponları ile karıştırılarak, geldeki ceplere yüklendi. Elektroforez işlemi 100 V-120 V (35-90 mA)'da sürdürüldü. Marker olarak 100 bp lik DNA Ladder Marker kullanıldı. Her bir örnek 1. PZR, 2.PZR ve kontrol olmak üzere 3' er kuyucuğa yüklendi. Sonuçlar U.V. altında fotoğraf çekilmek suretiyle izlendi.

IV BULGULAR

Bu tez çalışmasına dahil edilen toplam 52 olgunun 48'inden sitogenetik analiz yapmak amacı ile kemik iliği aspirasyon ve RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonunun saptanması için perifer kan materyali alınırken, 4'ünden ise her iki yöntemi uygulamak için sadece perifer kan materyali alındı. Gereç ve yöntemler bölümünde açıklanan sebeplerden dolayı kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların 26'sından aynı zamanda, sitogenetik analiz yapmak amacı ile perifer kanı da alındı. Kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların tamamına, gereç ve yöntemlerin yöntem bölümünde anlatıldığı gibi direkt yada over night kültür (ONC) uygulandı. Ancak 39 olguda sitogenetik analizlerinin sonucu alınabildi. Kemik iliği aspirasyonu ile aynı zamanda perifer kan materyalleri de alınan 26 olgu ve sadece perifer kan materyali alınan 4 olgu olmak üzere, toplam 30 olguda, 72 saatlik perifer kanı lenfosit hücre kültürü yapılarak, sitogenetik olarak çalışıldı. Çalışılan olgularda Ph¹ kromozomu ile birlikte diğer kromozomal yapı ve sayısal düzensizlikler de araştırıldı. Bu olguların sadece 22 sinden sonuç alınabildi.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 21 olguda t(9;22), Ph(+) bulundu. Bu olgulardan 11'inin perifer kan lenfosit kültürlerinden, sadece 1 olguda t(9;22) gözlenirken, 2 olguda Ph(+)/Ph¹(-). Mosaizmi, 5 olguda Ph¹(-) tesbit edildi.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 16 olguda t(9;22) gözlenmediğinden Ph¹(-) olarak değerlendirildi. Bu olgulardan 9'u her iki materyalin de alındığı olgular olup, 7'sinin perifer kanı lenfosit kültürlerinde de Ph¹(-)'li hücreler tesbit edilirken, 2 olguda değerlendirilecek metafaz bulunamadı. Bu sonuçların dışında, tanı ve takip nedeni ile farklı zamanlarda olmak üzere 3 kez materyal alınan olgu 3'ün ilk kemik iliği aspirasyon materyalinde Ph¹(+) bulunurken, sonraki 2 materyalinde de Ph¹(-) bulundu. Üçüncü kemik iliği aspirasyonu materyali ile aynı zamanda alınan perifer kanı lenfosit kültüründe de Ph¹(-) sonuç alındı.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 2 olguda ve perifer kan lenfosit kültürü yapılan 2' si yukarıda anlatılan olmak üzere toplam 4 olguda Ph¹(+)/Ph¹(-) mosaizmi gözlemlendi.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan sadece 1 olguda endoredüplikasyon (end), bir olguda da premature sentromer ayrılması (pcd) gözlenirken, Ph¹ kromozomu açısından değerlendirilemedi.

9 kemik iliği aspirasyonu yapılan olgu ile 9 perifer kanı lenfosit kültürü yapılan olguda sitogenetik inceleme yapılabilecek hücreye rastlanılmadığından, Ph¹ kromozomu ve diğer kromozomal düzensizlikler açısından değerlendirilemedi. Bu olgulardan sadece 2'si aynı olgulardır.

Kemik iliği aspirasyonu ve perifer kanı lenfosit kültürü sitogenetik analiz sonuçları daha ayrıntılı bir şekilde *tablo IV.1* de, iki ayrı tablo haline getirilmiştir. Tablolar karşılaştırılırken kolaylık olması amacı ile tek başlık altında ve aynı sayfada gösterilmiştir



Tablo 4.1 Kemik iliği aspirasyon materyali ve perifer kanı lenfosit kültüründen elde edilen sitogenetik analiz sonuçları.

Kemik iliği aspirasyon materyali

Olgu	Metefaz Sayısı	Sitogenetik Bulgu
1 *	36	46,XY,t(9;22)[34]/ 46,XY[2]
**	15	46,XY,t(9;22)[15]
2 *	9	46,XX[9]
**	16	46,XX[16]
***	48	46,XX[37]/Polipliodi[11]
****	19	46,XX[19]
3 *	8	46,XX, t(9;22)[8]
**	30	45,XX,-12[3]/ 45,XX,-14[4]/ 46,XX[23]
***	1	46,XX[1]
4 *	20	46,XX[20]
**	20	46,XX[20]
5	19	36~46,XX, t(9;22)[15]/ 88~92,XXXX, t(9;22)x2[4]
6 *	9	46,XX, t(9;22)[9]
**	3	46,XX, t(9;22)[3]
7	15	46,XY, t(9;22)[11]/ 46,XX, add(4p), t(9;22)[4]
8*	50	46,XX, t(9;22)[50]
**	5	46,XX, t(9;22)[4]/end[1]
9	22	46,XX, t(9;22)[22]
10	3	End[3]
11	23	46,XX, i(17q)[15]/ 46,XX[2]/ poliploidi[4]/ end[2]
12	44	46,XX[30]/poliploidi[12]/ end[2]
13	2	46,XY, t(9;22)[2]
14	5	46,XY, t(9;22)[5]
15	14	45,XX,-17, t(9;22)[3]/ 45,XX, -21, t(9;22)[3]/ 46,XX, t(9;22)[6]/ end[2]
16	1	46,XY, t(9;22)
17	20	46,XX[17]/ poliploidi[3]
18	10	46,XY,add(18p)[4]/ 46,XY,del(12)(porq)[2]/ 46,XY,del(5)(q14q23)[2]/ klonal olmayan sayı ve yapısal düzensizlikler [2]

Perifer Kanı Lenfosit Kültürü

Olgu	Metefaz Sayısı	Sitogenetik Bulgu
1	5	46,XY,t(9;22)[1]/ 46,XY[3]/ end[1]
2		
****	20	46,XY[20]
3		
***	20	46,XX[20]
4 •		
5 •		
6 *	10	46,XX[10]
7 •		
8 •		
9 •		
10 •		
11 •		
12 •		
13 •		
14 •		
15 •		
16	18	46,XY[14]/ klonal olmayan sayı düzensizlikleri [4]
17 •		
18 •		

19	6	46,XX,t(9;22)[5]/ 46,XX[1]
20 *	-	-
**	1	46,XX, t(9;22)
21 *	16	46,XY[16]
**	8	46,XY[2]/ poliploidi [3]/ klonal olmayan sayı ve yapısal düzensizlikler [3]
22	2	pcd[2]
23 *		
24 *		
25	12	46,XX,t(9;22)[12]
26	14	46,XY,[14]
27	3	46,XX, t(9;22)[3]
28 *	-	-
**	-	-
***	-	-
29	11	46,XX[8]/ tetraploidi[3]
30 *	-	-
**	17	46,XX, t(9;22)
***	16	46,XX, t(9;22) [3]/ 43,X,-X,-8, 17, t(9;22)[1]/ 41,XX,-3, -9, -13, -15, -21, -22, t(9;22) [1]/ 46,XX [6] / pcd [5]
31*	7	46,XX
**	7	46,XX [5] 46,XX [4]/ klonal olmayan sayısal düzensizlikler[3]
32	-	-
33	20	46,XX[20]
34 *	-	-
**	17	46,XY,t(9;22)[13]/ klonal olmayan sayısal düzensizlikler,t(9;22)[4]
35	-	-
36	-	-
37 *	4	46,XY,t(9;22)[4]
**		
***	12	46,XY, t(9;22)[8]/ klonal olmayan sayı ve yapısal düzensizlikler ,t(9;22)[4]
38 *		
39	20	46,XX [20]
40 *		
41	-	-
42	11	46,XX,t(9;22)[11]
43	-	-
44	11	46,XY,t(9;22)[11]

19 •		
20 •		
21 *	2	46,XY[2]
**	7	46,XY[7]
22	12	46,XY,t(9;22)[7]/ 46,XY[5]
23 *	-	-
24 *	16	46,XY,t(9;22)[4]/ 46,XY[12]
25	-	-
26	17	46,XY[17]
27	20	46,XX[20]
28		
**	-	-
***	20	46,XY,del(5)(p14)[1]/ 46,XY[19]
29	-	-
30		
**	-	-
31 •		
32 •		
33	1	46,XX,del(18q)
34 *	3	46,XY, t(9;22)[3]
**	50	46,XY,t(9;22)[1]/ 46,XY [43]/ klonal olmayan sayısal ve yapısal düzensizlikler, Ph(-)[6]
35	6	46,XX
36 •		
37 *	1	46,XY,t(9;22)
38 *	6	46,XY[6]
39	20	46,XX[20]
40 *	-	-
41	30	47,XX,+21[1]/ 46,XX[29]
42	20	46,XX[20]
43•		
44•		

45	40	46,XX[20]/ 47,XX,+8[3]/ end [6]/poliploidi [1]
46	18	46,XY[11]/end[1]/ poliploidi[5]/ pcd [1]
47	2	35,XY,-3,-6,-7,-8,-10,-11, -16,-17,-18,-20,-20[1]/ pcd[1]
48	10	46,XX[10]
49	-	-
50	-	-
51	1	46,XX,t(9;22)[1]
52	-	-

45	20	46,XX[15]/ end[1]/ poliploidi [1]/ klonal olmayan sayı ve yapısal düzensizlikler [3]
46•		
47	-	-
48	21	46,XX[13]/ klonal olmayan sayı düzensizlikleri [8]
49	-	-
50•		
51	14	46,XX[14]
52	-	-

* Materyalin ilk alınışı

** " 2. "

*** " 3. "

**** " 4. "

* Bu olguda sadece perifer kanı alındı

• Bu olguda perifer kan lenfosit kültürü yapılmadı

end Endoredüplikasyon

pcd Premature sentromer ayrılması

Çalışılan 52 olgunun tamamından perifer kanı alınarak, RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığı araştırılmıştır. Bu olgulardan ikisinde aynı zamanda kemik iliği aspirasyonuna da bu yöntem uygulanmıştır. Ancak gereç ve yöntemde anlatılan nedenlerle diğer olgularda uygulanamamıştır.

