

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**17P13, 11Q22.3 VE 13Q34 DELESYONU OLAN VE
OLMAYAN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİLİ (KLL)
HASTALARDA AID GEN EKSPRESYON-MUTASYON
DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

METİN YUSUF GELMEZ

**DANIŞMAN
PROF.DR. MELİH AKTAN**

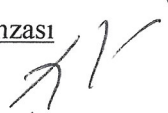
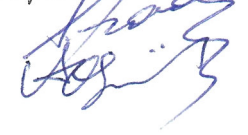
**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Yüksek Lisans Programında Metin Yusuf GELMEZ tarafından hazırlanan 17p13, 11q22.3 ve 13q34 Delesyonu Olan ve Olmayan Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) Hastalarda AID Gen Ekspresyon-Mutasyon Düzeyinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 07 / 2011

<u>Tez Sınav Jürisi</u>				<u>İmzası</u>
<u>Ünvanı</u>	<u>Adı</u>	<u>Soyadı</u>	<u>(Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	
1.Prof. Dr. Günnur	DENİZ	İÜ	DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Melih	AKTAN	İÜ	İTF Hematoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Güher S.	DİRESKENELİ	İÜ	İTF Fizyoloji Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. Selim	BADUR	İÜ	İTF Mikrobiyoloji ve Kli. Mikr. A. D.	
5.Doç. Dr. Ali Osman	GÜROL	İÜ	DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı	

BEYAN

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

Metin Yusuf GELMEZ



İTHAF

Eşim'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında ve deneysel çalışmalarım boyunca her konuda desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Melih AKTAN'a

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilimsel fikir ve düşünceleriyle bana yardım eden değerli hocalarım Prof. Dr. Günnur DENİZ, Doç. Dr. Ali Osman GÜROL, Doç. Dr. Gaye ERTEN, Dr. Esin AKTAŞ ve Dr. Sema BİLGİÇ'e,

Tez çalışmam sırasında deneysel aşamaya katkılarından ötürü Prof. Dr. Teoman SOYSAL ve Dr. Mustafa SEVİNÇ'e,

Çalışmam sırasında benden yardımları esirgemeyen İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji laboratuvarında görevli başta Başak, Aynur ve Ceylan olmak üzere tüm Hematoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden beri manevi destekleriyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Pınar KASAPOĞLU, Abdullah YILMAZ ve anabilim dalımızdaki tüm yüksek lisans, doktora arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve yanımda olan annem, babam, kardeşim, babaannem ve eşim'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10990

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. KLL.....	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Sıklık	4
2.1.3. Etiyoloji	4
2.1.4. Patogenez.....	4
2.1.5. Klinik.....	6
2.1.6. Laboratuvar.....	6
2.1.7. Evre	7
2.1.8. Tanı	9
2.1.9. Ayırıcı Tanı.....	9
2.1.10. Tedavi.....	10
2.2. Tümör Baskılayıcı Genler	11
2.3. Aktivasyonla İndüklenen Sitidin Deaminaz (AID)	14
2.3.1. Tanım	14
2.3.2. Fonksiyon	15
2.3.3. Aktivasyonu İçin Gereken Yüzeyli Molekülleri.....	15
2.3.4. Hücre İçi Yerleşimi	16
2.3.5. DNA Dizileri Üzerine Etkisi	16

2.3.6. Fosforilasyonu	17
2.3.7. N Terminal ve C Terminal Bölgeleri	17
2.3.8. Splice Varyantları	17
2.3.9. Somatik Hipermutasyon (SHM)	17
2.3.10. İzotip Sınıf Dönüşümü (CSR)	20
2.3.11. AID Hastalık İlişkisi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Hastalar	25
3.2. Metod	25
3.2.1. Total RNA İzolasyonu	25
3.2.2. RNA Yoğunluğunun Ölçümü	27
3.2.3. cDNA Sentezi	27
3.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	28
3.2.5. Gen Anlatım Düzeylerinin Tespiti.....	29
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Hasta – Kontrol Grubu.....	32
4.2. Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu	33
4.3. Delesyonu Olan Hasta – Kontrol Grubu	33
4.4. 17p53 Delesyonu Olan– Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu	34
4.5. 11q22.3 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu	34
4.6. 13q34 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu	35
4.7. 13q14 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu	35
4.8. Binet Evre Ssistemine Göre Hasta Gruplarının Karşılaştırılması	36
4.9. Rai Evre Sistemine Göre Hasta Gruplarının Karşılaştırılması.....	36
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	42
FORMLAR	48
ETİK KURUL KARARI	51
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Rai Klinik evreleme sistemi.....	8
Tablo 2-2: Binet evreleme sistemi	8
Tablo 2-3: CD19+ lenfositöz ayırıcı tanısı	10
Tablo 2-4: KLL'nin ayırıcı tanısında immünofenotip profil.....	10
Tablo 3-1: cDNA sentez bileşenleri	28
Tablo 3-2: cDNA sentez bileşenleri -2.....	28
Tablo 3-3: PCR bileşenleri	29
Tablo 3-4: PCR döngüleri.....	29
Tablo 4-1: KLL'li hastaların klinik özellikleri.....	31
Tablo 4-2: KLL'li hastaların sitogenetik durumları	32
Tablo 4-3: KLL'li hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı.....	32
Tablo 4-4: Delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı.....	33
Tablo 4-5: Delesyonu olan hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı	33
Tablo 4-6: p53 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol Grubu	34
Tablo 4-7: 11q22.3 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu	34
Tablo 4-8: 13q34 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu	35
Tablo 4-9: 13q14 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu	35
Tablo 4-10: Binet evre sistemine göre hasta grupları arasındaki AID ekspresyon farkı	36
Tablo 4-11: Rai evre sistemine göre hasta gruplarının karşılaştırılması	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Periferik yaymada KLL hücreleri	6
Şekil 2-2: Periferik yaymada KLL hücreleri	7
Şekil 2-3: Hücre döngüsü üzerinde E2F ile Rb1 ilişkisi	12
Şekil 2-4: p53 aktivasyonunu sağlayan etmenler ve p53 fonksiyonu	13
Şekil 2-5: AID geni yerleşimi	14
Şekil 2-6: Sitozin'in Urasil'e deaminasyonu	14
Şekil 2-7: AID protein	14
Şekil 2-8: AID aktivasyonu için gereken yüzey molekülleri.....	16
Şekil 2-9: Afinite Olgunlaşmasında Meydana Gelen Mutasyon Durumu.....	18
Şekil 2-10: SHM'de AID'in rolü	19
Şekil 2-11: SHM	19
Şekil 2-12: Naif B Hücresinin Yüksek Afiniteli B hücreğine Dönüşümü.....	20
Şekil 2-13: Ig İzotip Dönüşümü.....	21
Şekil 2-14: CSR'de AID'in rolü	22

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

CD: Cluster of differentiation

Ig: İmmüoglobülin

sIgM: Surface immüoglobülin M

NCI-WG: National Cancer Institute-sponsored Working Group

IWCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

B-KLL: B hücreli kronik lenfositik lösemi

Bcl-2: B cell lymphoma 2

MCL-1: Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

XIA : X-linked inhibitor of apoptosis protein

IgV_H: İmmüoglobülin ağır zincir değişken bölgesi

SHM: Somatik hipermutasyon

del: Delesyon

p: Kromozomun kısa kolu

q: Kromozomun uzun kolu

DAPK: Death-associated protein kinase

KLL/PL: Kronik lenfositik lösemi/ prolenfositik lösemi

Ca⁺²: Kalsiyum

Hb: Hemoglobin

mm³: milimetre küp

dl: desilitre

rb1: retinoblastoma 1

DNA: Deoksiribonükleik asit

CDK: Cyclin dependent kinase

mdm2: Murine double minute

AID: Activation-induced cytidine deaminase

A: Adenin

G: Guanin

C: Sitozin

T: Timin

U: Urasil

IL: İnterlökin

ssDNA: Single strand Deoksiribonükleik asit

dsDNA: Double strand Deoksiribonükleik asit

CSR: Class Switch Recombination

V: Variable

S: Switch

MMR: Mismatch repair

UNG: Uracil-DNA glycosylase

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

JAK: Janus Kinase

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

Ig C: İmmünglobülin constant

APE: Apirimidinik Endonüklez

EBV: Epstein Barr Virüs

Ab-LMV: Abelson murine lösemi virüs

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

HCV: Hepatit C virüs

ÖZET

Gelmez MY. 17p13, 11q22.3 ve 13q34 delesyonu olan ve olmayan kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda AID gen ekspresyon-mutasyon düzeyinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2011

Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID) enzimi DNA yapısındaki sitozini urasile çevirmektedir. Sadece aktive B lenfositlerinde eksprese edilen AID, B hücresinde hem somatik hipermutasyon (SHM), hem de izotip dönüşümü (CSR) mekanizmasında rol oynamaktadır. AID'in çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda translokasyonlara neden olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. B hücreli kronik lenfositik lösemi (B-KLL), monoklonal B hücrelerinin kemik iliği ve periferik kanda birikimiyle karakterizedir. Klinik seyri çok değişken ve önceden tahmin edilmesi zordur. KLL'li hastaların %30-50'sinde kromozomal anomaliler tespit edilmiştir. Translokasyonlar için kırılma bölgeleri oluşturduğu düşünülen AID'in, KLL'li hastalarda klinik seyirle ilişkili 17p13, 11q22.3, 13q14 ve 13q34 DNA bölgelerinde kırılma noktaları oluşturabileceği ve KLL'li hastalarda görülen bu delesyonlardan AID geninin sorumlu olabileceği düşünülerek delesyonu olan ve olmayan hastalarda AID gen ekspresyonları incelenmiştir. 17p13, 11q22.3 veya 13q14 delesyonu olan hastaların AID ekspresyonları hem kontrollere, hem de delesyonu olmayan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. 13q34 bölgesinde delesyonu olan hastalarda ise delesyonu olmayan hastalara göre ekspresyonda bir artışa rastlanmamıştır. Çalışmamız AID genin KLL B hücrelerinde meydana gelen delesyonlardan sorumlu olabileceğini düşündürmekle birlikte prognozda önemli yer tutan bu delesyonlarda AID gen ifadesinin, delesyonu olmayan hastalardan daha yüksek bulunması nedeniyle hastalığın prognozunun takibinde klinik bir parametre olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz, AID, KLL

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10990

ABSTRACT

Gelmez MY. The assessment of the activation induced cytidine deaminase (AID) gene expression in chronic lymphatic leukemia patients with and without 17p13, 11q22.3 and 13q34 deletion. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Experimental Medical Research Institute, Immunology Department, Msc Thesis, Istanbul, 2011.

The activation induced cytidine deaminase (AID) is an enzyme that is induced by activation converts the cytosine into uracil in the DNA molecule. It is only expressed by activated B lymphocytes and plays a role both in the mechanisms of somatic hypermutation (SHM) and isotype class switch in B lymphocyte ontogenesis. Recent studies have shown AID can cause numerous translocations in various lymphoproliferative diseases. B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is characterized by the accumulation of monoclonal B cells in the bone marrow and peripheral blood. Clinical course of patients with B-CLL is difficult to predict. Eightyfive percent of B-CLL patients have chromosomal abnormalities. AID enzyme, which is thought to create fraction segments for translocations, might also cause fractions in the chromosomal regions of 17p13, 11q22.3, 13q14 and 13q34 that are associated with clinical status in B-CLL patients. Therefore, we investigated the AID gene expression in patients with and without deletion. The levels of AID expressions in patients with the deletion of 17p13, 11q22.3 or 13q14 were found to be higher as compared to controls and patients without deletion. However, we found no difference between patients without deletion and with deletion in the 13q34 region. We conclude that AID enzyme may play a role in the generation of deletions that occur frequently in B-CLL patients. In addition, AID gene, which is found to be expressed higher in patients with deletion, may be a laboratory parameter in predicting the prognosis of the disease.

Keywords: Activation induced cytidine deaminase, AID, CLL

This study is supported by the Istanbul University Experimental Research Projects Section Project No: 10990

1. GİRİŞ VE AMAÇ

B hücreli kronik lenfositik lösemi (B-KLL), kuzey yarım kürede görülen en sık kronik lösemi tipidir. Monoklonal B hücrelerinin, kemik iliği ve periferik kanda birikimiyle karakterize olan KLL'nin, klinik seyri çok değişkendir ve önceden tahmin edilmesi zordur. KLL'li hastaların çoğu semptomsuzdur. Hastalık tanısı, diğer hastalıkların değerlendirilmesi veya rutin inceleme sırasında periferik kanda mutlak lenfositöz saptanması ile konur.