Çalışılan olguların 49' undan sonuç alınırken, 3 olguda sonuç alınamamıştır. 31 olguda bcr-abl füzyon geninin varlığı bu yöntemle gösterilmiştir. 18 olguda ise bcr-abl füzyon geni tesbit edilmemiştir.

Çalışılan bu olguların RT/PZR sonuçları ile Ph¹(+) hücrelerin araştırıldığı sitogenetik analiz sonuçları karşılaştırılarak, Ph¹ (-) bulunan, ancak RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin tesbit edildiği olgulara bcr-abl füzyon genine özgü DNA problemlerinin kullanıldığı, FISH yöntemi uygulanarak bcr-abl füzyonunun bu yöntemle de gösterilmesine karar verilmiştir. 18 olguya FISH yöntemi uygulanıp, 13 olguda sonuç alınmıştır. Kemik iliği aspirasyonu yapılan 11 olguda FISH tekniği uygulanıp, bcr-abl füzyon geni araştırılmıştır. Sonuç alınan 8 olgunun 7' sinde bcr-abl füzyon genine özgü DNA problemleri ile füzyon sinyali tesbit edilirken, 1 olguda füzyon sinyali görülmemiştir. Perifer kan lenfosit kültürü yapılan 7 olguda FISH tekniği ile bcr- abl füzyon geni araştırılmıştır. Bu olgulardan 4'ünde bcr-abl füzyon geninin varlığı gösterilirken, bir olguda Ph¹(+)/Ph¹(-) sonuç tesbit edilmiştir. Ph¹(+) olgulardan 2' si kemik iliği aspirasyonu yapılan olgularla aynı olup, diğerleri farklı olgulardır.

Bu üç yöntemin uygulanması ile elde edilen sonuçlar, çalışılan materyallere göre iki ayrı tablo haline getirilerek, *tablo IV.2* de gösterilmiştir. Tablolarda sitogenetik analiz sonuçları, diğer yöntemlerle sadece bcr-abl füzyonunun varlığı gösterilebildiği için Ph kromozomu ile sınırlandırılmıştır. Tablolar karşılaştırılırken kolaylık olması amacı ile tek isim altında ve aynı sayfada yer almaktadır.

Tablo 4.2 Kemik iliği aspirasyon ve perifer kanı materyalinde üç farklı yöntem uygulanarak elde edilen sonuçlar.

Kemik iliği aspirasyonu

Olgu	Ph	RT/PZR	FISH
1 *	[34](+)/		
**	(-)[2]		
	(+)		
2 *	(-)		
**	(-)		
***	(-)		
****	(-)		
3 *	(+)		
**	(-)		
***	(-)		bcr-abl (+)
4 *	(-)		
**	(-)		
5	(+)		
6 *	(+)		
**	(+)		
7	(+)		
8 *	(+)		bcr-abl (+)
**	(+)		
9	(+)		
10	□		
11	(-)		
12	(-)		
13	(+)		
14	(+)		
15	(+)		
16	(+)		
17	(-)		bcr-abl (-)
18	(-)		
19	(+)		
20	(+)		
21 *	(-)		
**	(-)		
22	∇		
23 *			
24 *			
25 *	(+)		
26	(-)		
27	(+)		
28 *	∅	b ₂ a ₂	bcr-abl (+)
**	∅		
***	∅		
29	(-)		

Perifer kanı lenfosit kültürü

Olgu	Ph	RT/PZR	FISH
1 *	•		
**	[1](+) /	b ₂ a ₂	
	(-)[3]		
2 *	•		
**	•		
***	•		
****	(-)	(-)	
3 *	•	b ₂ a ₂	
**	•		
***	(-)	b ₂ a ₂	
4 **	•	b ₂ a ₂	
5	•	(-)	
6 *	(-)	b ₂ a ₂	bcr-abl (+)
**	•	b ₂ a ₂	
7	•	b ₂ a ₂	
8 *	•	(-)	
**	•	(-)	
9	•	b ₃ a ₂	
10	•	b ₂ a ₂	
11	•	(-)	
12	•	(-)	
13	•	b ₂ a ₂	
14	•	b ₂ a ₂	
15	•	b ₂ a ₂	
16	(-)	(-)	
17	•	(-)	
18	•	(-)	
19	•	b ₂ a ₂	
20 *	•	(-)	
21 *	(-)	(-)	
**	(-)	(-)	
22	[7](+)/	b ₂ a ₂	
	(-)[5]		
23	∅	(-)	
24	[4](+)/	b ₂ a ₂	
	(-)[12]		
25 *	∅	b ₂ a ₂	
26	(-)	(-)	
27	(-)	∅	
28 *	•	b ₂ a ₂	
**	∅		
29	∅	∅	

30 *	Ø		
**	(+)		
***	(+)		
31 *	(-)		bcr-abl (+)
**	(-)		
32	Ø		
33	(-)		bcr-abl (+)
34 *	Ø		
**	(+)		
***	(-)		
35	Ø		
36	Ø		
37 *	(+)		
**			
***	(+)		
38	*		
39	(-)		
40	*		
41	Ø		
42	(+)		
43	Ø		
44	(+)		
45	(-)		
46	(-)		
47	(-)		bcr-abl (+)
48	(-)		
49	Ø		
50	Ø		
51	(+)		
52	Ø	b ₂ a ₂	

30 *	•	b ₂ a ₂	
**	Ø		
***	•	b ₂ a ₂	
31	•	Ø	
32	•	b ₂ a ₂	
33	(-)	b ₂ a ₂	bcr-abl (+)
34*	(+)		
**	(+)[1]/	b ₂ a ₂	
	(-)[49]		
35	(-)	b ₂ a ₂	
36	•	(-)	
37 *	(+)	b ₂ a ₂	
38	(-)	b ₃ a ₂	bcr-abl (+)
39	(-)	(-)	
40	Ø	b ₂ a ₂	
41	(-)	(-)	
42	(-)	b ₃ a ₂	
43	•	b ₂ a ₂	
44	•	b ₃ a ₂	
45	(-)	b ₂ a ₂	bcr-abl (+)/(-)
46	•	(-)	
47	Ø	b ₂ a ₂	bcr-abl (+)
48	(-)	(-)	
49	Ø	b ₂ a ₂	
50	•	(-)	
51	(-)	b ₂ a ₂	
52	Ø	b ₂ a ₂	

* Materyalin ilk alınışı

** " 2. "

*** " 3. "

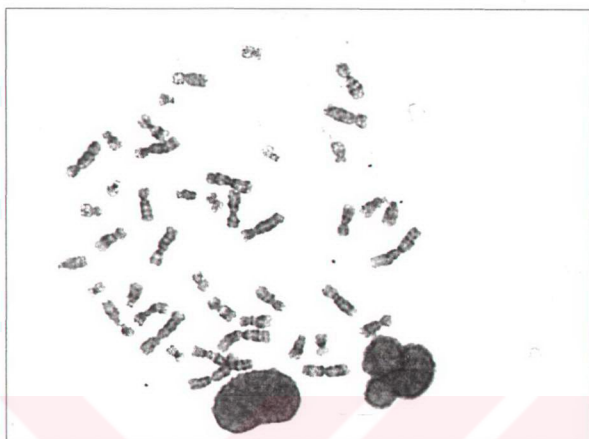
**** " 4. "

* Bu olguda sadece perifer kanı alındı

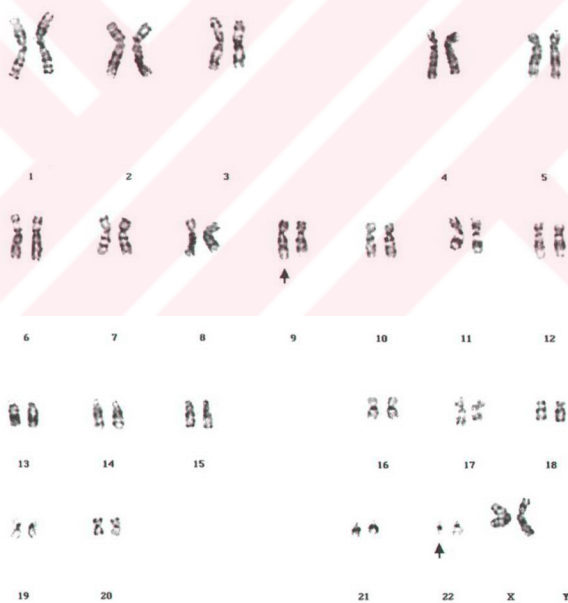
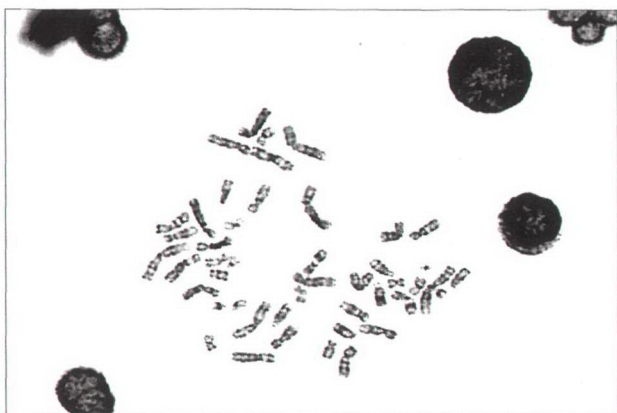
• Bu olguda perifer kan lenfosit kültürü yapılmadı

Ø Bu olguda sonuç alınamadı

□ / ▽ Bu olguda sadece endoreduplikasyon (end)/ pcd görüldü



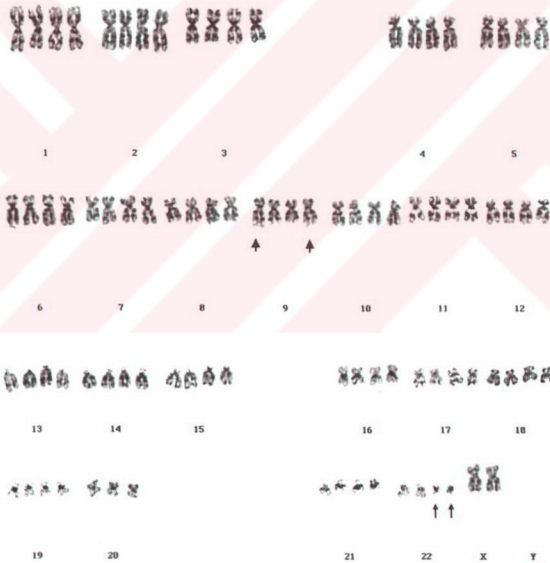
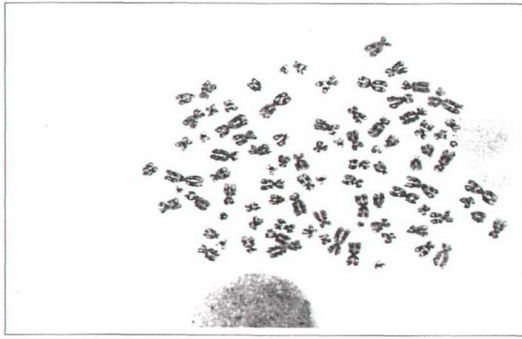
Şekil 4.1 46,XY karyotipine sahip bir olguya ait metafaz ve karyogram örneği



Şekil 4.2 $Ph^1(+)$ bir olguya ait metafaz plağı ve karyogram örneğı
46,XX,t(9;22)(q34;q11).