KLL, olgun B lenfositlerin malign dönüşümünden kaynaklanır. Diğer B lenfosit malign dönüşümlerinin aksine, KLL hücrelerinin büyük bir çoğunluğunun proliferasyon kapasiteleri olmadığından, G0/G1 hücre dönüşüm fazında kalırlar. Bu nedenle KLL hastalığı B hücrelerinin fazla çoğalmasından değil, apoptoz mekanizmasının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hastaların büyük bir çoğunluğu semptomsuz olduğundan, hastalığın gerçek sıklığını belirlemek mümkün değildir. Hastaların büyük çoğunluğunun ortalama yaşı tanı sırasında 65 olup sadece %10-15'i 50-55 yaşın altındadır. Erkeklerde daha sıktır. KLL'li hastaların yaklaşık yarısında Ig ağır zincir sekanslarında çok sayıda mutasyon vardır. İmmüoglobülin ağır zincir (IgVH) genlerinde mutasyon olan hastalarda CD38 ekspresyonu yüksek, mutasyon olmayanlarda ise düşüktür. KLL B hücrelerindeki VH genlerinde mutasyon olması ve yüksek CD38 ekspresyonu yavaş seyirli ve iyi bir prognoz ile ilişkilidir (4).

1999 yılında bağımsız iki farklı grup tarafından yapılan çalışmalar sonucunda hastalık, immüoglobülin ağır zincir değişken bölgesinde (IgVH) somatik hipermutasyonun (SHM) olup olmamasına bağlı olarak klinik seyir açısından iki alt gruba ayrılmıştır. IgVH genlerinde somatik hipermutasyon saptanmayan hastaların, IgVH bölgelerinde somatik hipermutasyon gözlenen hastalara göre daha kötü klinik seyre sahip oldukları gösterilmiştir (2).

KLL'nin moleküler patogenezi henüz saptanamamıştır. Genetik çalışmalar sonucu, hastaların %30-50'sinde kromozom anomalileri tespit edilmiştir. En sık gözlenen genetik değişiklikler sırasıyla del13q14, trizomi 12, del11q22.3, del17p13 ve del13q34'tür. Birçok çalışmada kromozom anomalilerin hastalığın klinik seyri ile

ilişkisi olabileceği gözlenmiştir. 17p13 ve 11q22.3 bölgelerinde delesyonu olan KLL'li hastalarda klinik seyrin daha kötü olduğu gözlenirken, 13q34 bölgesinde delesyonu olanlarda daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (“activation-induced cytidine deaminase”) (AID) geni 12p13 bölgesinde lokalizedir. Beş ekzondan oluşan bu gen, 198 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. AID enzimi, sitidin deaminaz ailesinin bir üyesi olup DNA yapısındaki sitozini (C), urasile (U) çevirir.

AID gen ekspresyonu sadece aktive B lenfositlerinde vardır ve başlatılması için CD40-CD40L bağlantısı ve interlökin-4 (IL-4) gibi indükleyiciler gerekir. AID enzimi aktive B lenfosit hücrelerinde hem immünoglobülin (Ig) afinite matürasyonunu sağlayan somatik hipermutasyon (SHM) mekanizmasında, hem de Ig izotip dönüşümünü sağlayan “class-switch” rekombinasyon (CSR) mekanizmasında rol oynamaktadır. Bu enzimden yoksun kişilerde, izotip sınıf dönüşümü gerçekleşmemekte ve tekrarlayan fırsatçı enfeksiyonlarla karakterize 2. tipte hiperimmünoglobülin M sendromu (HiperIgM sendromu2) ortaya çıkmaktadır.

Ig afinite matürasyonu esnasında; B lenfosit'in Ig ağır (H) zincir değişken (“variable”) bölgelerinde nokta mutasyonu yapan AID enzimi, antikorun antijene olan afinitesinde artış meydana gelmesini sağlayarak, antijene daha güçlü bir şekilde bağlanan antikorların üretilmesini sağlamaktadır. Bu sayede, aynı enfeksiyon etkiyle yineleyen karşılaşmalarda organizma; antijene daha güçlü bağlanan antikorları sayesinde daha güçlü bir şekilde korunmaktadır (12,14).

Ig izotip dönüşümü esnasında, AID enzimi Ig Constant (sabit) (C) bölgelerinde yer alan sitozinleri deaminasyona uğratarak urasile (U) çevirir ve DNA kırılma bölgeleri için hedef noktaları oluşturur. Bu sayede IgM sınıfı antikorların diğer Ig sınıfı antikorlara (IgM→IgG, IgA, IgE) dönüşümü sağlanır. Ig izotip dönüşümü sayesinde antikorların, farklı enfeksiyon etmenlerine karşı daha hızlı ve etkili yanıt oluşturabilecek Ig sınıflarına dönüşümü gerçekleştirilmiş olur.

AID geni üzerine son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, AID enziminin sadece Ig VH ve Ig C bölgelerinde değil, aynı zamanda diğer non-immünoglobülin genlerde de mutasyonlara ve kırıklara yol açabileceği ortaya konmuştur (12,14).

Özellikle AID- transgenik hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, Burkitt lenfoma gelişiminde rol alan IgH/c-myc translokasyonlarında, bu enzimin aktif rol oynayabileceğini düşündüren bulgular mevcuttur. Yine *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu enfeksiyona bağlı olarak ortaya çıkan gastrik kanserlerde p53 mutasyonlarından, AID enziminin sorumlu olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, bazı AID enzimi izoformlarının, bcr/abl translokasyonuna sahip hastalarda daha fazla eksprese olduğu ve bu enzim izoformları ile hastalık oluşumunda rol alan bcr/abl translokasyonları arasında da ilişki olabileceği ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (1,5,20,21).

AID geninin, çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda kromozomal translokasyonlara neden olabileceğini ve hastalığın klinik seyrini etkileyebileceğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. KLL gelişiminde en önemli özelliklerden biri, KLL hücrelerinin apoptoz mekanizmalarından kurtularak, hücre ölümlerinin gerçekleşmemesi ve yoğun hücre birikimidir. KLL'li hastalarının bir bölümünde, apoptoz mekanizmasında rol oynayan özellikle 17p13, 11q22.3 ve 13q34 kromozom bölgelerinde delesyonların varlığı bilinmektedir (11,14).

Çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda translokasyonlar için kırılma bölgeleri oluşturduğu düşünülen AID enziminin, KLL'li hastalarda, hastalığın klinik seyri ile ilişkili 17p13, 11q22.3 ve 13q34 DNA bölgelerinde kırılma noktaları oluşturabileceği ve KLL'li hastalarda görülen bu bölgelerin delesyonlarından AID geninin sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada KLL'li vakalarda 17p13, 11q22.3 ve 13q34 delesyonu olan ve olmayan hastalarda AID gen ekspresyon düzeyleri araştırılarak, bu delesyonlar ile AID gen ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KLL

2.1.1. Tanım

B hücreli kronik lenfositik lösemi (KLL), kuzey yarım kürede en sık görülen lösemidir. Monoklonal B hücrelerinin, kemik iliği ve periferik kanda birikimiyle karakterizedir. KLL B hücrelerinde immün görünüm CD19, CD5 ve CD23 ifadeleri gözlenirken, CD22, FMC7, CD79b, sIgM ve IgD ifadeleri düşüktür. KLL hücreleri, lenf foliküllerinin mantle zonundan köken alır. Ancak, son yıllarda hafıza B hücrelerinden geliştiği de iddia edilmektedir (12,23,40).

2.1.2. Sıklık

Hastaların büyük bir çoğunluğu semptomsuz olduğundan, hastalığın gerçek sıklığını belirlemek zordur. Hastaların büyük bir çoğunluğunun tanı sırasında ortalama yaşı 65 olup, olguların sadece %10-15'i 50-55 yaşın altındadır. Hastalık erkeklerde kadınlara göre yaklaşık 2-2,5 kat daha sık görülmektedir. A.B.D'de her yıl yeni KLL vakasının ortaya çıkma oranı ortalama 100,000 kişide 3,5 (erkekler de 5, kadınlarda 3,5) iken, İngiltere'de bu oran her 100,000 kişide 6,15 kadardır. A.B.D'de, beyaz ırkta hastalığın görülme sıklığı siyah ırktan biraz daha yüksek iken, Asya kökenlilerden ise yaklaşık 4-5 kat daha yüksektir (13,30).

2.1.3. Etiyoloji

Bazı etnik gruplarda KLL'nin görülme sıklığının daha fazla olması, hastalığa yatkınlıkta genetik faktörlerin rol alabileceği izlenimini doğurmaktadır. Benzen ve diğer kimyasal toksik maddelerin KLL gelişimi üzerine muhtemelen etkisi yoktur. Her ne kadar tarım ve asbest sektörlerinde çalışanlarda KLL daha yüksek oranda görülse de, arada anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Ayrıca Japonya'da atom bombası sonrasında, radyasyona maruz kalmanın KLL riskinde bir artışa yol açmadığı gösterilmiştir (2,13,23,25).

2.1.4. Patogenezi

KLL, olgun B lenfositlerin malign transformasyonundan kaynaklanan bir neoplazmdır. B-KLL hücrelerinin proliferasyon kapasiteleri çok azdır ya da yok denecek kadar azdır. Hücrelerin çoğu mitozun G₀ evresindedir ve sitoplazmalarında bol

miktarda anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 vardır. Apoptoz mekanizmasının bozulması sonucu bu hücreler vücutta birikirler. Bu nedenle KLL hastalığının B hücrelerinin fazla çoğalmasından değil, apoptoz mekanizmasının bozulmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (2,14).

KLL hücrelerinde bcl-2, mcl-1 ve XIAP gibi antiapoptotik proteinlerin arttığı, bax gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Apoptoz bozukluğu nedeniyle tümör hücrelerinin devamlı olarak birikimi söz konusudur.

KLL'li hastaların yaklaşık yarısında immünglobülün (Ig) ağır zincir değişken bölgesinde çok sayıda mutasyon mevcuttur. İmmünglobülin ağır zincir (IgV_H) genlerinde mutasyon olan hastalarda CD38 ifadesi yüksek, mutasyon olmayanlarda ise düşüktür. IgV_H genlerinde mutasyon bulunan ve CD38 ekspresyonu da yüksek olan KLL hastalarında, hastalık yavaş seyirli ve prognoz iyidir (13,46).

KLL gelişiminden sorumlu bir kök hücre henüz tanımlanamamış olup KLL'de izlenen biyolojik ve genetik değişiklikler, (a) IgV_H mutasyon durumu, (b) apoptoz bozukluğu, (c) genetik bozukluklar ve (d) metilasyondur.

1999 yılında birbirinden bağımsız iki grup tarafından yapılan çalışmalarla hastalık, IgV_H somatik hipermutasyonun (SHM) olup olmamasına bağlı olarak klinik seyir açısından iki alt gruba ayrılmıştır. IgV_H genlerinde SHM saptanmayan hastaların, IgV_H bölgelerinde SHM gözlenen hastalara göre daha kötü seyrettikleri gösterilmiştir (27,44).

Bugüne kadar yapılan çalışmalara rağmen KLL'nin moleküler patogenezi henüz saptanamamıştır. Yapılan genetik çalışmalar sonucu KLL'li hastaların %30-50'sinde kromozomal anomaliler tespit edilmiştir. En sık görülen genetik değişiklikler sırasıyla del13q14, trizomi 12, del11q22.3, del17p13 ve del13q34'tür. KLL'li hastalardaki kromozomal anomalilerin, hastalığın klinik seyri ile ilişkisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. 17p13 ve 11q22.3 bölgelerinde delesyonu olan KLL'li hastalar klinik olarak daha kötü seyrederken, 13q34 bölgesinde delesyonu olan KLL'li hastalarda klinik seyrin daha iyi olduğu gözlenmiştir (40,24,51).