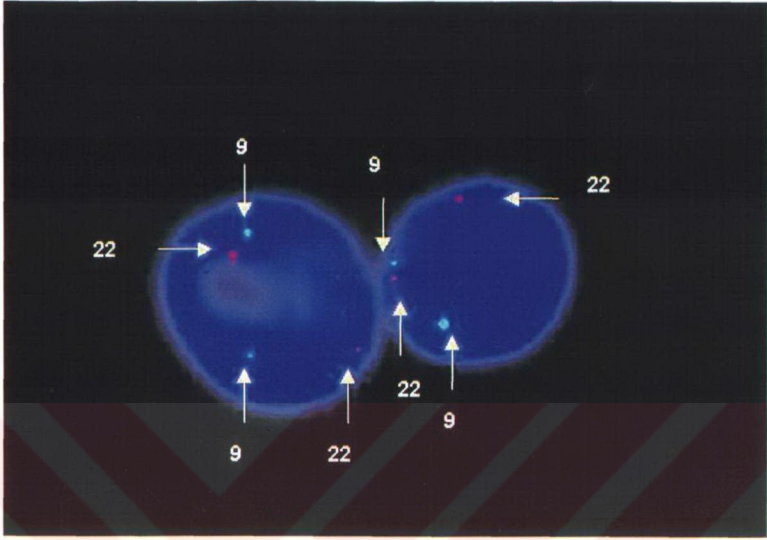
Şekil 4.3 Ph¹(+) bir olguya ait metafaz plağı ve karyogram örneğı
46,XY,t(9;22)(q34;q11)



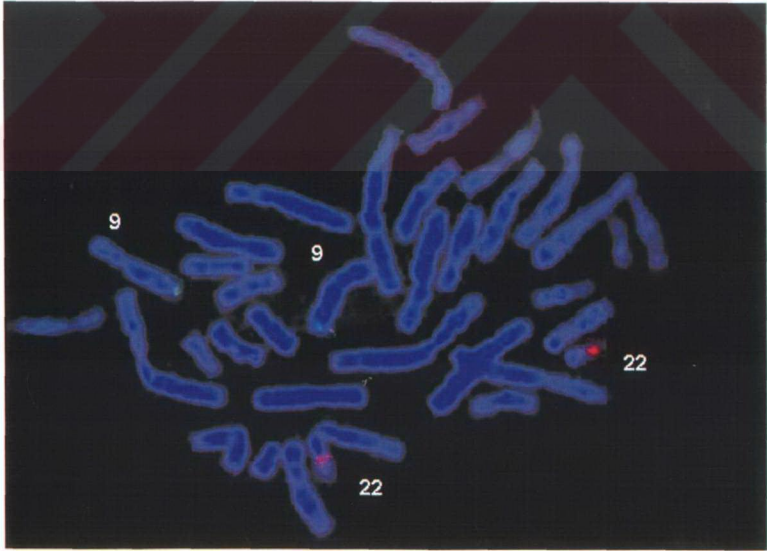
Şekil 4.4 $Ph^1(+)$ bir olguda tetraploid metafaz ve karyogram örneği
 88,XX,-X,-X,t(9;22)(q34;q22)x2,-20



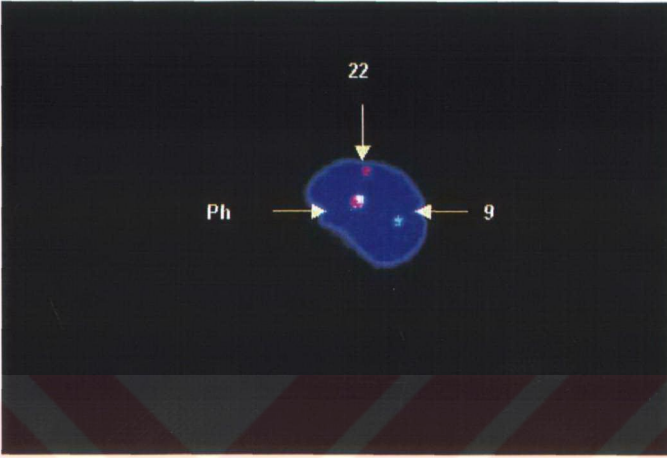
Şekil 4.5 Bir olguya ait endoreduplikasyon örneği



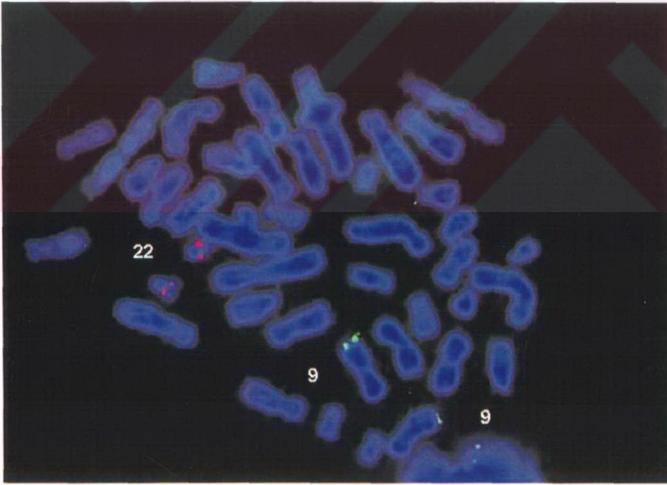
Şekil 4.6 FISH yöntemi uygulanan $Ph^1(-)$ bir olguya ait interfaz örneği



Şekil 4.7 FISH yöntemi uygulanan $Ph^1(-)$ bir olguya ait metafaz örneği

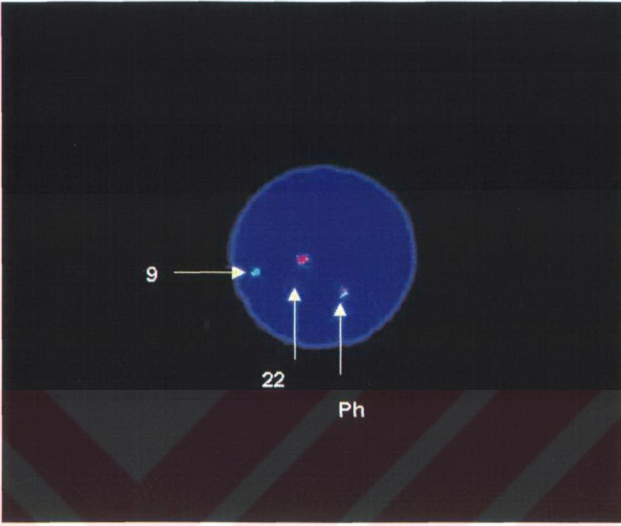


a

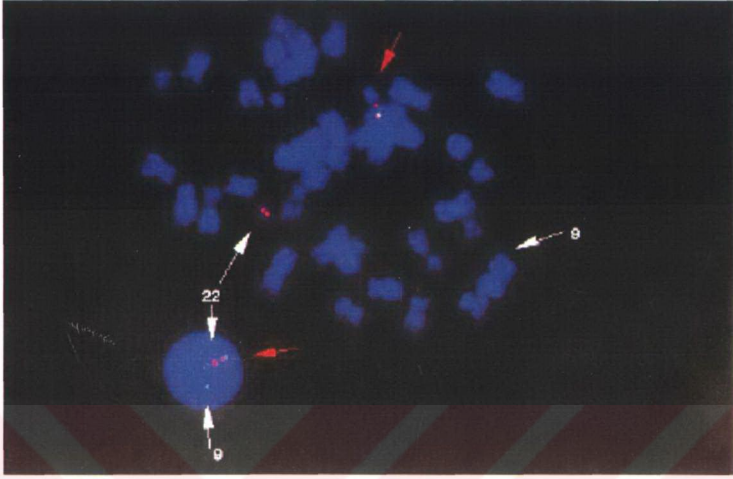


b

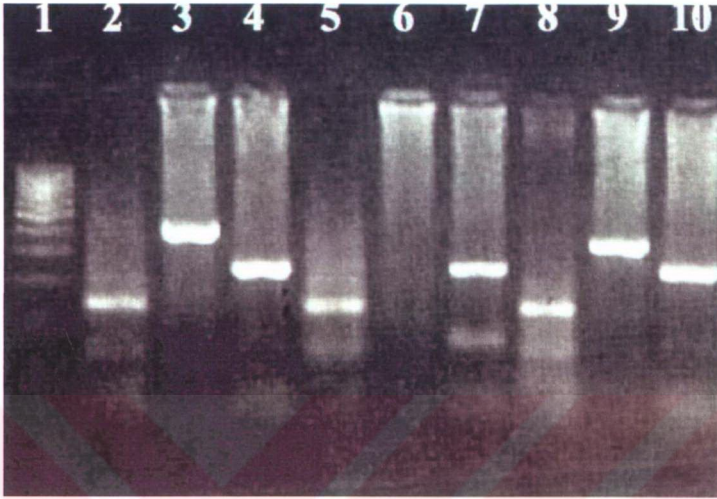
Şekil 4.8 $Ph^1(+)/Ph^1(-)$ bir olguya ait interfaz ve metafaz örneği
a; $Ph^1(+)$ interfaz b; $Ph^1(-)$ metafaz



Şekil 4.9 $Ph^{1}(+)$ bir olguya ait interfaz FISH örneği



Şekil 4.10 $Ph^1(+)$ bir olguya ait interfaz ve metafaz örneği
→ Ph^1 kromozomu



Şekil 4.11 RT/PZR ile bcr-abl füzyonunun belirlenmesi

1-Molekül ağırlığı standartı (100 bp ladder)

3,6,9- Translokasyon PZR'ı ; 3, 9: bcr-abl (+), 6: bcr-abl (-)

4,7,10-Kontrol PZR'ı

2, 5, 8-1.PZR

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan, tüm kanser tiplerinde çeşitli genetik değişimler tesbit edilmektedir. Hemopoetik sistem kanserlerinden olan lösemilerde, oluşan kromozomal değişikliklerin analizi; löseminin tipinin doğru olarak belirlenmesi, remisyon ve relaps durumlarında hastalığın prognozunun anlaşılması ve minimal residual hastalıkların hücre seviyesinde takibinde yardımcı olmaktadır. Lösemi alt grublarından biri olan Kronik Myeloid Lösemi (KML) spesifik bir kromozom anomalisi ile tanımlanan ilk kanser tipidir. 9 numaralı kromozomun q34 bandı ile 22 numaralı kromozomun q11 bandı arasındaki resiprokal translokasyon $t(9;22)(q34;q11)$ sonucu oluşan Philadelphia kromozomu (Ph^1), bcr-abl füzyon genine sahiptir (37, 13, 30) .

KML olgularında Ph^1 kromozomunun tesbiti için birkaç yöntemsel yaklaşım vardır. En yaygın kullanılan yöntem, kromozom anomalilerinin sitogenetik analizi ile tesbit edilmesidir. MRD'lerin tesbit edilmesinde de sıklıkla kullanılır. Tipik sitogenetik relaps, hematolojik relapstan önce ortaya çıkmaktadır. Ancak hassasiyeti düşüktür (%1-5) ve sınırlı sayıda metafaz çalışıldığı için, residual hastalık taşıyan hücreler gözden kaçabilmektedir. Yine de sitogenetik analizinin güvenilirliği, Southern Blott ve benzeri teknikler, flow sitometri veya immünolojik markerların ölçüldüğü tekniklerden daha düşük değildir. Moleküler sitogenetik teknikleri (FISH) çok sayıda hücrenin (>500) analizine izin vermektedir. $1/10^3$ maling hücre yakalama hassaslığına sahiptir. Ancak bu tekniklerdeki yanlış negatiflik, tanıda ve relaps riski taşıyan hastalarda riskli olabilmektedir. Bir çok merkez, hassaslığı daha yüksek olduğu için bcr-abl füzyonunun varlığının gösterilmesi ve MRD'lerin tesbitinde PZR yöntemini seçmektedir. RT/PZR tekniği ise çok daha hassas bir yöntemdir. 10^5 - 10^6 hücre popülasyonunda 1 maling hücre (teorik olarak) tesbit edebilme yeteneğine sahiptir. Remisyonunda görülen hücrelerde klinik relapsın tesbitinde önemli rol üstlenmektedir. Kemik iliği nakli sonrası hastanın izlenmesi, relapsın erken safhada yakalanması açısından çok önemli olmaktadır. Yine kemoterapi alan hastalarda

remisyonun gerçek olup olmadığının tesbiti bu tekniklerin güvenilirliğine bağlı olarak mümkün olmaktadır. Dolayısı ile tanının konması, MRD'nin tesbiti, hastalığın prognozunun izlenmesi ve relapsa girdiğinde tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir. Sitogenetik analiz ve moleküler genetik teknikleri ile arada köprü görevi gören moleküler sitogenetik teknikleri KML olgularında birbirini tamamlayan tanı yöntemleridir. (53, 21, 75,90, 104, 57).

Biz de bu tez çalışmasında merkezimize refere edilen KML olgularından elde edilen kemik iliği aspirasyonu ve perifer kanı materyalinde, GTL batlama tekniği ile sitogenetik analizleri yapılarak Ph¹ kromozomunun gösterilmesi, bcr-abl translokasyon DNA problrı kullanılarak FISH tekniği ile interfaz ve metafazlarda bcr-abl füzyonunun tespit edilmesi, RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığının ortaya çıkartılması ile elde edilen verilerin materyal ve teknik açıdan karşılaştırılmasını amaçladık.

Bu tez çalışması dahil edilen toplam 52 olgunun 48'inden sitogenetik analiz yapmak amacı ile kemik iliği aspirasyon ve RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonunun saptanması için perifer kan materyali alınırken, 4'ünden ise her iki yöntemi uygulamak için sadece perifer kan materyali alınarak çalışıldı. RT/PZR yönteminin uygulanabilmesi için alınan materyalin EDTA'lı, sitogenetik analizleri yapılacak perifer kanlarının ise heparinli alınmasına dikkat edildi. Perifer kanlarının 72 saatlik lenfosit hücre kültürleri yapıldı. EDTA'lı kanların lenfosit hücre kültürlerinin yapılmasına çalışıldı, ancak başarılı sonuç alınamadı. Bu nedenle çalışılacak olgulardan aynı anda üç farklı materyalin alınması gerekti. 72 saatlik hücre kültürünün kültür sonrası işlemlerinin haftasonu yapılamaması ve üç materyalin de aynı zamanda alınmasında karşılaşılan zorluklardan dolayı kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların ancak 26'sından aynı zamanda, sitogenetik analiz yapmak amacı ile perifer kanı da alınabildi. Kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların tamamı, merkezimize geliş zamanına göre direkt çalışıldı yada over night kültür (ONC) yapıldı. 39 olguda sitogenetik analizlerin sonucu alınabildi. Kemik iliği aspirasyonu ile aynı zamanda perifer kan materyalleri de alınan 26 olgu ve sadece perifer kan materyali alınan 4 olgu olmak üzere, toplam 30 olguda, 72 saatlik perifer kanı lenfosit hücre kültürü yapılarak, sitogenetik olarak çalışıldı. Bu olguların sadece 22 sinden sonuç alınabildi. Kemik iliği ve perifer kanı materyallerinde yapılan sitogenetik incelemelerde, olguların klinik durumlarına, aldıkları tedaviye, merkezimize geliş koşullarına ve laboratuvarımızdaki teknik sebeplere bağlı olarak

değerlendirilecek kalitede metafaz plaklarına rastlanılmadığı gibi hiç metafazı olmayan olgular da tespit edildi. Merkezimize tanı ve takip nedeni ile 3 kez gelen olgu 28'in tüm kemik iliği aspirasyon materyalinde sitogenetik olarak hiç sonuç alınamazken, sadece üçüncü kez alınan perifer kan materyalinden sonuç alabildik. Burada olgunun klinik durumu kadar aldığı tedavinin de sonuç alınamamasında etkili olduğunu düşündük. Klinik tabloya bağlı olarak yada alınan güçlü kemoterapi sonrası mitoz sayısının düştüğü ve görülen az sayıdaki metafazlarda da düşük bant kalitesi sonucu yeterli sitogenetik inceleme yapamadığından söz eden çalışmalara rastladık (71, 93, 102, 34, 89)

Çalışılan olgularda Ph¹ kromozomu ile birlikte diğer kromozomal yapı ve sayısal düzensizlikler de araştırıldı. Bazı kromozomal yapı ve sayısal düzensizlikler hastalığın ilerlemesi ile birlikte ortaya çıkmakta ve prognoz hakkında bilgi vermektedir. Bu grup içinde i(17q), +8, +19, +21 ve ikinci Ph kromozomu özellikle KML olgularında blastik fazında Ph¹ kromozomuna ek olarak görülen en belirgin sitogenetik bulgularıdır ve hematolojik belirtilerden önce ortaya çıkar. 17p13 te bulunan p53 tümör baskılayıcı genindeki (Tp53) mutasyonun yada kaybın bir çok tümör tipinde görüldüğü için, kanser gelişiminde önemli bir genetik değişiklik olarak kabul edilmektedir. i(17q)'da bu bölgenin kaybı söz konusudur. +8'de 8q34 te lokalize olan c-myc protoonkogeninin artışı ve c-myc mRNA'sının artan ekspresyonunun KML'de önemli rol oynadığı düşünülmektedir(25, 52, 16,33).. Biz de çalışmamızda ikinci Ph kromozomu dışında diğer düzensizlikleri tesbit ettik. Olgu 11de sitogenetik analiz sonucu i(17q) bulundu. Aynı şekilde olgu 45'de bulduğumuz +8 olgu 41'de tesbit edilen +21 tek metafaz alanında görülmekle birlikte KML blastik fazda nadir görülen bir bulgu olduğu için rapor edildi Olgu 2 ve 12'de sayılamayacak kadar çok kromozom içeren poliploidili, olgu 10'da sadece endereduplikasyon, olgu 22'de sadece pcd ve olgu 29'da ise tetraploidili metafaz alanlarını gözlemledik. Bu düzensizlikler neoplazi olgularında sık rastlanılmakta ve bölünme hatalarına bağlı oluşmaktadır (80,66). Klinik önemi olan bu sitogenetik bulgular bu yöntemin önemini ve vazgeçilmez olduğunu göstermektedir. Yöntem kıyaslaması yapan başka çalışma grupları da sitogenetik inceleme yöntemlerinin öneminden söz etmekte ve kullanılmasına devam edilmesi gerektiğini bildirmektedir (15, 93, 92).