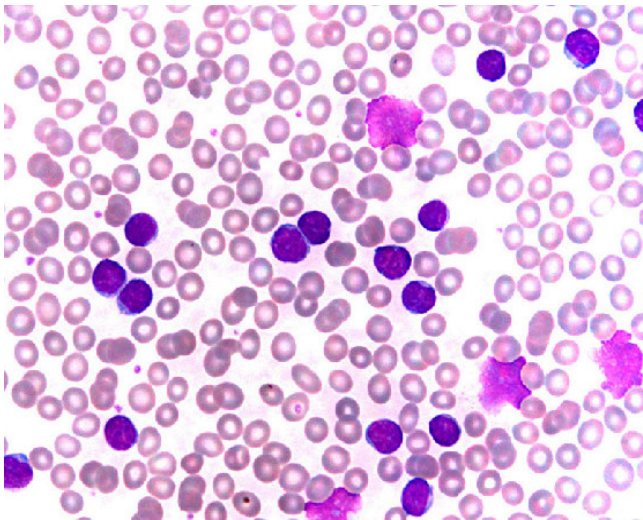
Metilasyonla gen ifadesinin baskılanması, bazı kanser ve lösemi türlerinde, tümör baskılayıcı genlerin ifadesini düzenler. DAPK gibi genlerin epigenetik susmaları KLL hastalarının %98'inde ve ailesel KLL olgularında mevcuttur (11,23).

2.1.5. Klinik

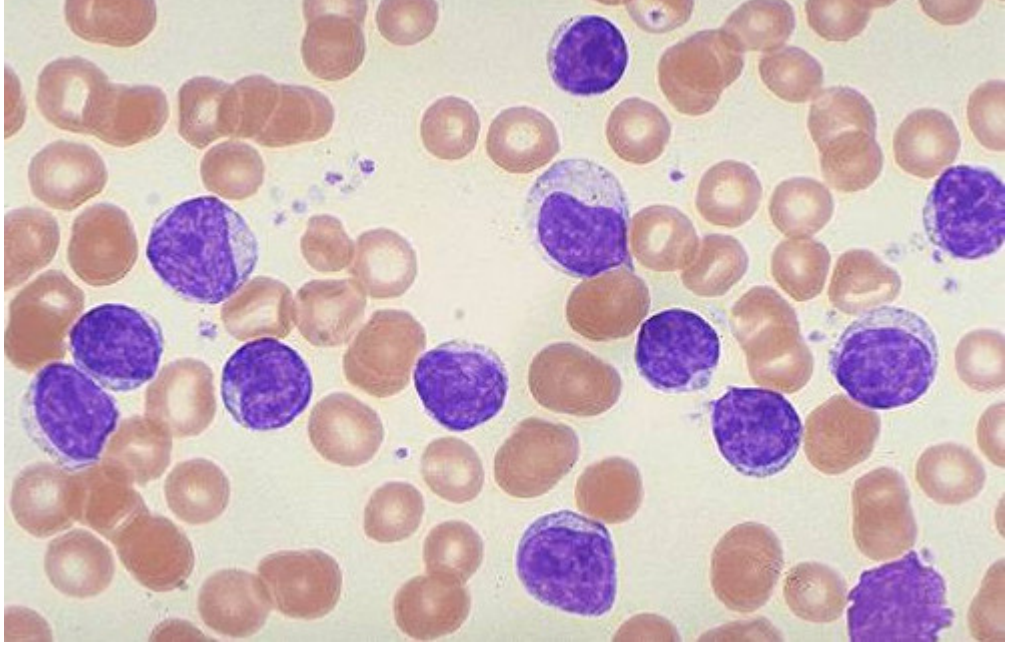
KLL'nin, klinik seyri çok değişken olup önceden kestirilmesi zordur. KLL'li hastaların çoğu semptomsuzdur. Hastaların %40'ında tanı, başka hastalıkların değerlendirilmesi veya rutin inceleme sırasında periferik kanda mutlak lenfositozun saptanması ile konur. Klinik belirti ve bulgular tanının konduğu sıradaki evreye göre değişiklikler gösterir. Yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı ve egzersiz toleransının azalması gibi belirtilere yol açar, ancak bunların hiç biri KLL'ye özgü değildir. Ateş, gece terlemesi ve enfeksiyonlar başlangıçta nadirdir, ama hastalık ilerledikçe daha belirgin olur. En sık rastlanan fizik muayene bulgusu lenfadenomegalidir. Splenomegali hastaların çoğunluğunda görülür. Hipogammaglobulinemi ve nötropeniye bağlı olarak enfeksiyonlarda artış vardır (10).

2.1.6. Laboratuvar

Tipik KLL hücreleri çok dar sitoplazmalı, küçük yuvarlak ya da oval nükleuslu ve olgun görünümlü lenfositlerdir. Kromatin yapısı biraz kaba olup, kromatin kümeleşmeleri görülebilir. Arada biraz daha iri ve daha geniş sitoplazmalı lenfositler görünür ki bunlara prolenfosit denir. Prolenfosit sayısı %10'un üzerine çıkacak olursa hastalık KLL/PL olarak tanımlanır. Prolenfosit sayısının %55'in üzerine çıkması durumunda (prolenfositik lösemi) hastalığın klinik seyri daha kötü bir hal alır. Yayma preparatların hazırlanması sırasında KLL lenfositlerinin bir kısmı parçalanır. Bunlara kan gölgesi denilmektedir. KLL hastalarının tipik periferik yayma görünimleri Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Periferik yaymada KLL hücreleri



Şekil 2-2: Periferik yaymada KLL hücreleri

LDH ve Ca^{+2} değerleri bazı hastalarda yüksek olarak gözlense de, diğer rutin biyokimya tetkiklerinde herhangi bir anormallik yoktur. Hipogammaglobülinemi başlangıçta hastaların az bir kısmında görülse de, hastalığın ilerlemesiyle hastaların tümüne yakınında ortaya çıkar. Benzer biçimde evrenin ilerlemesiyle birlikte hastalarda Coombs testinin pozitif bulunması da sık gözlenir (14)

2.1.7. Evre

Bugün için KLL’de kullanılan iki evreleme sistemi vardır. Bunlar Rai ve Binet evreleme sistemleridir. Binet evreleme sistemi daha çok Avrupa’da kullanılırken, Rai evreleme sistemi ise A.B.D’de kullanılmaktadır. Lenfadenopati ve kemik iliği tutulumu evre belirlenmesinde her iki evreleme sistemi için de ana kıstastır. Evre ilerledikçe kemik iliği tutulumu artar. Her iki evreleme sistemi için tanı kriterleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de gösterilmiştir (32,49).

EVRE	KLİNİK	Sağkalım (ay)	Tedavi
Evre 0	Lenfositoz	150	İzleme
Evre I	Lenfositoz + Büyümüş lenf bezleri	101	Progresyon olunca
Evre II	Lenfositoz +büyümüş dalak ve/veya karaciğer (büyümüş lenf bezi saptanmayabilir)	71	Progresyon olunca
Evre III	Lenfositoz + anemi (Hb < 11g/dl)	19	Endike (çoğunda)
Evre IV	Lenfositoz + trombositopeni (<100.000/ mm ³)	19	Endike (çoğunda)

Tablo 2-1: Rai Klinik evreleme sistemi

Evre	KLİNİK	Sağkalım (yıl)	Tedavi
Evre A	Palpe edilen lenf bezi bölgesi <3 Anemi ve/ veya trombositopeni bulgusu yok	>10	İzleme
Evre B	Palpe edilen lenf bezi bölgesi ≥3 Anemi ve/ veya trombositopeni bulgusu yok	7	Endike (çoğunda)
Evre C	Palpe edilen lenf bezi bölgesi ≥3 var veya yok. Anemi (<10 g/dl) ve/ veya trombositopeni (<100.000/ mm ³) bulgusu var	2	Endike (çoğunda)

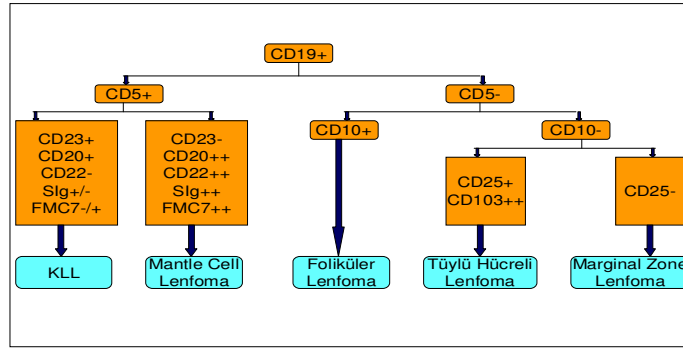
Tablo 2-2: Binet evreleme sistemi

2.1.8. Tanı

1988’de “National Cancer Institute-sponsored Working Group (NCI-WG)” ve “International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)” tarafından tanı, evreleme ve tedaviye başlama kriterleri ortaya konulmuştur. IWCLL tarafından ortaya konan tanı kriterleri; lenfosit sayısının $>10.000/\text{mm}^3$, kemik iliğindeki hücrelerin %30’undan fazlasını lenfositlerin oluşturması ve CD5 pozitif B lenfositlerin tipik fenotipik özelliklerinin saptanması olarak tespit edilmiştir. Kandaki lenfosit sayısı $>10.000/\text{mm}^3$ ise diğer iki kriterden birinin varlığı ve ya lenfosit sayısı $10.000/\text{mm}^3$ ’den az ise diğer iki kriterin de pozitif olması tanı için gereklidir. NCI-WG tarafından 1996 ortaya konan tanı kriterleri ise; lenfosit sayısının $5.000/\text{mm}^3$ ’ün üzerinde olması, CD5 yüzey antijen pozitifliği ile birlikte en az bir B lenfosit yüzey antijeninin pozitif bulunması (CD19, CD20, CD23), prolenfosit sayısının %55’den az olması ve kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin %30’dan fazlasının lenfosit olarak bulunmasıdır. NCI-WG tarafından tanı, evreleme ve tedaviye başlama kriterleri 2008 yılında güncellenmiştir. Buna göre, B lenfositlerin sayısı periferik kanda $\geq 5.000/\text{mm}^3$ olmalı ve akım sitometrik yöntem ile B hücrelerinde CD19, CD20, CD23 ile birlikte CD5 ekspresyonu gösterilmelidir (19,30).

2.1.9. Ayırıcı Tanı

Kronik KLL, diğer lenfoproliferatif hastalıklardan ayırt edilmelidir. Bu ayrımında immünofenotiplemenin önemi büyüktür. KLL morfolojik, genotipik ve fenotipik olarak küçük hücreli lenfositik lenfoma’dan ayrılamaz. Bu iki hastalık arasındaki ayırım periferik kandaki lenfosit sayısı ile yapılır. Lenfosit sayısı $\geq 5.000/\text{mm}^3$ ise KLL, daha az ise küçük hücreli lenfositik lenfoma olarak kabul edilir. Küçük hücreli lenfositik lenfoma belirgin lenfadenopati ile karakterize iken, KLL lenfositoz ile karakterizedir. KLL’nin diğer hematolojik hastalıklardan immünofenotipik olarak farkı Tablo 2.3 ve Tablo 2.4’de gösterilmiştir.



Tablo 2-3: CD19+ lenfositöz ayırıcı tanısı

Hastalık	SmIg	CD5	CD43	CD22	CD23	CD25	FMC7	CD103	CD11c	CD10
B-KLL	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Prolenfositik L	++	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Waldernström M	++	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Tüylü Hücreli L	++	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Villöz lenfositli splenik lenfoma	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Marginal zone lenfoma	++	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Mantle cell lenfoma	++	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Foliküler lenfoma	++	+	-	+	+	-	+	-	+	+

Tablo 2-4: KLL'nin ayırıcı tanısında immünofenotip profil

2.1.10. Tedavi

KLL'de tedavi seçenekleri evreleme sistemlerine göre yapılmaktadır. KLL'li hastaların çoğunluğu yaşlıdır ve klinik seyirleri değişkendir. Erken evredeki KLL'li hastalarda hastalık yavaş bir seyir gösterdiğinden tedavi hastalık ilerleyinceye kadar ertelenir. Bunun yanı sıra ileri evredeki ve progresyonu olan hastalarda ise tedaviye hemen başlanır. Hastalarda sadece lenfositöz olması tedaviye başlamak için gerekçe değildir. Tedaviye başlamak için gerekli endikasyonlar, halsizlik, kilo kaybı ve gece terlemesi gibi semptomlar, lenfosit sayısının bir yıldan az bir zamanda iki kat artış göstermesi, lenfadenopati, splenomegali, anemi ve trombositopeni ve enfeksiyonlardır (14,25).

KLL 1960'lı yıllardan beri alkilleyici ilaçlarla tedavi edilmektedir. Bunlar kendi başına veya kortikosteroidle birlikte verilir. Klorambusil genellikle ilk tercih edilen kemoterapötik ilaçtır. 1990'larda purin analoglarından fludarabin kullanılmaya başlamıştır.