Çalışmamızdaki bazı olgularda tanı ve takip nedeni ile değişik zamanlarda m ateryal alışı tekrarlandı. Her materyalden elde edilen sonuçlar ayrı değerlendirildi.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 21 olguda (olgu 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16,19, 20, 25, 27,30, 34, 37, 42, 44, 51), sitogenetik inceleme sonucu t(9;22), Ph(+)

bulundu. Bu olgulardan, olgu1 de iki kez kemik iliği aspirasyonu yapıldı ve ilk alınıştta [34]Ph(+)/Ph(-)[2] bulunurken, ikinci alınıştta tüm sahalarda Ph(+)'gözlendi. Tanı ve takip nedeni ile farklı zamanlarda olmak üzere 3 kez materyal alınan olgu 3'ün ilk kemik iliği aspirasyon materyalinde Ph¹(+) bulunurken, sonraki 2 materyalinde Ph¹(-) bulundu. Üçüncü kemik iliği aspirasyonu materyali ile aynı zamanda alınan perifer kanı lenfosit kültüründe de Ph¹(-) sonuç alındı. Burada ki Ph¹ kromozomunun kaybının aldığı tedavi sonucu olduğu düşünöldü. Bu olguların perifer kanı lenfosit kültürlerinden sadece olgu 37 de Ph¹ (+) tesbit edildi. Olgu 1'in ilk ve olgu 34'ün ikinci kemik iliği aspirasyonu yapıldığı zaman alınan perifer kanlarında Ph¹ (+)/Ph¹(-)mosaizmi gözlemlendi. Olgu 6,16,27, 42 ve 51'de perifer kanı lenfosit kültürlerinde Ph(-) bulundu. Olgu 25 ve 30'dan alınan kemik iliği aspirasyon materyalinde sitogenetik inceleme yapılarak Ph¹ (+) bulundu, ancak yapılan 72 saatlik hücre kültüründe sitogenetik değeriendirme yapılamadı. Kemik iliği aspirasyonu yapılan olgu 5, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 20 ve 44'de ise perifer kanı alınamadı. Ph(+) bulunanan bu 21 olguda RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon genini araştırdığımızda, olgu1,3, 6, 7, 9, 13, 14, 15,19, 25, 30, 34, 37, 42, 44 ve 51'nin bulunduğu 16 olguda bcr-abl füzyon genini tesbit ettik. RT/PZR sonuçları ile kemik iliği aspirasyon materyalinde yapılan sitogenetik inceleme sonuçları uyumlu çıktı. Yapılan farklı çalışmalarda da Ph¹(+) olgularda sitogenetik, FISH ve RT/PZR yöntemlerinin aynı derecede güvenilir oldukları rapor edilmektedir (34,89,).Sadece 4 olgu da (olgu5, 8, 16, 20) RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonu tesbit edilemedi. Bu olgulardan olgu 8'de FISH tekniğı ile bcr-abl füzyon geni gösterildi. Olgu 16 da ise sadece kemik iliği aspirasyonunda Ph(+) bulunup, perifer kanında yapılan sitogenetik inceleme ve RT/PZR yöntemleri ile bcr-abl füzyonunun gösterilememesi Ph¹(+) hücrelerin henüz kan dolaşımına geçmemiş olabileceğini düşündüdü. Olgu 20 de ise sitogenetik inceleme sonucu Ph¹(+) bulunurken, RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonu (-) bulundu. Bu üç olguda bcr-abl füzyon geninin gösterilememesinin bir diğeri sebebi olarak da füzyonun kullandığımız primerlerin tanımadığı bir başka noktadan olabileceğini düşündük. Olgu 27 de ise laboratuvar şartlarından kaynaklanan teknik bir sorun nedeni ile RT/PZR sonucunu alamadık.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan olgu 2, 4, 11, 12, 17, 18, 21, 26, 29, 31, 33, 39, 45, 46, 47 ve 48'in bulunduğu toplam 16 olguda, sitogenetik inceleme sonucu Ph(-) bulundu. Olgu 2, 21,26, 33, 39, 45 48'in bulunduğu toplam 7 olgunun perifer kanı lenfosit kültüründe de Ph(-) bulundu. Olgu 29 ve 47'de ise perifer kanı alındı

ancak sitogenetik inceleme yapılabilecek hücreye rastlanılmadı. Diğer olgular ise sadece kemik iliği aspirasyonu yapılan olgulardır. Bu olgularda RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon genini araştırdığımızda, olgu 2, 11, 12, 17, 18,21, 26, 39, 46 ve 48' de sitogenetik inceleme ile uyumlu sonuç alındı. Olgu 17'ye FISH tekniği de uygulandı ve diğer yöntemlerle uyumlu olarak bcr-abl füzyonunun olmadığı tesbit edildi. Olgu 4, 33, 45 ve 47'de ise RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığı tesbit edildi. Olgu 33 ve 47'de FISH tekniği uygulayarak RT/PCR yöntemi ile aynı sonucu bulduk. Olgu 29 ve 31'de RT/PZR yöntemi ile sonuç alamadık. Olgu 31 ve olgu 45'e aynı zamanda FISH yöntemi de uygulandı. Olgu 31'de bcr-abl füzyonu gözlenirken, olgu 45'de bcr-abl füzyonunu taşıyan ve taşımayan hücrelerin olduğunu tesbit ettik. Bu sonuçlar bu olguların prognozunun takibinde önem taşımaktadır. Burada FISH yönteminin RT/PZR yönteminden daha avantajlı olduğu görüldü. Ph¹(-) bulunan olgu 4 de Ph¹(+) RT/PZR sonucunu doğrulamak amacı ile FISH yöntemini uygulamak istedik ancak deneyimiz metafaz kalitesinin çok düşük olması ve gözlenen stoplazma kalıntılarına bağlı olarak hibridizasyonun gerçekleşememesi sonucu başarısızlıkla sonuçlandı. Bu olguda FISH sonucu veremedik. Bir çok olgumuzda benzer sorunlarla karşılaştık. Bu sorunlar özellikle tümör dokularında görülmektedir (80,94). Olgu 23, 24, 38 ve 40'da klinik nedenlerle sadece perifer kanı alınarak 72 saatlik lenfosit kültürü yapıldı. Olgu 23 ve 40'da değerlendirilecek metafaza rastlanılmadı. Olgu 38'de Ph¹(-) tespit edilirken, olgu 24'de ise Ph¹(+)/Ph¹(-) mozaismi gözlemlendi. Sonuç alınamayan olgu 23'de RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonunun oluşmadığı tesbit edildi. Olgu 24, 38 ve 40'da RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığı belirlendi. Olgu 38'e FISH yöntemi de uygulandı ve RT/PZR yöntemi ile uyumlu olarak bcr-abl füzyonu gösterildi.

Sitogenetik inceleme ve RT/PZR yöntemi ile alınan sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Ph¹(+) olgularda 2 yöntem birbiri ile uyumlu çıkarken, Ph¹(-) olgularda RT/PZR'ın sitogenetik incelemeye göre daha uygun bir teknik olduğu Kappa testi ile (Kappa: 0,505 p<0,01) yapılan İstatistik hesaplamalar sonucu ıspatlandı. Yapılan değişik çalışmalarda özellikle Ph¹(-) olgularda RT/PZR yönteminin üstünlüğü rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda moleküler teknikler içinde en hassas ve güvenilir yöntem olarak RT/PZR yöntemi bildirilmektedir (73, 82, 47, 12,35).

Aynı şekilde FISH tekniği ile RT/PZR yöntemini de karşılaştırmak istedik. Ancak olgu sayısının az olması nedeni ile RT/PZR ve FISH yöntemi istatistik olarak karşılaştırılamadı. Bununla birlikte iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu, bazı

durumlarda da RT/PZR yöntemine göre daha çok avantaj sağladığı gözlemlendi. Benzer sonuçlara, değişik yazarlar tarafından yayınlanan literatürlerde de rastladık. Farklı araştırma gruplar tarafından yapılan çalışmalarda sitogenetik olarak Ph¹(-) olgularda, uygulanan FISH ve RT/PZR yöntemleri ile bazı Ph¹(-) olguların bcr-abl füzyon genine sahip olduğu gösterilmektedir. Burada birkaç nedenden söz edilmektedir. Sitogenetik olarak Ph¹ kromozomu görülmeyen ancak moleküler olarak bcr-abl füzyonu tespit edilen KML hastalarında yapılan incelemelerde abl onkogeninin bcr bölgesine insersiyonunun gerçekleştiği yapılan moleküler incelemelerle gösterilmiştir. Moleküler düzeydeki bu oluşumun sitogenetik olarak gösterilmesi mümkün değildir (67). Bir diğer sebep olarak da özellikle güçlü tedaviler sonrası Ph¹(+) hücrelerin sayısı oldukça azalmakta, ancak tedavinin bırakılmasından bir süre sonra baştaki düzeyine ulaşmaktadır. Ph¹(+) hücrelerin azaldığı dönem de zaten yetersiz olan mitoz nedeni ile incelenebilen az sayıdaki metafazda bu translokasyon yakalanamamaktadır. Aynı olgulara moleküler teknikler uygulandığında ise bcr-abl füzyonunun devam ettiği gözlenmektedir. Özellikle interferon α tedavisi sırasında Ph¹(+) hücrelerin oranı önem taşımaktadır. Çok sayıda interfaz nüvelerinin sayılabildiği için interfaz FISH tekniğinin daha avantajlı olduğunu söylenmektedir. Varyant Ph¹ kromozomuna sahip bazı olgularda sitogenetik olarak gözden kaçabilmektedir. Varyant Ph¹ kromozomlarının tespiti FISH tekniği ile mümkün olmaktadır (48,49, 89, 34, 93). Ayrıca bilindiği gibi tüm hematolojik kanserlerde kaliteli ve yeterli sayıda metafaz bulmak oldukça zordur. Bu grub hastalara G bantlama yapıp sitogenetik sonuç vermek çoğu zaman güçleşmektedir. Böyle durumlarda kaliteki metafaza ihtiyaç duyulmayan interfaz FISH tekniği devreye girerek Ph¹ kromozomu araştırılabilmektedir (2). Bizim de böyle bir olgumuz olduğundan daha önce söz edildi. Burada da olduğu gibi FISH tekniği özellikle interfaz FISH'i sitogenetik tekniklere in yetesiz kaldığı durumlarda devreye girebilmektedir. Uygulanan tedavi sonrası düşen Ph¹(+) hücrelerin oranını verdiği gibi klinik olarak remisyona giren hastalarda MRD lerin tesbitinde FISH tekniğinin önemi büyüktür. Tedavi sonrası geçici bir iyilik döneminden sonra hasta ilk haline dönebilmektedir. Bu konuda bir çok yazar tarafından FISH, RT/PZR ve diğer moleküler tekniklerinin önemi belirtilmiştir (82, 69, 93, 36, 17, 35, 76, 102, 5).

Çalışmamız sırasında FISH probu olarak dual color bcr-abl translokasyon problemlerini tercih ettik. Bu problemlerle FISH tekniğinin hassaslığının arttığını bildiren ve bu probu öneren literatürlere rastladık (19, 20, 68).

Sitogenetik inceleme açısından iki materyali karşılaştırdığımızda 5 olguda kemik iliği aspirasyon materyalinde Ph¹(+) tesbit edilirken perifer kanında Ph¹(-) bulundu. Olgu 1 ve olgu 34'ün perifer kan materyalinde de Ph¹(+)/Ph¹(-) sonuç alındı. Ph¹(+) hücrelerin kanda daha geç ortaya çıkması ve normal hücrelerin 72 saatlik hücre kültürü sonunda çoğalması nedeni ile farklı bir Ph¹(+)/Ph¹(-) oranı vermesine sebep olduğu düşünüldü. Çünkü, bütün kan hücrelerinin yapım yeri kemik iliğidir ve bir pluripotent kök hücresinden oluşmaktadır. Pluripotent kök hücre dolaşan kanda çok az sayıda bulunmaktadır. Pluripotent hemopoetik hücreleri, unipotent lenfoid kök hücrelerine, onlar da her hücre serisinin genç ana hücrelerine (proeritroblast, myeloblast, monoblast, megakaryoblast ve lenfoblast) dönüşürler. Bu hücrelerin belli aşamalardan geçerek gelişmeleri sonucu olgun kan hücreleri meydana gelir ve perifer kanında dolaşmaya başlarlar. KML myeloid hücreleri tutan bir lösemi türü olduğu için Ph(+) taşıyan hücrelerin dolaşıma katılması zaman almaktadır (98). Bu sonuç bize sitogenetik analiz için uygun materyalin kemik iliği aspirasyonu olduğunu göstermektedir. İki materyali RT/PZR ve FISH tekniği yönünden karşılaştırdığımızda ise sonuçlar arasında bir fark görmedik. Bu sonuçlar olgu sayısının az olması nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Kemik iliği aspirasyonu ağırlı ve zor alınan bir materyal olduğu için, moleküler tekniklerde perifer kanının tercih edilebileceğini söyleyebiliriz. İki materyal ve üç yöntemin karşılaştırıldığı başka çalışmalarda da aynı sonuçların çıkarıldığını belirledik (15,9, 102, 56).

Sonuç olarak, Ph¹(+) olgularda üç yöntemin de aynı doğruluğa sahip olduğunu belirledik. Hiç yanlış pozitif bulgumuz olmadı. Ancak Ph¹(-) olgularda RT/PZR ve FISH yöntemlerinin sitogenetik analiz yöntemine göre daha hassas olduklarını tespit ettik ve bu bulgumuzu literatürlerle destekledik. Ph¹(+)/Ph¹(-) mozaizmini tespit ettiğimiz özellikle sitogenetik olarak Ph¹(-) olgularda FISH tekniğinin RT/PZR yöntemine göre daha bilgi verici olduğunu gösterdik.. Bu iki yöntemin kıyaslandığı değişik zamanlarda ve farklı araştırma grupları tarafından rapor edilen çalışmalar da bizim sonucumuzu desteklemektedir. Bu çalışmada sadece tanı yöntemleri değil aynı zamanda alınan materyallerde karşılaştırıldı. Özellikle sitogenetik analiz için kemik iliği aspirasyon materyalinin tercih edilmesi gerekmektedir. RT/PZR ve FISH yöntemleri için ise iki materyal arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu iki yöntem için daha kolay alınabildiği için perifer kanı tercih edilebilir. Neoplastik oluşumlarda kaliteli kromozom eldesinin oldukça zor olması ve materyal alınan hastanın özelliklerinin yanı sıra, materyalin alınış ve merkezimize gönderilme koşullarına da

bağlı olarak çalışmamızda sonuç alınamayan olgular RT/PCR yöntemi ile değerlendirildi. Burada RT/PCR yönteminin konvensiyonel sitogenetik yöntemine üstünlük sağladığından söz edilebilir. Ancak Ph¹(+)/Ph¹(-) bulunan olgularda RT/PCR yöntemiyle sadece bcr-abl füzyonu tesbit edilmiştir. Çünkü bu teknikle mozaik hücrelerin oranı belirlenememektedir. Sitogenetik ve FISH yöntemleriyle tesbit edilen mozaizm ve oranı özellikle tedavi sonrası takiplerde önem kazanmaktadır. Ayrıca Ph¹ kromozomunun yanısıra başka kromozomal sayı ve yapı düzensizlikleri sitogenetik analiz yöntemi ile incelenebilmektedir. Biz de çalışmamızda olguların klinik takibi açısından yönlendirici olan i(17q), +8 ve +21 ve hücre bölünme hatalarına bağlı ortaya çıkan sayısal ve yapısal düzensizliklere rastladık. Sitogenetik yönteminin önemini literatürlerle de destekledik.

Bu tez çalışması bize bu üç yöntemin bazı şartlarda birbirlerine üstünlük sağlasalar da, genellikle birbirlerini tamamladıklarını ve bir arada kullanılması gerektiğini göstermiştir.



VI ÖZET

Kronik Myeloid Lösemi (KML) olguların % 90 dan fazlasında bcr-abl füzyon genine sahip olan Philadelphia kromozomu (Ph¹)görülmektedir. Ph¹ kromozomu t(9;22) sonucu oluşur ve prognostik indikatör olarak rol oynar. Philadelphia kromozomu görülmeyen %5'lik KML olgularının üçte birinde, moleküler olarak bcr-abl rekombinasyonu saptanmıştır. FISH yöntemi,ile bcr-abl translokasyon problemleri kullanılarak interfaz ve metafaz hücrelerinde Ph¹ kromozomunu gösterilir. RT/PZR tekniği ise bcr-abl füzyon gen mRNA'sından reverse transkriptaz enzimi ile elde edilen cDNA nın, PZR tekniği ile amplifikasyonu sonucu bcr-abl füzyon geninin varlığının gösterilmesi prensibine dayanır. Her iki yöntem de CML tanı yöntemi olarak hassas ve güvenilirlerdir.

Hematoloji servisinden merkezimize refere edilen 52 CML hastasında konvansiyonel sitogenetik, FISH ve RT/PZR teknikleri ile çalıştık. 48 KML hastasından sitogenetik analiz yapmak amacı ile kemik iliği aspirasyon ve RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonunun saptanması için perifer kan materyali alınırken, 4'ünden ise her iki yöntemi uygulamak için sadece perifer kan materyali alınarak çalışıldı. Kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların ancak 26'sından aynı zamanda, sitogenetik analiz yapmak amacı ile perifer kanı da alınabildi. Kemik iliği aspirasyonu yapılan olguların tamamı, merkezimize geliş zamanına göre direkt çalışıldı yada over night kültür (ONC)uygulandı. 39 olguda sitogenetik analizlerin sonucu alınabildi. 26 olguda kemik iliği aspirasyon ve perifer kanı materyali, 4 olguda da perifer kanında olmak üzere, toplam 30 olguda, hücre kültürü yapılarak, sitogenetik olarak çalışıldı ve sadece 22 sinden sonuç alınabildi.

Biz ayrıca olgularımızda mitoz hatalarına bağlı düzensizlikleri, i(17q), +8,+21 düzensizlikleri de sitogenetik olarak inceledik. i(17q) (17p13 te Tp53 tümör baskılayıcı geni bulunduğu için),+8 (8q34 te lokalize olan c-myc protoonkogeninin artışı) ve +21 KML klinik gelişimi ile ilgili olduğu bilinmektedir.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan 21 olguda sitogenetik inceleme sonucu t(9;22), Ph¹(+) bulundu. Bu olguların perifer kanı lenfosit kültürlerinden sadece 1 olguda Ph¹(+) tesbit edildi. Ph (+) bulunan bu 21 olgudan16'sında RT/PZR yöntemi

ile bcr-abl füzyon genini tesbit ettik. RT/PZR sonuçları ile kemik iliği aspirasyon materyalinde yapılan sitogenetik inceleme sonuçları uyumlu çıktı. RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyonu tesbit edilemeyen 4 olguda hastanın kliniğine bağlı olabileceğini düşündük. 1 olguda ise teknik nedenlerle sonuç veremedik.

Kemik iliği aspirasyonu yapılan toplam 16 olguda, GTL bantlama ile Ph¹(-) bulundu. Bu olguların 7'sinde perifer kanı lenfosit kültüründe de Ph¹(-) bulundu. Bu olgularda RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon genini araştırdığımızda, 10 olguda sitogenetik inceleme ile uyumlu sonuç alındı. 4 olguda ise RT/PZR yöntemi ile bcr-abl füzyon geninin varlığı tesbit edildi. Aynı olgulara Dual color FISH uygulandığında 2 Olguda RT/PZR ile uyumlu sonuç alınırken, 1 olguda Ph¹(+)/Ph¹(-) bulundu. Sitogenetik sonuçları RT/PZR sonuçları ile Kappa testi kullanılarak karşılaştırıldığında RT/PZR yönteminin özellikle Ph¹(-) olgularda Sitogenetik incelemeden daha uygun olduğu(Kappa:0,505 p<0,01) gösterildi. Ph¹(+)/Ph¹(-) bulunan olgularda FISH tekniğinin RT/PZR tekniğinden daha uygun olduğunu gördük.

Sitogenetik inceleme için kemik iliği aspirasyon materyalinin daha uygun olduğu gözlenirken, FISH ve RT/PZR yöntemleri için sonuç açısından herhangi bir fark olmadığı tesbit edildi.

Bu tez çalışması bize, KML olgularında tanı, uygun tedavinin saptanması, takip ve remisyon dönemindeki MRD'nin tesbit edilmesi için GTL bantlama, FISH ve RT/PZR tekniğinin bir arada kullanılması gerektiğini gösterdi. Elde edilen bu sonuçlar literatürlerle de desteklenerek, üç yöntemin önemi vurgulandı.

VII SUMMARY

In more than 90% of chronic myeloid leukemia (CML) cases, Philadelphia chromosome (Ph¹) which possesses the bcr-abl fusion gene is observed. The Ph¹ chromosome is formed as a result of t(9;22) and serves as a prognostic indicator. In one third of 5% of CML cases in which Ph¹ chromosome is not seen, bcr-abl recombination is detected by molecular methods. By the use of the FISH method, Ph¹ chromosome is shown in interphase and metaphase cells using bcr-abl translocation probes. RT/PCR technique is based on the principle that shows the presence bcr-abl fusion gene as a result of the amplification of the cDNA that is acquired by reverse transcriptase enzyme from the mRNA of the bcr-abl fusion gene by PCR amplification. Both methods are sensitive and reliable as methods of CML diagnosis.