Günümüzde KLL ve lenfoma tedavilerinde, hücrelerinin sitoplazma membranındaki moleküllere karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Lenfoid malignitelerde ilk kullanılan monoklonal antikor CD20'ye karşı geliştirilen rituksimab'tır (3,18).

Bir diğer antikor olan Campath-1H (alemtuzumab) CD52'ye bağlanır. CD52 ekspresyonu, KLL hücrelerinde CD20'ye göre daha fazladır. İlk çalışmalarda ilacın KLL'de etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak ilaç, T hücrelerini baskılayarak, fırsatçı enfeksiyonlar da belirgin artışa neden olduğu gösterilmiştir. Campath-1H, periferik kan ve kemik iliğini KLL hücrelerinden temizlemede rituksimabtan daha etkili olduğu gözlenmiştir (3,46).

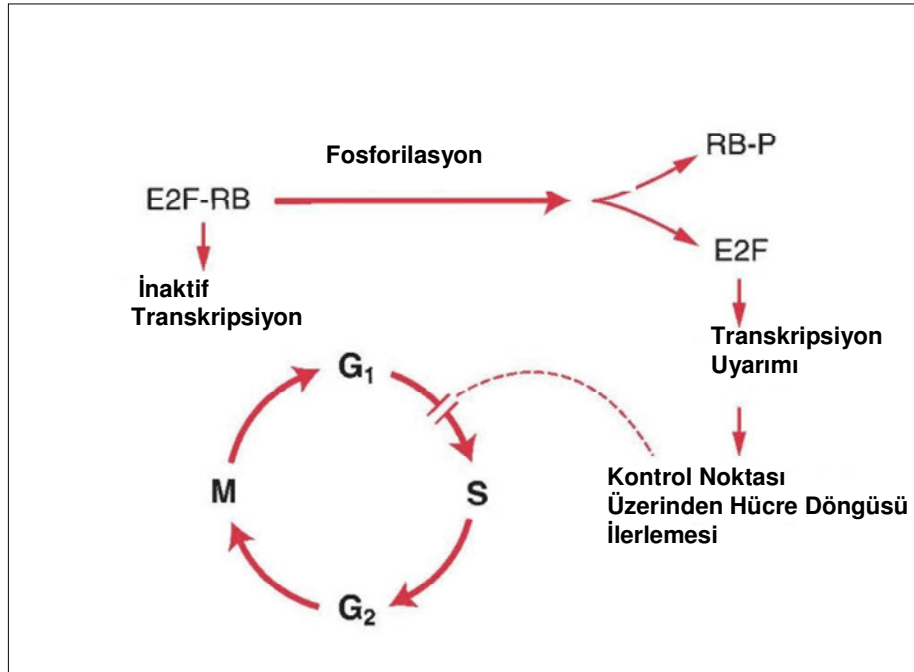
2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Kanserdeki temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır. Hücre çoğalması da genlerin kontrolü altında olduğundan genetik faktörler çeşitli kanser tiplerinde etkilidir. Bununla beraber, bazı kanser türlerinde primer faktör olarak herhangi bir anormal gen sorumlu tutulurken diğer bazı kanser türlerinde çevresel faktörler sorumlu tutulmakta ve dolayısıyla kontrolsüz hücre çoğalması sekonder faktör durumunu almaktadır. Hangi faktörden meydana gelirse gelsin, tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon veya mutasyonlar sonucu oluştuğu, bu mutasyon veya mutasyonlar sonucu da genin ekspresyonunun etkilendiği bilinmektedir (6).

Tümör baskılayıcı genler, onkogenlerin etkilerini dengeleyen ve hücrenin aşırı şekilde çoğalmasını önleyen genlerdir. Bu genler arasında, 17p13 bölgesinde yer alan *p53* geni, 13q14 bölgesinde yer alan *rb1* geni, 9. kromozomda yer alan *p16* geni, 6p21 bölgesinde yer alan *p21* geni gibi genler bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerde, kromozomal bir delesyon veya genin fonksiyonunu yitirmesine neden olabilecek bir mutasyonun varlığı, hücrede kontrolsüz bir çoğalmaya ve bu kontrolsüz çoğalmanın durdurulamamasına neden olur. Bunun sonucunda hücrenin kanserleşme riski artar (17).

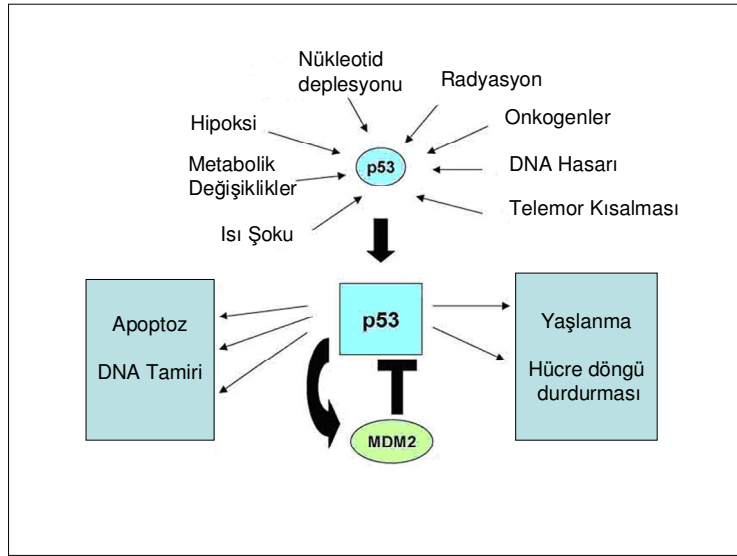
İlk bulunan tümör baskılayıcı gen olan Rb1 geni, 13. kromozomun uzun kolu üzerine yerleşmiştir ve 27 ekzondan oluşmaktadır. Rb1 geni, her hücre tipinde eksprese edilir. Şifrelediği protein pRb olarak gösterilir ve 928 amino asit uzunluğundadır. pRb hücre döngüsünü düzenlemede anahtar bir rol oynayan nükleer bir fosfoproteindir. Fosforile formu inaktif, defosforile formu ise aktiftir. Hücre döngüsünde G1→S kontrol noktasında görev yapar. Aktif formu transkripsiyon faktörlerini bağlar ve hücre döngüsünde G1→S geçişini engeller.

Son yapılan çalışmalarda, pRb proteinin E2F adlı transkripsiyon faktörü ile ilişkiye girerek hücre bölünmesini önlediği gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörü E2F, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan bazı genlerin ifadelerinin düzenlenmesinden sorumludur. E2F, pRb'ye bağlandığında inaktiftir ve hücre G1/S kontrol noktasında durur. Hücreler bu kontrol noktasında iken bir CDK/siklin kompleksi oluşur ve pRb'ye fosfat grubu ekleyerek E2F'nin serbestleşmesini ve hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar. Kansersiz hücrelerde, kromozomal delesyonlar veya mutasyonlar sonucu Rb1 geninde inaktivasyon gözlenebilir. Hücre döngüsü üzerine E2F ile pRb arasındaki ilişki Şekil 2.3'te gösterilmiştir (29).



Şekil 2-3: Hücre döngüsü üzerinde E2F ile Rb1 ilişkisi

p53 tümör baskılayıcı geni 17p53 bölgesindedir. p53 proteini nükleusta bulunur ve birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. Fizyolojik şartlarda yarı ömrü çok kısadır. DNA hasarında ekspresyonu artar ve DNA'ya bağlanarak birçok genin transkripsiyonunu stimüle ederek hücre döngüsünün G1→S geçişini engeller. Bunu CDK (cyclin dependent kinase) inhibitörü olan p21 yapımını arttırarak gerçekleştirir. Hücre döngüsü durunca, DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu arttırır. Eğer hasar onarıldıysa mdm2 geni aktive olur ve p53 fonksiyonları sonlandırılır (16,54,57). Eğer hasar onarılamazsa p53 geni hasarlı hücreyi apoptoza yönlendirir. Bu nedenle genom gardiyanı olarak da adlandırılır. İnsan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonu bulunmaktadır. p53 inaktivasyonuna çoğu olguda edinsel mutasyonlar neden olur. “Germ-line mutant” allel ile doğan bir bireyde Li-Fraumeni sendromu söz konusudur. Bu olgularda 50 yaş öncesi malignite gelişme sıklığı, toplumun diğer bireylerine oranla %25 daha fazladır (4,16).



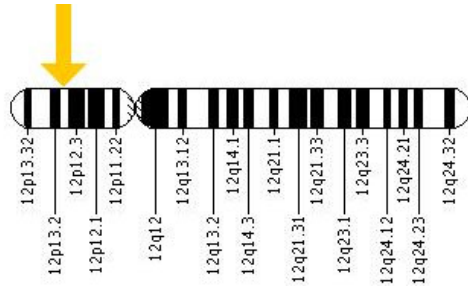
Şekil 2-4: p53 aktivasyonunu sağlayan etmenler ve p53 fonksiyonu

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda KLL'nin moleküler patogenezi henüz anlaşılmamış olsa da KLL'li hastaların %30-50'sinde kromozomal anomaliler tespit edilmiştir. Bu kromozomal değişiklikler bazen hastalıktaki temel bozukluk olmayıp sonradan ortaya çıkabilir. KLL'li hastalarda en sık gözlenen sitogenetik değişiklikler del11q22, del17p13, del13q ve trizomi 12'dir.

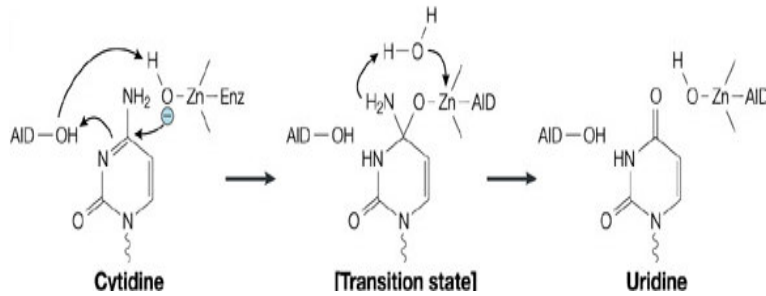
2.3. Aktivasyonla İndüklenen Sitidin Deaminaz (AID)

2.3.1. Tanım

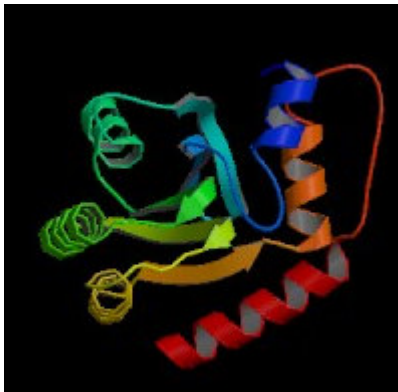
Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (“activation-induced cytidine deaminase”) (AID) geni Muramatsu ve arkadaşları tarafından 1999 yılında keşfedilmiştir. AID geni 12p13 bölgesinde lokalizedir. 5 ekzondan oluşan AID geni, 198 amino asitlik bir proteini sentezlemektedir. AID proteininin 3 boyutlu yapısı şekil 2.7’de de gösterilmiştir. AID, sitidin deaminaz ailesinin bir üyesidir ve DNA’nın yapısında bulunan sitozini (C) urasile (U) çevirir. AID etkisiyle sitozin’in urasil’e deaminasyonu Şekil 2.6’te gösterilmiştir (9,39,42,56).