We performed conventional cytogenetic, FISH and RT/PCR techniques in the 52 CML patients referred to our center from the Hematology Service. While bone marrow aspiration material to perform cytogenetic analysis and peripheral blood to perform RT/PCR in order to detect bcr-abl fusion was obtained from 48 CML patients, only peripheral blood was obtained from 4 patients to perform both of the above methods. From 26 of the cases in which bone marrow aspiration was performed, peripheral blood was also obtained for cytogenetic analysis. To all of the cases in which bone marrow aspiration was done direct and overnight (ONC) culturing was done. The results of cytogenetic analysis could be obtained in 39 cases. With bone marrow aspiration and peripheral blood material in 26 cases and peripheral blood in 4 cases, cell culture was performed in a total of 30 cases and studied by cytogenetic methods; results could be obtained from only 22 of them. We also analysed the aberiation depending on mitosis, i(17q), +8, +21 abnormalities by cytogenetic analysis in our cases. It is known that i(17q)(since Tp53 tumor supressor gene is on 17p13), +8 (the amplification of the c-myc protooncogene localized on 8q34) and +21 are related to the clinical development of CML. In 21 cases in which bone marrow aspiration was done t(9;22), Ph¹(+) was found by cytogenetic analysis. Among the peripheral blood lymphocyte culture of these cases, Ph¹(+) was detected in only one case. In these 21 cases in which Ph¹(+) was found bcr-abl fusion gene was detected by the RT/PCR method. The results of these cytogenetics analysis done in bone marrow aspiration material were

correlated with the results of the RT/PCR. In the 4 cases in which bcr-abl fusion could not be detected by RT/PCR, it was considered to be due to the clinical condition of the patient. In one case, results could not be given because of technical reasons.

In the total of 16 cases in which bone marrow aspiration was done Ph¹ chromosome was found to be negative by GTL banding. When bcr-abl fusion gene was analysed in these cases by RT/PCR results correlated with the cytogenetic analysis in 10 of the cases. In 4 cases, the presence of bcr-abl fusion gene was shown by the RT/PCR method. When dual color FISH was performed in the same cases, results were correlated with RT/PCR in 2 cases and one case was found to be Ph¹(+)/Ph¹(-).

When the results of the cytogenetic analysis were compared with the results of the RT/PCR by using the Kappa test, it was shown that RT/PCR method was more appropriate especially in Ph¹(-) cases than cytogenetic analysis (Kappa=0.505, p<0.01) we observed that FISH technique was more suitable than the RT/PCR technique.

While it was observed that bone marrow aspiration material was more appropriate for cytogenetic analysis, it was detected that for FISH and RT/PCR methods there was no difference in terms of result.

This thesis has shown us that, in the diagnosis, determining of appropriate treatment, monitoring and detection of MRD in the remission stage of CML cases, GTL banding, FISH and RT/PCR technique should be applied together. The results obtained have been supported by literature and the significance of the three methodologies have been emphasized.

VIII.KAYNAKLAR

1. Acar H. Optimisation and Application of Fluorescence in Situ Hybridization in Selected Leukaemias. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) to the Faculty of Medicine in the University of Glasgow. January, 1995
2. Acar H, Stewart J. Philadelphia chromosome in Chronic Myelogenous Leukemia: Confirmation of Cytogenetic diagnosis in Ph positive and negative cases by Fluorescence In Situ Hybridization. Cancer Genet. Cytogenet 94:75-78, 1997
3. Advani AS, Pendergast AM. BCR-ABL variants: biological and clinical aspects. Leukemia Research 1483, 1-8, 2002
4. Almeida TA, Cigudosa JC. B2 exon of the BCR gene is also duplicated in some patients with CML. Leukemia, 13, 645-651, 1999
5. Amare PS, Baisane C. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. Cancer Genetics And Cytogenetics 131, 125-134, 2001
6. Başaran N. Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon FISH ESKİŞEHİR, 1996
7. Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı. ESKİŞEHİR-1996
8. Bedi A, Zelinbauer BA. Inhibition of apoptosis by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. Blood, Vol. 83, No: 9 (April 15), pp 2038-2044, 1994
9. Bentz M, Cabol G. Detection of chimeric BCR-Abl genes on bone-marrow samples and blood smears in chronic myeloid and Acute Lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. Blood, Vol. 83, No: 7 (April 1), pp 1922-1928, 1994
10. Bernstein R, Pinto MR. "Masked" Ph¹ chromosome abnormalities in CML: A report of two unique cases. Blood, Vol. 63, No: 2 (February), pp 399-406, 1984
11. Bertram JS. The molecular biology of cancer. (Review) Molecular Aspects of Medicine, 21, 167-223, 2001
12. Biernaux C, Loos M, Sels A. Detection of Major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. Blood, Vol. 86, No: 8, pp 3118-3122, 1995
13. Boxer LM. The role of oncogenes in hematologic malignancies. Ann. Rev. Med., 4S 1-11, 1994

14. Brittain D. Clinical applications of minimal residual disease in haematological malignancies. XVth Meeting of The International Society of Haematology African & European Division. Education & Symposium Programme, Education Session 5: Minimal Residual Disease, pp.32, Durban, South Africa, September 18-23, 1999
15. Buno I, Wyatt WA. A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*, Vol.92, No:7 (October 1), pp 2315-2321, 1998
16. Champlin RE, Golde DW. Chronic Myelogenous Leukemia :Recent Advances. *Blood*, Vol.65, No:5, pp 10339-1047, 1990
17. Coabert J, Thuret I, Lafafe M, Carcassonne Y. Detection of residual bcr/abl translocation by polymerase chain reaction in Chronic Myeloid Leukemia patients after bone-marrow transplantation. *The Lancet*, November 11, pp 1125-1130, 1989
18. Daley GQ, Etten RA von. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P²¹⁰ *bcr/abl* gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, Vol.247, pp 824-830, 1990
19. Dewald GW, Wyatt WA. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double bcr/abl fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*, Vol.91 (May 1), pp 3357-3365, 1998
20. Dewald G, Stallard R. A multicenter investigation With D-FISH BCR/ABL1 probes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 116, 97-104, 2000
21. Dobrovic A, Trainor KJ, Morley AA. Detection of the molecular abnormality in Chronic Myeloid Leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood* Vol. 12, No:5 (December), pp 2063-2065, 1988
22. Evans CA, Lynch P. Activation of the Abelson Tyrosine Kinase Activity is associated with suppression of apoptosis in haemopoietic cells. *Cancer Research*, 53, pp 1735-1738, April 15, 1993
23. Fialkow PJ, Martin PJ. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*, Vol.58, No:1 (July), pp 158-163, 1981
24. Fialkow PJ, M.D, Jacobson R, M.B, Papayannopoulou T, M.D. Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *The American Journal of Medicine* , Vol.63, pp 125-130, 1997
25. Fioretos T, Strömbeck B. Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other haematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding Tp53 mutations. *Blood*, Vol.94, No:1 (July 1), pp 225-232, 1999
26. Futaki M, Inokuchi K, Matsuoka H, Miyake K. Relationship of the type of bcr-abl hybrid mRNA to clinical course and transforming activity in Philadelphia-positive

Chronic Myelogenous Leukemia. Leukemia Research Vol.16,No:11,pp1071-1075,1992

27. Gilliland DG, Blanchard KL. Clonality in myeloproliferative disorders :Analysis by means of the polymerase chain reaction. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,Vol.88,6848-6852 ,1991
28. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia :New strategies for cure. Education Program American Society of Hematology. I.HAM-WASSERMAN LECTURE, pp1-8,SanDiego,California,December5-9,1997
29. Gordon,MY, Dazzi F. Cell biology of CML cells. Leukemia,13,suppl.1,S65-S71,1999
30. Guerristo A, Saglio G. Molecular Insight in chronic myeloid leukemia and in other Ph positive human leukemias. In Clinical and experimental hematology Molecular Biology in Hematological Malignancies (I), vol 2, pp59-75 ,1997
31. Guillaume B, Amcye G. Chronic Myeloid Leukemia with a rare variant Philadelphia translocation :t(9;22;21)(q34;q11;q22). Cancer Genet.Cytogenet.,116,166-169,2000
32. Harrison CJ, Gibbons B. Multiplex fluorescence in Situ hybridization and cross species color banding of a case of Chronic Myeloid Leukemia in blastic crisis with a complex Philadelphia translocation. Cancer Genet.Cytogenet.,116,105-110,2000
33. Heidemann-Metzke S, Harder L, Gesk S. Integration of Amplified BCR/ABL Fusion Genes Into the Short Arm of Chromosome 17 as a Novel Mechanism of Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia. GENES,CHROMOSOMES & CANCER 31:10-14,2001
34. Hess G, Reifenrath. Autologous transplantation of in vivo purged PBSC in CML:Comparison of FISH cytogenetics ,and PCR detection of Philadelphia chromosome in leukaphoresis products. Cancer Genet.Cytogenet.117,1-8,2000
35. Hochhaus A, Lin F, Reiter A. Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients Who achieve complete cytogenetic remission with inteferon - α . Br.J.Haematol,91,126-131,1995
36. Hooberman,AL, Carrino JJ, Leibowitz D, Rowley D. Unexpected heterogeneity of bcr-abl fusion mRNA detected by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol.86,pp.4259-4263,June 1989(Medical Sciens)
37. Hughes TP, Morgan GJ, Goldman JM. Detection of residual leukemia after bone-marrow transplant for Chronic Myeloid Leukemia ;Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. Blood , Vol.77,No:4(February 15),pp 874-878,1991
38. http://www.fmv.ulg.ac.be/genmol/Essential_genomics/genome_anatomy

39. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/t0922CML.html>
40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
41. Jhonson HM, Bazer FW, Szente BE. How interferons fight disease. Scientific American pp 68-75, May 1994
42. Jonas D, Lübbert M, Kawasaki ES. Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. Blood, Vol.79, No:4 (February 15), pp 1017-1023, 1992
43. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzvock R, Estrov Z. Chronic Myelogenous Leukemia ; A concise update. Blood Vol.82 691-702, 1993
44. Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, Estey E. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome –positive Acute leukemia . Blood Vol.75, No:9 (November 1), pp 2411-2418, 1991
45. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S. Prolonged survival in Chronic Myelogenous Leukemia after cytogenetic response to interferon- α therapy. Ann Intern Med. Vol .122, pp 254-261, 1995
46. Karaman B. DNA Spesifik Problemlerin Kullanımı İle Yapısal Seks Kromozom Anomalilerinin Araştırılması. Tıbbi Genetik Doktora tezi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1999
47. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.85, pp 5698-5702, August 1988 (Medical Sciences)
48. Ko SH, Kwon GC. Cytogenetic and Fluorescence In Situ Hybridization analyses of hematologic malignancies in Korea. Cancer Genet. Cytogenet. 101:1-6, 1998
49. Kobzev Y, Domracheva E. Fluorescence In Situ Hybridization Studies of Interphase nuclei for assessing response to therapy in patients with Chronic Myeloid leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. 106:128-134, 1998
50. Koeffler, HP, M.D. and Golde DW, M.D. Chronic Myelogenous Leukemia –New concepts. The New England Journal of Medicine, Vol.304, No:20, pp 1201-1209, 1981
51. Kurzrock R, M.D., Gutterman JU, M.D. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. The New England Journal of Medicine, Vol.1819, No:15 (Oct. 13), pp 990-998, 1988
52. Kurzrock R, Talpaz M. Molecular Biology in Cancer Medicine. (Second Edition) Martin Dunitz Ltd. 1999
53. Lee M, Khoury I, Chaplin R, Kantaryan H, Talpaz M. (3) Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction of bcr/abl transcripts in chronic

myelogenous leukemia following allogeneic bone-marrow transplantation. British Journal of Haematology Vol.82,pp708-714,1992

54. Lee MS, Maistre AL. Detection of two alternative bcr/abl mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. Blood, Vol.73, No:8(June), pp 2165-2170, 1989
55. Leibowitz D, Rego-Schaefer K, Popenoe DW, Mears-Gregory J. Variable breakpoint on the Philadelphia chromosome in Chronic Myelogenous Leukemia. Blood Vol.66, No:1(July), pp243-245, 1985
56. Lin F, Goldman J. A comparison of the sensitivity of blood and bone-marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. Br.J.Haematol, 86, 683-685, 1994
57. Lin F, Rhee VF. Kinetics of increasing BCR-ABL transcript number in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. Blood, Vol 87, No:10(May 15), pp 4473-4478, 1996
58. Litz C, Copenhaver CM. Paternal origin of the rearranged major breakpoint cluster region in chronic myeloid leukemia. Blood, Vol.83, No:12, 3445-3448, 1994
59. Lugo TG, Pendergast AM. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science, 247: 1079-1082, 1990.
60. Lüleci G, Başaran S, Bağcı G. Sitogenetik Uygulama Yöntemleri. 1990
61. Martinelli G, Amabile M. Concomitant expression of the rare E1/A3 and B2/A3 types of BCR/ABL transcript in a chronic myeloid leukemia (CML) patient. Leukemia, 13, 1463-1472, 1999
62. McGahon A, Bissomette R. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. Blood, Vol.83, No:5(March 1), pp 1179-1187, 1992
63. Mc Laughlin JC. In vitro transformation of immature haematopoietic cells by the P210 bcr/abl oncogene product of the Philadelphia chromosome. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.84, pp 6558-6562, Sept. 1987
64. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood, Vol.88, No:7, pp 2375-2384, 1996
65. Mitelman, F. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995). Cytogenetics and Cell Genetics. 1995
66. Mitelman F. CANCER CYTOGENETICS second edition Sverre Heim WILEY-LISS A JOHN WILLEY & SONS, INC., PUBLICATION 1995
67. Morris CM, Heisterkamp N. Ph-negative chronic myeloid leukemia :Molecular analysis of ABL insertion into M-BCR on chromosome 22. (Blood, Vol.76, No:9(November1), pp1812-1818, 1990

68. Nacheva E, Holloway T, Brown, K. Philadelphia –negative chronic myeloid leukemia: detection by FISH of BCR-ABL fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 9 or chromosome 22. *Br.J.Haematol.*, 87:2, 409-412, Jun 1993
69. Nagler A, Slawin S, Yarkoni S. Detection of minimal residual disease after sex-mismatch bone-marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet.Cytogenet.* Vol.73, pp 130-133, 1994
70. Neriah YB, Daley GQ. The chronic myelogenous leukemia specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, Vol.233, pp 212-214, 1986
71. Novak A, Kuskic M, Ludoski M. Rapid method for obtaining high-Quality chromosome banding in the study of hematopoietic neoplasia. *Cancer Genet.Cytogenet* Vol.74, pp 109-114, 1994
72. Nylund SJ, Ruutu T, Saarinen U. Metaphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in the follow up 60 patients with haemopoietic malignancies. *British Journal of Haematology* Vol.88, pp 778-783, 1994
73. Otazù IB, Zalcborg I. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia by nested PCR. *Leukemia Research* 23, 185-190, 1999
74. Özkul Y, Lillington DM, Tuszynsk AJ. The detection of bcr-abl and abl-bcr mRNA transcripts in Philadelphia –positive, Philadelphia –negative and variant Philadelphia in Chronic Myeloid Leukemia. *Turk J.Haematol* Vol.15, pp 33-38, 1998
75. Pichert G, Ray DC, Ganin R. Distinct patterns of minimal residual disease associated with Graft-Versus –Host disease after allogeneic bone-marrow transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, Vol.13, No:7(July), pp 1704-1713, 1995
76. Radich JP, Gehly G. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia results and implications in 346 patients. *Blood*, Vol.85, No:9, 2632-2638, 1995
77. Rifal WE, Ruutu T, Vettenranta K. Minimal residual disease after allogeneic bone-marrow transplantation for chronic myeloid leukemia :a metaphase-FISH study. *British Journal of Haematology*, Vol.92, pp 365-369, 1996
78. Rooney DE. Czepulkowski, B.H. *Human Cytogenetics-a Practical Approach*, Vol II, 1987
79. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D. Detection of Philadelphia chromosome – positive cells by the polymerase chain reaction following bone-marrow transplant for Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* Vol.74, No:2(Augst 1), pp 882-885, 1989
80. Riddon RW, MD., Ph.D. *Cancer Biology Third Edition OXFORD-1995*

81. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C. New type of BCR-ABL junction in Philadelphia Chromosome –Positive Chronic Myelogenous Leukemia. Blood, Vol.76, No:9, pp 1819-1824, 1990
82. Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES, Clark S. Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.87, pp563-567, January 1990
83. Schaefer- Rego K, Dudek H, Popenoe D, Arlin Z, Mears-Gregory J. CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the bcr. Blood Vol.70, No:2(August), pp448-455, 1987
84. Seong D, Thall P, Kantarjian HM Philadelphia chromosome-positive myeloid cells in the peripheral blood of chronic myelogenous leukemia patients :Comparison with the frequency detected in cycling cells of the bone-marrow . Clinical Cancer Research, Vol.4, pp 861-867 ,April 1998
85. Seong DC, Kantarjian HM. Hypermetaphase fluorescence insitu hybridization for Quantitative monitoring of Philadelphia chromosome –positive cells in patients with chronic myelogenous leukemia during treatment. Blood, Vol.86, No:6(Sep.15), pp 2343-2349, 1995
86. Silahtaroglu A N. Floresan İn Situ Hibridizasyonun Mitotik ve Mayotik Kromozomlar Üzerinde Uygulanması ve Karşılaştırılması. Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1995
87. Silver RT. An evidence based analysis of effect of Busulfan, Hydroxyurea , Interferon and Allogenic bone-marrow transplantation in testing the chronic phase of chronic myeloid leukemia (CML). XV th Meeting of The International Society of Haematology African&European Division. Education& Symposium Programme, Education session 5: Minimal Residual Disease Durban, South Africa September 18-23, 1999
88. Sinclair PB, Green AR. Improved sensitivity of BCR-ABL detection: A triple probe three color fluorescence in situ hybridization system. Blood, Vol.90, No:4(Augst 15), pp 1395-1402, 1997
89. So CC, Wong KF. BCR/ABL Translokation in adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comparison of Conventional and Interphase Cytogenetic studies. Cancer Genet.Cytogenet., 110:19-22, 1999
90. Stevens WS. Molecular techniques for detection of minimal residual disease in haematological malignancies. XV th Meeting of The International Society of Haematology African&European Division. Education& Symposium Programme, Education session 5: Minimal Residual Disease, pp.31, Durban, South Africa, September, 18-23, 1999
91. Strachan T and Read AP. Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Limited, 1996

92. Tbakhi A.M.D., Pettay JMT. (ASCP). Comparative analysis of interphase FISH and RT-PCR to detect bcr-abl translocation in chronic myelogenous leukemia and related disorders. *Am.J.Clin.Pathol*,109:1,pp16-23,Jan 1998
93. Tchirkov A, Giollant M. Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukemia during interferon- α therapy. *British Journal of Haematology*,Vol.101,pp 552-557, 1999
94. Therman,E.(ed): Human Chromosomes: Structure, Behaviour Effects.2nd ed. NewYork: Springer-Verlag,1986
95. Thijsen SFT, Schuurhuis GJ. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia*,13,1646-1674,1999
96. Thompson&Thompson. Genetics in Medicine (Fifth Edition) W.B. SAUNDERS COMPANY,1991
97. Thompson FH. Cytogenetic methods and findings in human solid tumors.In Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck J.(eds): The ACT Cytogenetics Laboratory Manual,3rd ed., Lippincott raven publishers,Philadelphia,1997
98. Turgeon ML. Clinical Hematology .Theory and Procedures (3. Edition) Lippincott Williams &Wilkins, 1999
99. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA (Second Edition),1992
100. Willem P. Molecular cytogenetics markers in haematological disorders. XV th Meeting of The International Society of Haematology African&European Division. Education& Symposium Programme. Education session 5:Minimal Residual Disease pp.29-30, Durban, South Africa, September 18-23,1999
101. Winter SS, Greene JM..Pre-B acute lymphoblastic leukemia with b₃a₂ (p²¹⁰) and e₁a₂ (p¹⁹⁰) BCR-ABL fusion transcripts relapsing as chronic myelogenous leukemia with a less differentiated b₃a₂ (P²¹⁰) clone. *Leukemia*,13,2007-2011,1999
102. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A..Simple and reliable sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia*,13:4,542-552,Apr,1999
103. Zhang J, Goldman JM, Cross NCP. Characterization of genomic bcr-abl breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *British Journal of Haematology* Vol.90,pp136-146,1995
104. Zang JG, Lin F. Detection of residual disease after BMT for CML by amplification of the BCR-ABL breakpoint from genomic DNA:Comparison with RT-PCR. *Blood*,Vol.84,496a ,1994(Supp 11))

IX. ÖZGEÇMİŞ

08.09.1969 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi İskenderun'da tamamladıktan sonra, 1986-1990 yılları arasında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nde lisans eğitimimi aldım. 1991 yılında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik programında yüksek lisans eğitime başladım. 1994 yılında "İfosfamid Uygulanan Wistar- Albino Sıçanlarda Sitogenetik İncelemeler" başlıklı tez konusu ile yüksek lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik programında doktora eğitime başladım. 1996 yılında Eskişehir, Osmangazi Üniversitesi, GENTAM'da gerçekleştirilen "Uygulamalı Fluoresan İn Situ Hibridizasyon Kursu " na, 1998 yılında Ankara' da gerçekleştirilen "Vysis Uygulamalı FISH Kursu" na katıldım. Halen İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarına devam etmekteyim.