Şekil 2-5: AID geni yerleşimi



Şekil 2-6: Sitozin'in Urasil'e deaminasyonu



Şekil 2-7: AID protein

2.3.2. Fonksiyon

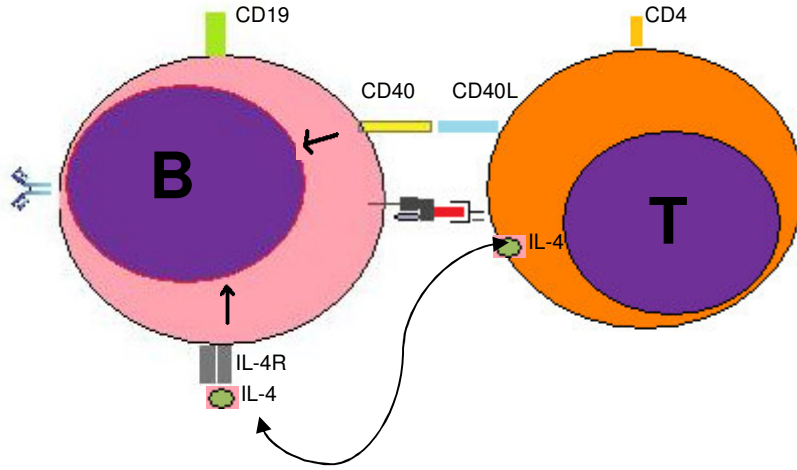
AID geni *sadece* aktive B lenfositlerinde eksprese edilir. Aktivasyonu için CD40-CD40L bağlantısı ve interlökin-4 (IL-4)'e ihtiyaç vardır. AID, aktive B lenfositlerinde hem Ig afinite matürasyonunu sağlayan somatik hipermutasyon (SHM) mekanizmasında, hem de Ig izotip dönüşümünü sağlayan "class-switch rekombinasyon" (CSR) mekanizmasında rol oynamaktadır. Bu enzimden yoksun kişilerde, izotip sınıf dönüşümü gerçekleşmemekte ve tekrarlayan fırsatçı enfeksiyonlarla karakterize 2. tip hiperimmünoglobülin M sendromu ortaya çıkmaktadır (7,35,42,45,52,56).

AID, antikor hafızası oluşumu için anahtar bir moleküldür. AID, switch bölgelerine etki ederek CSR ve değişken bölgelere etki ederek SHM'yi indüklemek için gereklidir. Antikor hafızası gelişimini sağlayan faktörler etkilerini, B hücresinde, AID ve DNA tamir enzimleri gibi faktörlerin eksprese edilmesiyle gösterirler (1,22,50).

Yapılan çalışmalar sonucunda AID'in tek zincir DNA'ya (ssDNA) özgü bir sitidin deaminaz olduğu saptanmıştır. AID'in çift zincir DNA (dsDNA) ve ya DNA-RNA hibridleri üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür (8,34).

2.3.3. Aktivasyonu İçin Gereken Yüzeyli Molekülleri

AID geni *sadece* aktive B lenfositlerinde eksprese edilir. Aktivasyonu için CD40-CD40L bağlantısı ve interlökin-4 (IL-4)'e ihtiyaç vardır. B hücresi antijeni tanıyıp uyarıldıktan sonra folikül dışına doğru göç etmeye başlar. Bu sırada antijen sunan hücreler aracılığıyla aynı antijeni tanıyan T hücresi de uyarılır, yüzeyinde CD40L belirir ve aynı zamanda IL-4 üretmeye başlar. Uyarılan bu T hücresi de foliküllerin kenarına doğru göç ederek B hücresi ile birleşir. T hücresinden salgılanan IL-4 B hücresi yüzeyinde bulunan IL-4R'ü uyararak hücre içinde transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasını ve AID geninin aktifleşmesini sağlar. CD40-CD40L bağlanması da yine B hücre içinde transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasını ve AID geninin aktifleşmesini sağlar. Her iki yolda kullanılan transkripsiyon faktörleri sırasıyla NF-KB ve JAK-STAT'dır. AID aktivasyonu için gereken yüzey molekülleri ve sitokinler Şekil 2.8'de gösterilmiştir (1,52,56).



Şekil 2-8: AID aktivasyonu için gereken yüzey molekülleri

AID aktivasyonu için IL-4, CD40L gibi T hücre etkileşimlerine ihtiyaç duyulmasına rağmen, bazı çalışmalar da AID geninin ekstra vasküler dokulardaki mikrobiyal antijenlere karşı T hücrelerinden bağımsız humoral immün yanıt oluşturan ekstra foliküler B hücrelerinde eksprese edildiğini ileri sürmektedir. Fakat bu görüş hala belirsizliğini korumaktadır.

2.3.4. Hücre İçi Yerleşimi

AID'in önemli bir kısmı B hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. Bunun ötesinde, B hücreleri sınıf çevrim rekombinasyonu için uyarıldığında gerek nükleustaki gerekse sitoplazmadaki AID düzeyleri yükselir. AID'in yüksek oranda B hücrelerinin sitoplazmasında tutulmasının nedeni, sınıf çevrim rekombinasyonu yada somatik hipermutasyonu uyarması gerekene kadar, mutasyon yapan aktivitesini kısıtlamak için olabilir (9,30,34).

2.3.5. DNA Dizileri Üzerine Etkisi

AID'nin hem SHM, hem de CSR'yi meydana getirirken hedef bölgelerde yer alan C bazlarından hangisini hedef aldığı veya belli bir DNA dizisi içinde yer alan bir C'i mi hedef aldığı yönünde yapılan çalışmalar sonucu iki farklı görüş ortaya çıkmıştır. Bir görüşe göre, AID'in belli tanıma dizileri üzerine etki ettiği ve hedef bölgelerde özellikle 5'-WRCY-3'/ 5'- RGYW DNA dizilerinde yer alan C bazını hedef aldığı düşünülmektedir. Bu DNA dizileri içinde ise özellikle 5'- AGCT -3'/ 5'- AGCT -3' tekrar dizilerini tanıdığı ve bu bölgelerde yer alan C bazını hedefleyerek deaminasyona uğrattığı düşünülmektedir. Diğer bir görüşe göre ise, AID aktivitesi herhangi bir tanıma

sekansına sahip değildir. Çünkü Ig V ya da C bölgesi herhangi bir ortak DNA dizisi içermez. İlaveten AID'in bağlanma spesifitesinin açıklığı tam olarak da gösterilememiştir (5,10,33,41).

2.3.6. Fosforilasyonu

AID aktivitesi için, CD40-CD40L, IL-4 gibi moleküllerin yanı sıra, hücre içinde ekspresyonunu takiben fosforilasyon mekanizması ile düzenlenebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. 198 aminoasitlik AID proteinin, serin 38 ve treonin 140 bölgeleri fosforilasyon bölgeleridir. Bu bilgiyi doğrulamak amacıyla serin 38 ve treonin 140 yerine alanin taşıyan “knock-out” fareler yaratılmıştır. Serin 38 yerine alanin taşıyan mutant fare de AID, hem CSR, hem de SHM için wild tipe göre aktivitesinin ancak %20-30'unu gösterebilmiştir. Treonin 140 yerine alanin taşıyan mutant farede de hem CSR, hem de SHM aktivitesinde azalma gözlenirken, bu azalmanın Serin 38 yerine alanin taşıyan mutant fareden daha azdır. Bu bilgi ışığı altında AID hücre içinde eksprese edildikten sonra fosforilasyona uğradığı gözlenmiştir. Fakat bunun ne işe yaradığı pek anlaşılamamıştır (5,55).

2.3.7. N Terminal ve C Terminal Bölgeleri

AID aktivitesi ve fonksiyonları üzerine yapılan son çalışmalar, SHM ve CSR'nin birbirinden bağımsız süreçler olduğunu ve birbirlerinin önkoşulu olmadıklarını ortaya koymaktadır. SHM ve CSR'de, AID proteininin farklı domainlerinin sorumlu olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Buna göre AID proteinin N terminal bölgesinin SHM'de rol alırken, C terminal bölgesinin CSR'de rol aldığı ileri sürülmektedir (15).

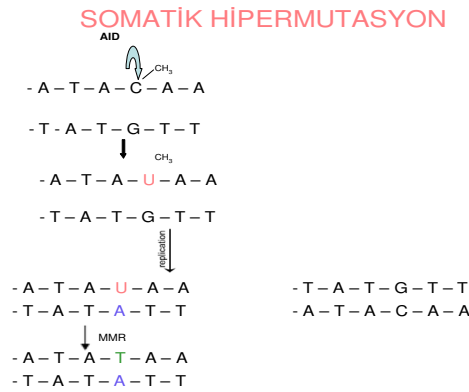
2.3.8. Splice Varyantları

AID'in hem doğal transkriptinin, hem de birkaç splice varyant formunun B hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu splice varyantların kesin fonksiyonları henüz anlaşılamamıştır.

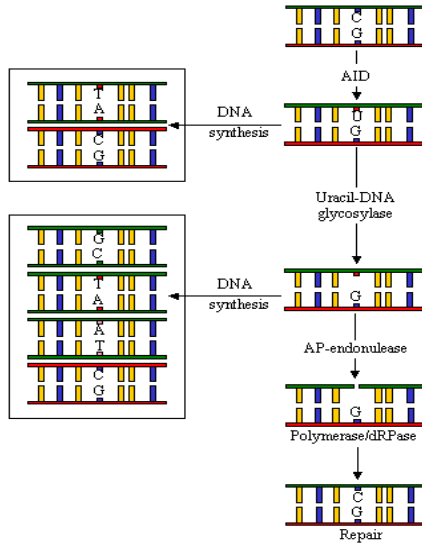
2.3.9. Somatik Hipermutasyon (SHM)

Ig afinite matürasyonu esnasında; B lenfosit'in Ig değişken (variable) bölgelerinde nokta mutasyonu yapan AID, antikorun antijene olan afinitesinde artış meydana gelmesini sağlayarak, antijene daha güçlü bir şekilde bağlanan antikorların üretilmesini sağlamaktadır. Bu sayede, aynı enfeksiyon etkeniyle yineleyen

devreye girer ve urasil'in koparıldığı boşluğa bir baz ilave eder ve SHM gerçekleşmiş olur. Eğer UNG enzimi etkisinden sonra hücre replikasyona girmezse “AP-endonükleaz” enzimi devreye girer ve urasil'in çıkarıldığı bölgede bir kırık oluşturur. Daha sonra uygun tamir mekanizmaları ile bu bölgeye yeniden sitozin bazı getirilir ve DNA ilk baştaki yapısını korumuş fakat SHM'ye uğramamış olur. AID'in SHM'deki rolü Şekil 2.10 ve Şekil 2.11'de gösterilmiştir (21,38,43,56).



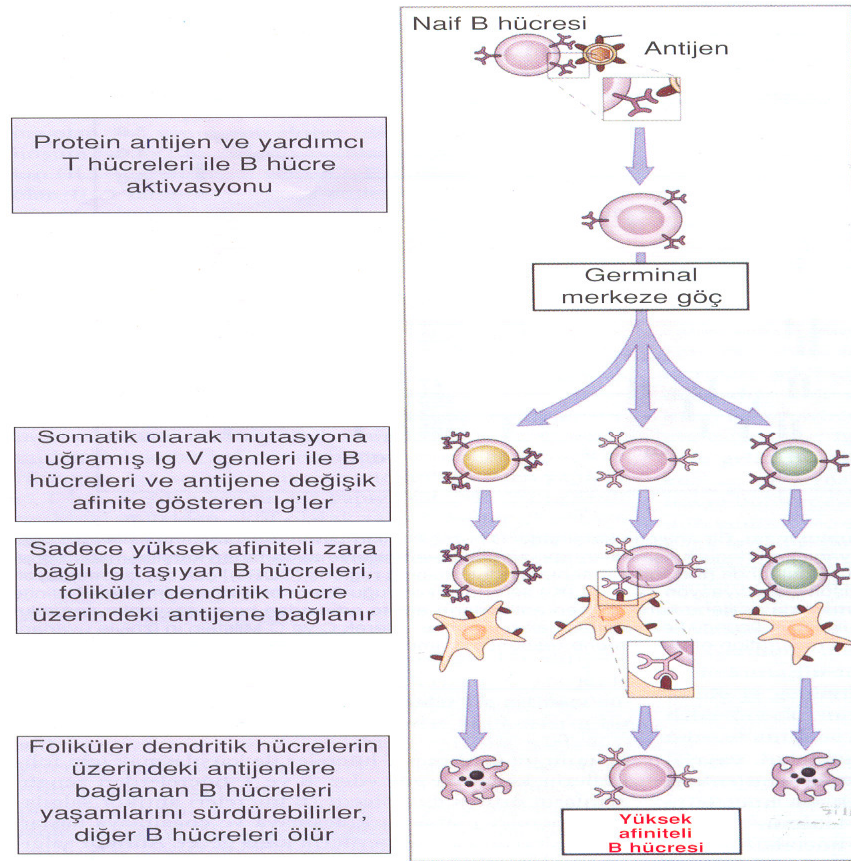
Şekil 2-10: SHM'de AID'in rolü



Şekil 2-11: SHM

G:C yerine A:T değişikliği ile gerçekleştirilen somatik hipermutasyon işlemi sonucunda, antijene hem daha güçlü, hem de daha zayıf bağlanan antikorlar oluşabilir. Enfeksiyon organizmada devam ederken, enfeksiyona yanıt veren hem ilk hücre klonu, hem de afinite matürasyonuna uğramış hücre alt klonları enfeksiyon etkenine karşı yanıt vermeye devam ederler. Enfeksiyon sonlanmaya başlayıp organizmada enfeksiyon

etkeni azalmaya başladığında, B hücreleri bağlanabileceği antijen bulamamaya başlar. Antijen uyarımından yoksun olan B hücreleri hücre içinde aktifleşen apoptoz mekanizmaları ile ölürlür. Bu şekilde, enfeksiyon sonlanırken ona yanıt veren B hücrelerinde, apoptoz mekanizması ile sayının azalması ve enfeksiyonun sonlandırılması gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında ortamda az bulunan antijeni bağlama olasılığı, afinite matürasyonu gerçekleştirmiş ve antijene daha güçlü bağlanan antikora sahip hücrelerde daha fazla olacağından, somatik hipermutasyon ile afinite matürasyonu kazanmış hücrelerin hayatta kalma ve enfeksiyon bitimi ile birlikte hafıza hücrelerine dönüşme şansı daha yüksek olacaktır. Naif B hücresinin yüksek afiniteli B hücreğine dönüşümü Şekil 2.12’de gösterilmiştir (1,35).

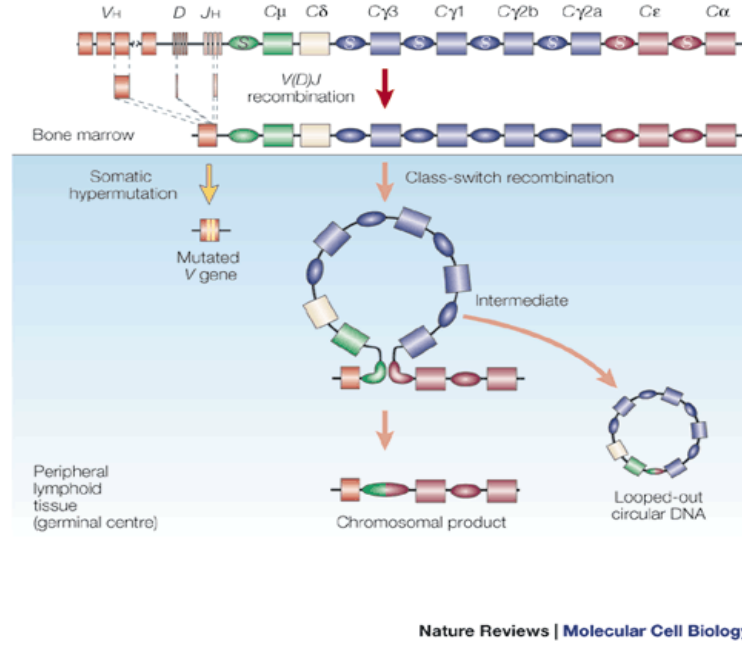


Şekil 2-12: Naif B Hücresinin Yüksek Afiniteli B hücreğine Dönüşümü

2.3.10. İzotip Sınıf Dönüşümü (CSR)

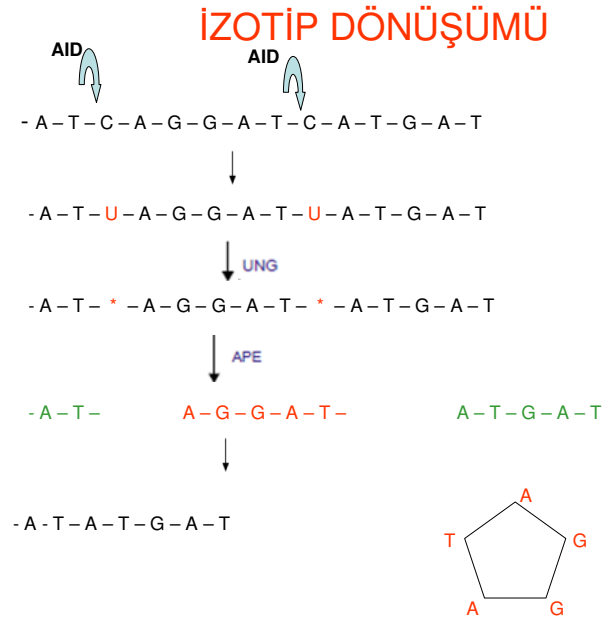
Ig izotip dönüşümü esnasında, AID Ig "Constant" sabit (C) bölgelerinde yer alan sitozinleri deaminasyona uğratarak urasile (U) çevirir ve DNA kırılma bölgeleri için hedef noktaları oluşturur. Bu sayede IgM sınıfı antikorların diğer Ig sınıfı antikorlara (IgM→IgG, IgA, IgE) dönüşümü sağlanır. Ig izotip dönüşümü sayesinde antikorların,

farklı enfeksiyon etmenlerine karşı daha hızlı ve etkili yanıt oluşturabilecek Ig sınıflarına dönüşümü gerçekleştirilmiş olur. İzotip dönüşümünü Şekil 2.13’de gösterilmiştir (53,56).



Şekil 2-13: Ig İzotip Dönüşümü

Ig izotip dönüşümünde B hücresi, T hücresi ile CD40-CD40L bağlantısı kurar ve bu bağlantı ile B hücre içinde NF- κ B sinyal yolu aktiflenir. Ayrıca ortamda yer alan uygun sitokinler yardımıyla B hücre içinde JAK-STAT sinyal yolu da aktiflenir. Bu sinyal yolları sayesinde AID geni ekspresyonu sağlanmakta ve AID enzimi aktif hale geçmektedir. Aktif hale geçen AID enzimi, izotip dönüşümünde Ig C bölgelerinde yer alan sitozinleri deamine ederek, bunların urasile dönüşünü gerçekleştirmektedir. Bu deaminasyon işlemi genellikle Ig C bölge lokuslarında gerçekleşmektedir (C_μ, C_α, C_γ). AID enzimi bu bölgelerde yer alan sitozinleri deamine ederek, bu bölgelerin UNG (Urasil DNA glikozilaz) enzimi tarafından tanınmasını sağlar. UNG enzimi, bu urasil bölgelerini tanıyarak buralarda yer alan urasilleri DNA bölgesinden çıkartır. Urasilin hedef bölgeden çıkarılmasını takiben bu bölgeler, Apirimidinik Endonüklez (APE) enzimi tarafından kesilir. C_μ ve diğer C bölge lokuslarında DNA kırıkları oluşturulur. Bu kırıklar sonucu C_μ bölgesi ve arada kalan diğer bölgeler loop formu oluşturularak ortamdan uzaklaştırılırken diğer C gen bölgesi C_μ yerine bağlanarak izotip dönüşümün gerçekleşmesi sağlanır. AID’in, CSR’deki rolü Şekil 2.14’da gösterilmiştir (1,21,26,34,47,56).



Şekil 2-14: CSR’de AID’in rolü

2.3.11. AID Hastalık İlişkisi

AID geni üzerinde daha önce yapılmış olan çalışmalar sonucunda, KLL’de immünglobülin ağır zincir değişken bölgesinde (IgV_H) somatik hipermutasyonun olup olmamasına bağlı olarak hastalık klinik seyir açısından iki alt gruba ayrılmıştır. IgV_H genlerinde somatik hipermutasyon saptanmayan KLL’li hastaların, IgV_H bölgelerinde somatik hipermutasyon gözlenen KLL’li hastalara göre daha kötü klinik seyre sahip oldukları bilinmektedir (30,45).

Son yıllarda KLL’li hastalarda AID ekspresyon düzeyi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar neticesinde KLL’li hastalarda bu genin ifadesinde sağlıklı bireylere göre anlamlı artışlar saptanmıştır. Hastalar da evrenin ilerlemesiyle beraber AID ekspresyonunda anlamlı artışlar olduğu gösterilmiştir (20,39,45).

IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olan hastalarda AID ekspresyonunun çok az veya hiç olmadığı gözlenirken, IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olmayan hastalarda AID ekspresyonunun daha fazla olduğu görülmüştür. IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olmayan ve AID ekspresyonu yüksek olan hastalarda prognozun diğer hastalardan daha kötü olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte AID geni üzerine son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, AID enziminin sadece IgV_H ve Ig C bölgelerinde değil, aynı zamanda diğer non-immünglobülin genlerde de mutasyonlara ve kırıklara yol açabileceği ortaya konmuştur (44,48).

AID mutasyonlarının hedefi Ig genleriyle sınırlanmamıştır, tahminen birkaç proto-onkogen mutasyona uğrar ve AID eksprese eden B hücreli tümörlerde Ig lokusuyla transloke olur. Tümör gelişimi için kritik olan IgH-Myc gibi kromozomal translokasyonların gerçekleşmesi için AID gerekliliği AID-yoksun farelerde gösterilmiştir (28,47,53).

Özellikle AID⁻ knock-out fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, Burkitt lenfoma gelişiminde rol alan IgH/c-myc translokasyonlarında, bu enzimin aktif rol oynayabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Yine *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu enfeksiyona bağlı olarak ortaya çıkan mide kanserlerinde p53 mutasyonlarından AID enziminin sorumlu olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Bazı AID enzimi izoformlarının, bcr/abl translokasyonu bulunan hastalarda daha fazla eksprese edildiği ve bu enzim izoformları ile hastalık oluşumunda rol alan bcr/abl translokasyonları arasında da ilişki olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (28,36,37,53).

İlaveten transgenik sistemlerde çeşitli organlarda AID'in aşırı ekspresyonu gen mutasyonları ve translokasyon sıklığıyla tümör gelişimine neden olmaktadır. Hayvan modellerinde B hücreli tümör gelişimi insidansı, AID yokluğu şartları altında azalmıştır. İlginç olarak philadelphia kromozomu tarafından kodlanan bcr-abl1 kinaz AID ekspresyonunu indükleyebilir ve daha kötü prognoza sahip ALL oluşmasına neden olabilir. Çeşitli B hücreli lenfoma ve lösemilerde AID ekspresyonu çalışmaları, AID ekspresyonu ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Ortak sonuçlar göstermiştir ki, tümör genezisde AID gereklidir ve AID, B hücreli lenfoma ve lösemili hastalığın prognozunu etkiler (28,31,41),

AID ekspresyonunu aktive B hücresinde sınırlandırılmasına rağmen, birçok hücre tipinde kazara salınan AID ve takip eden DNA hasarları rapor edilmiştir ve önerilmektedir ki AID daha geniş hücre çeşidinden kaynaklanan tümör gelişimini etkileyebilir. Hem virüs ya da bakteri enfeksiyonuyla hem de proinflatuar sitokinlerin stimülasyonu, AID gen ekspresyonunu indükleyebilir. EBV virüs

enfeksiyonu, hücresel CD40 talidi yapan LMP-1 viral protein yoluyla AID ekspresyonunu indükleyebilir. Abelson murine lösemi virüs (Ab-LMV) tarafından kemik iliği enfeksiyonu B hücrelerinde AID ekspresyonunu indükleyebilir (41).

Ayrıca bazı epitelyum hücreleri, AID indüksiyonuna meyillidirler. Endo ve ark. TNF- α tedavisi ve/veya HCV genom transenfeksiyonu insan hepatositlerinde AID'i indüklediğini bulmuşlardır. Dikkat çekici şekilde gastrik kanser gelişimine neden olan H.pylori enfeksiyonu, AID ekspresyonunu indükler ve gastrik epitelyum hücrelerinde p53 tümör süpresör geninde mutasyonlara sebep olur. Bu da AID ekspresyonu ile bakteri enfeksiyonu arasında ilişkiyi ortaya koyar (36,37,41).

AID'in, çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda kromozomal translokasyonlara neden olabileceğini ve hastalığın klinik seyrini etkileyebileceğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. KLL gelişiminde en önemli özelliklerden biri, KLL hücrelerinin apoptoz mekanizmalarından kurtularak, hücre ölümlerinin gerçekleşmemesi ve yoğun hücre birikimidir. KLL'li hastalarının bir bölümünde, apoptoz mekanizmasında rol oynayan özellikle 17p13, 11q22.3 ve 13q34 kromozom bölgelerinde delesyonların varlığı gözlenmektedir (45).

Çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda translokasyonlar için kırılma bölgeleri oluşturduğu düşünülen AID enziminin, KLL'li hastalarda, hastalığın klinik seyri ile ilişkili 17p13, 11q22.3 ve 13q34 DNA bölgelerinde kırılma noktaları oluşturabileceği ve KLL'li hastalarda görülen bu bölgelerin delesyonlarından AID geninin sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada 17p13, 11q22.3 ve 13q34 delesyonu olan ve olmayan KLL'li vakalarda AID gen ekspresyon düzeyleri araştırılarak, bu delesyonlar ile AID gen ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki kurulmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Çalışmamızda Eylül 2010 ve Mart 2011 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Hematoloji polikliniğinde görülen 44 KLL hastası dahil edilmiştir. 50 sağlıklı erişkin ile kontrol grubu oluşturulmuştur. Çalışma grubundaki hastalara, çevre kanındaki morfolojik olarak olgun görünümlü ve immünofenotipik olarak CD5 ve CD19 ifade eden lenfosit sayısının $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ 'ün üzerinde olması ile KLL tanısı kondu.

Rutin incelemeler sırasında Flouresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile 17p13, 11q22.3, 13q14 ve 13q34 bölgelerinin analizi yapılmış ve bu bölgelerde delesyonu olan ve olmayan hastalar çalışmaya dahil edildi.

3.2. Metod

KLL hastaları ve sağlıklı erişkin kontrol grubunun periferik kan örneklerinden öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra bu örneklerden cDNA elde edildi. Hedef gen (AID) ve referans gene (HPRT1) ait primer ve probalar kullanılarak Q RT-PCR (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ile hedef ve referans gene ait cDNA'lar çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülerek kaydedildi.

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen periferik kanlardan High Pure RNA izolasyon kiti (Roche) kullanılarak kitin prosedüründe belirtildiği şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Her hasta için üçer tane 1,5 ml'lik eppendorf tüpü hazırlandı.
2. Her tüpe 600 µl hasta kanı konuldu.
3. Tüplerin her birine eritrositleri parçalamak için 800 µl "lysis buffer" (LB) ilave edildi. Tüpler çalkalanarak karıştırıldı.
4. LB'nin etki etmesi için örnekler 15 dakika inkübe edildi.
5. Örnekler 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüjden çıkan tüplerdeki süpernatant kısımlar pipet yardımı ile ortamdan uzaklaştırıldı. Tüplerin dibinde lökositler kaldı.

7. Her hasta için hazırlanan üç eppendorf tüpün dibinde yer alan lökositler, pipet ile tek bir tüp içine toplandı.
8. Tek tüp içine toplanan lökositlerin üzerine 1000 µl LB ilave edildi. Ortamdaki lökositleri tüpün dibinden kaldırmak için tüpler çalkalandı.
9. 2000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısımları döküldü.
11. Tüplerin üzerine 500 µl LB ilave edildi. Tüpler çalkalandı.
12. 2000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Tüpler santrifüjden çıkarıldı. Süpernatant kısımları döküldü.
14. Peletlerin üzerine 200 µl LB ilave edildi ve çalkalandı.
15. Lökositlerin hücre zarında yer alan hidrofilik ve hidrofobik kısımları birbirinden ayırarak hücre zarını yok etmek için tüplere 400 µl lysis/binding buffer ilave edildi. Tüpler çalkalandı.
16. Örnekler 1 dakika inkübe edildi.
17. Tüpler 1–2 dakika “vorteks”lendi (Vorteks sonrasında tüpler içinde pıhtı oluştuğunda, pipet yardımı ile pıhtı ortamdan uzaklaştırıldı).
18. Ayrı bir “stand”e hasta başına 2 tane alt tüp koyuldu. Birinci alt tüplerin içine elektriksel alan yaratarak nükleik asitleri tutan pozitif yüklü filtreli tüp konuldu.
19. Vorteks sonrasında 1,5 ml’lik eppendorf tüpün içindeki karışım pipet yardımı ile alınarak filtreli tüpün içine yavaşça ilave edildi.
20. Örnekler 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
21. Alttaki tüp atıldı. Filtreli tüpler ikinci alt tüpe konuldu.
22. Örneklerde bulunan DNA’yı parçalamak için bir eppendorf tüpün içine hasta başına 10 µl DNaz ve 100 µl DNaz inkübasyon tamponu konuldu.
23. Filtreli tüpün içine hazırlanan karışımdan 110 µl ilave edildi.
24. Örnekler 15 dakika inkübe edildi.
25. Inkübasyon sonrası her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu olan “wash buffer” (yıkama tamponu) ilave edildi.
26. Örnekler 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi.
27. Alt tüplerin içinde biriken solüsyonlar döküldü.
28. Filtreli tüplerin üzerine 600 µl ikinci yıkama solüsyonu olan “wash buffer II” ilave edildi.

29. Örnekler 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi.
30. Alt tüpler içindeki solüsyonlar döküldü.
31. Tüpler 13000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
32. Ayrı bir stand’e her hasta için bir tane 1,5 ml’lik eppendorf tüp konuldu.
33. Santrifüjden çıkan örneklerin alt tüpleri atıldı. Filtreli tüpler 1,5 ml’lik yeni eppendorf tüpler içine konuldu.
34. Her tüpe pozitif yüklü filtreye bağlanan negatif yüklü DNA’yı filtreden koparıp süzmek için filtrenin elektriksel alanını bozan elüsyon solüsyondan 50 µl konuldu.
35. Örnekler 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
36. Filtreli tüpler atıldı.
37. Elde edilen örneklerin RNA yoğunluğu Nanaodrop’ta spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.2. RNA Yoğunluğunun Ölçümü

Hasta ve kontrollerden elde edilen RNA’ların, cDNA sentezi öncesinde yoğunlukları NanoDrop 2000c (Thermoscientific) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ölçüm öncesinde blank olarak elution solüsyonu kullanıldı. 2 µl elution buffer Nanodrop’ta ölçüldü, sonraki ölçümler için cihaz ayarlandıktan sonra izole edilen RNA’lardan 2 µl alınıp Nanodrop’a konuldu. Hazırlanan örneğin 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik dansitesi ölçüldü ve konsantrasyonları hesaplandı. Örnekler -80°C’de saklandı.

3.2.3. cDNA Sentezi

Kontrol ve hastalara ait RNA örneklerinden cDNA elde etmek için ticari bir kit Fermentas, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanıldı ve işlemler, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. 20 µl’lik sentez reaksiyonu için eklenen bileşenler, miktarları ve hazırlanma şekli Tablo 3.1 ’de verildi.

Total RNA	1 µg
Oligo(dT) primer	1 µl
Nükleazsız steril su	11 µl’ye tamamlanacak kadar
Toplam Volüm	11 µl

Tablo 3-1: cDNA sentez bileşenleri

Hazırlanan örnekler içinde oluşabilecek gerek RNA-RNA hibridlerini gerek RNA'nın kendi üzerinde oluşabilecek katlanmalarını engellemek ve saf tek zincir RNA elde etmek için örnekler thermcycler cihazında 65°C'de 5 dakika bekletildi.

Bu işlemten sonra cihazdan çıkarılan her bir örneğin üzerine Tablo 3.2'de gösterilen karışımdan 9 µl ilave edildi.

5X Reaction Buffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase	2 µl
Ribolock RNase İnhibitor	2µl
Total Volüm	9 µl

Tablo 3-2: cDNA sentez bileşenleri -2

Hazırlanan örnek tüpleri cDNA sentezi için 65°C'de 5 dakika, 37°C'de 60 dakika ve 70°C'de 5 dakika thermal cycler cihazında tutuldu.

3.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Hedef gen olan AID geninin periferik kandaki anlatım düzeyini belirlemek için AID DNA'sına özgün primerler (TGGACACCACTATGGACAGC ve GCGGACATTTTGAATTGGT) ve FAM (6-karboksiflorescein) işaretli prob, "Probe Finder 2.45" yazılımı ile tasarlandı (ENST00000229335) ve sentezletirildi. Referans gen Hipoksantin fosforiboziltransferaz 1 (HPRT1) için de primer (GACCAGTCAACAGG GGACAT ve GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG) ve prob tasarlanıp sentezletirildi. (ENST00000298556.7)

Tablo 3.3 'te belirtilen PZR bileşenleri ile hazırlanan 20 µl'lik reaksiyon karışımı Tablo 3.4'de verilen çoğaltım programı ile "LightCycler 480" (Roche) cihazı kullanılarak uygulandı.

PZR Bileşenleri	Volüm
Su	4 µl
Light Cycler 480 Probes Master	10 µl
Real Time Ready Assay	1 µl

cDNA	5 µl
Total Volüm	20 µl

Tablo 3-3: PZR bileşenleri

Program Türü	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	10 saniye	45
Bağlanma	60	30 saniye	
Uzama	72	1 saniye	
Soğuma	40	30 saniye	1

Tablo 3-4: PZR döngüleri

Her deneyde, yaklaşık miktarları önceden bilinen kontrol cDNA'ları da kullanılarak PZR verimi hesaplandı. Hedef (AID) ve referans gene (HPRT1) ait çoğaltılan cDNA'ların miktar değerlendirmesi yapıp farklılık oranları nicel olarak ortaya koyuldu.

3.2.5. Gen Anlatım Düzeylerinin Tespiti

cDNA' ları elde edilmiş olan genlerin anlatım düzeylerindeki değişiklikler Taqman hidroliz probları kullanılarak RT-PZR yöntemi ile ve LC480 cihazında (Light Cycler ® 480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science, İstanbul-Turkey) incelenmiştir. Gen anlatımlarındaki değişimleri inceleyebilmek için kullanılan RT-PZR yöntemi için öncelikle iki farklı karışım bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Primer-Probe Mix olan ve içinde bir gen için seçilen iki primeri ve bunlarla ilişkili olan floresan ışığa vereen hidroliz probu içeren karışım. Diğeri ise master mix olarak bilinen ve

içinde bir PZR için gerekli olan Mg, dNTP ve Buffer içeren karışım. Her bir PZR reaksiyonu için 96 kuyu içeren plaklar kullanıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde Mann-Whitney U, Unpaired-t ve Anova testleri kullanıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Eylül 2010 ve Mart 2011 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi İç hastalıkları A.D Hematoloji polikliniğinde tedavi gören 45 KLL hastası dahil edilmiştir. 50 sağlıklı erişkin ile kontrol grubu oluşturulmuştur. KLL hastalarının medyan yaşı 61 (42-73) olarak bulundu. Kontrol grubunun medyan yaşı 38 olarak bulundu. KLL'li hastaların 25'i (%55) erkek, 20'si (%45) kadındı. Kontrol grubunun 25'i erkek (%50) ve 25'i (%50'si) kadındı. Binet evrelemesine göre 33 hasta (%73) A, 4 hasta (%9) B ve 8 hasta (%18) C evresindeydi. Rai evrelemesine göre ise 21 hasta (%47) O, 10 hasta (%22) I, 6 hasta (%13) Rai II, 5 hasta (%11) III ve 3 hasta (%7) IV evresindeydi.

	Hasta Sayısı	%
Cinsiyet		
Kadın	20	45
Erkek	24	55
Binet Evre		
Evre A	33	73
Evre B	4	9
Evre C	7	18
Rai Evre		
Rai 0	21	47
Rai I	10	22
Rai II	6	13
Rai III	5	11
Rai IV	2	7

Tablo 4-1: KLL'li hastaların klinik özellikleri

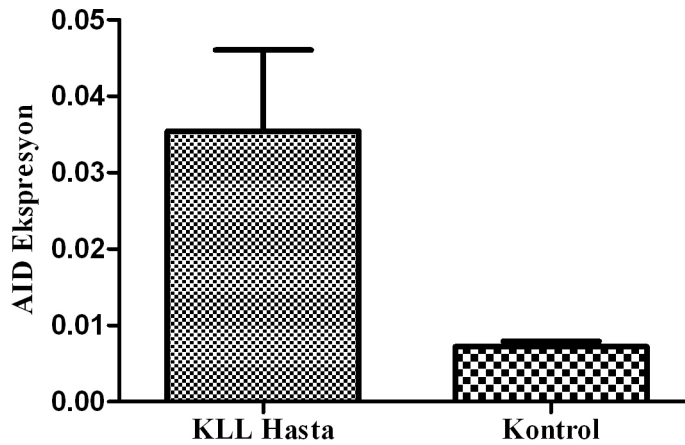
	Hasta sayısı
Del p53	5
Del 11q22.3	4
Del 13q14	16
Del 13q34	4
Delesyonu Olmayan	22

Tablo 4-2: KLL'li hastaların sitogenetik durumları

Çalışmamızda hem KLL'li hastaların, hem de sağlıklı kontrollerin hedef gen olan AID ve kontrol gen olan HPRT1 gen ekspresyon düzeyleri eş zamanlı kantitatif RT-PCR cihazı ile ölçüldü. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan karşılaştırmalı Ct metodu ile bir internal kontrol (HPRT1) kullanılarak PCR'ın üstselsel fazında amplifikasyonlar karşılaştırılarak gen ifade düzeyleri yorumlandı.

4.1. Hasta – Kontrol Grubu

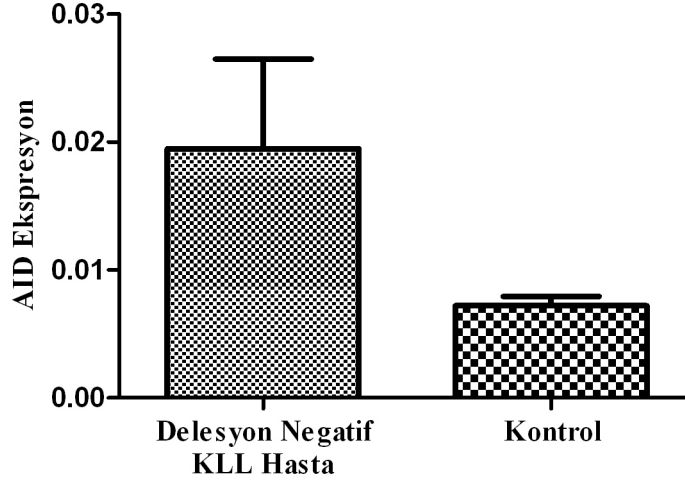
Çalışmaya alınan 44 KLL'li hasta ile 50 sağlıklı kontrol arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (p: 0,2967)



Tablo 4-3: KLL'li hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı

4.2. Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu

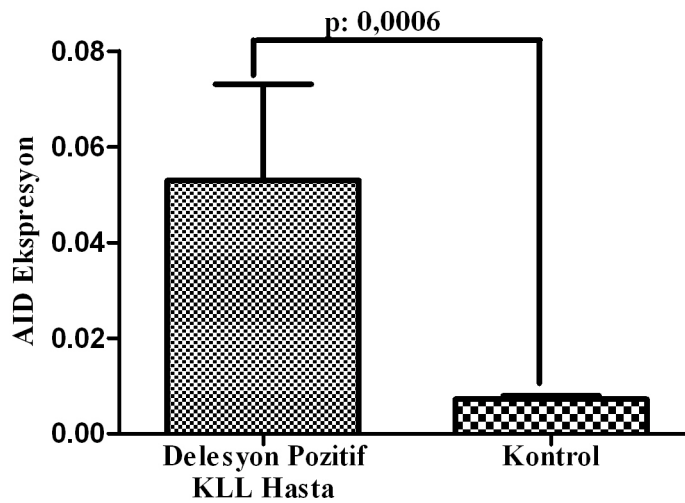
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan delesyonu olmayan 22 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p: 0,1652$).



Tablo 4-4: Delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı

4.3. Delesyonu Olan Hasta – Kontrol Grubu

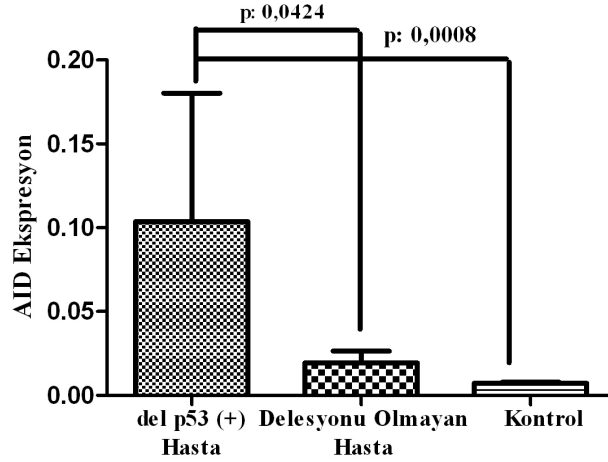
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan delesyonu olan 22 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p: 0,0006$).



Tablo 4-5: Delesyonu olan hasta - kontrol grubu AID ekspresyon farkı

4.4. 17p53 Delesyonu Olan– Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu

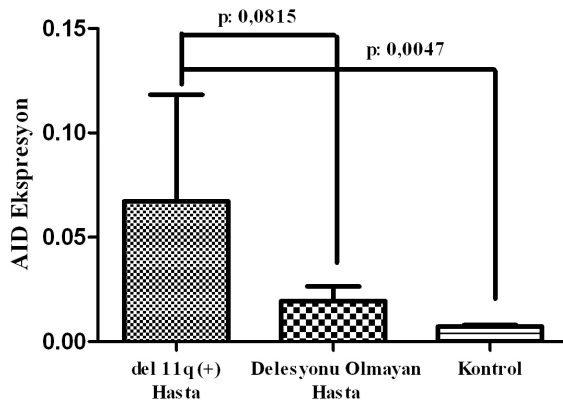
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan p53 delesyonu olan 5 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p: 0,0008$). p53 delesyonu olan 5 hasta ile delesyonu olmayan 23 hasta arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p:0,0424$).



Tablo 4-6: p53 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol Grubu

4.5. 11q22.3 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu

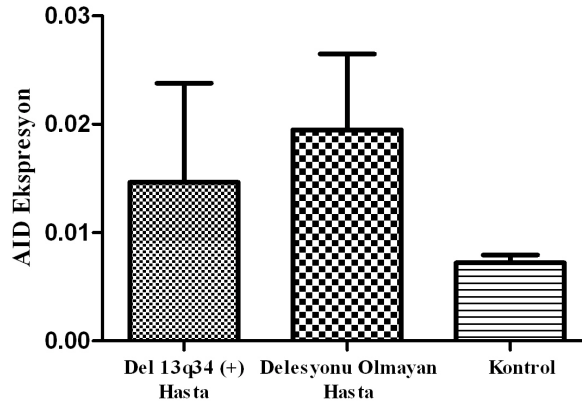
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan 11q22.3 delesyonu olan 4 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p: 0,0047$) 11q22.3 delesyonu olan 4 hasta ile delesyonu olmayan 22 hasta arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlam sınırında bulundu ($p: 0,0815$).



Tablo 4-7: 11q22.3 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu

4.6. 13q34 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu

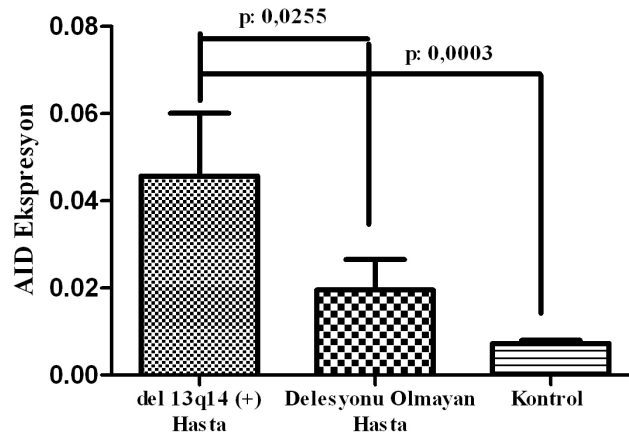
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan 13q34 delesyonu olan 4 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (p: 0,9473) 13q34 delesyonu olan 4 hasta ile delesyonu olmayan 22 hasta arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p:0,6395).



Tablo 4-8: 13q34 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu

4.7. 13q14 Delesyonu Olan – Delesyonu Olmayan Hasta – Kontrol Grubu

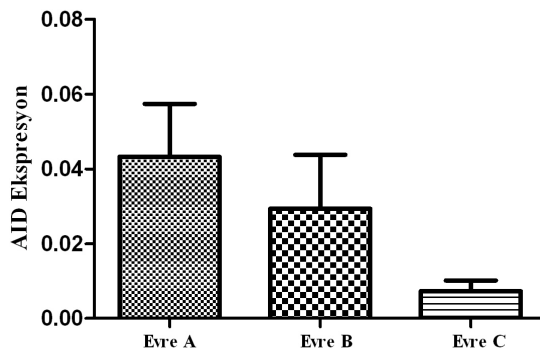
Çalışmaya alınan 44 KLL’li hastadan 13q14 delesyonu olan 16 hasta ile kontrol grubu arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. (p: 0,0003) 13q14 delesyonu olan 16 hasta ile delesyonu olmayan 22 hasta arasındaki AID ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p: 0,0255).



Tablo 4-9: 13q14 delesyonu olan – delesyonu olmayan hasta - kontrol grubu

4.8. Binet Evre Sistemine Göre Hasta Gruplarının Karşılaştırılması

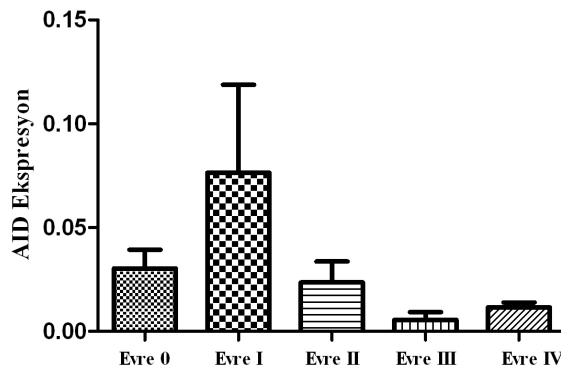
Çalışmaya alınan 44 KLL'li hasta Binet evreleme sistemine göre sınıflandırılan (evre A: 33 hasta, evre B: 4 hasta, evre C: 7 hasta) hastalar arasındaki AID ekspresyon düzeyi karşılaştırıldı. Evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p: 0,1827$). Evre A'daki hastalar ile Evre B'deki ve Evre C'deki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı. (Sırasıyla $p: 0,5089$, $p: 0,1214$) Evre B'deki hastalar ile Evre C'deki hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamadı ($p: 0,1091$).



Tablo 4-10: Binet evre sistemine göre hasta grupları arasındaki AID ekspresyon farkı

4.9. Rai Evre Sistemine Göre Hasta Gruplarının Karşılaştırılması

Çalışmaya alınan 44 KLL'li hasta Rai evreleme sistemine göre sınıflandırılan (evre 0: 21 hasta, evre I: 10 hasta, evre II: 6 hasta, evre III: 5 hasta, evre IV: 2 hasta) hastalar ile 50 sağlıklı kontrol arasındaki AID ekspresyon düzeyi karşılaştırıldı. Evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p: 0,1785$).



Tablo 4-11: Rai evre sistemine göre hasta gruplarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

B-KLL kuzey yarım kürede en sık görülen lösemi tipidir. Hastalık monoklonal B hücrelerinin kemik iliği ve periferik kanda birikimiyle karakterizedir. Hastalık, B-KLL hücrelerinin aşırı çoğalmasından değil bozulmuş apoptoz mekanizmaları sonucu hücrelerin G0/G1 fazında durarak birikimiyle karakterizedir (2,40).

KLL'nin klinik seyri oldukça değişken olup önceden tahmin edilmesi zordur. Hastaların büyük bir kısmına erken evrede tanı konulmaktadır. Erken evrede tanı konulan hastalar genellikle tedavi edilmezler. Diğer hastalarda ise tedavi uygulanır (30).

Erken evredeki hastaların belli bir bölümünde hastalık hızla ilerlemekte ve tedaviye gereksinim duyulmaktadır. Erken evredeki hastaların hangisinde prognozun kötüye gideceği ve tedaviye ne zaman başlamak gerektiği önemlidir. KLL'de kullanılan Rai ve Binet evreleme sistemleri prognoz açısından bilgi vermekle birlikte sonraki klinik seyir açısından gruplamada yetersizdir. Bu sebeple KLL'de evreleme sistemleri dışında yeni prognoz kriterlerinin saptanması oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir (20,40).

IgV_H mutasyon durumu, CD38 ekspresyonu, ZAP-70, β 2 mikroglobülin ve sitogenetik değişiklikler prognoz takibinde yeni kriterler olarak kullanılmaktadır. Klinik evreden bağımsız olarak IgV_H mutasyon durumu bunların içinde en iyi belirteç olarak gözükmemektedir. IgV_H genlerinde mutasyon olan hastalarda ortalama sağkalım yaklaşık 25 sene iken, mutasyon gözlenmeyen hastalarda bu süre ortalama 8 yıldır. Bu yeni kriterler prognoz takibinde kullanılmalarına karşın tek başlarına kesin bir belirteç değildir (20).

AID *sadece* aktive B lenfositlerinde eksprese edilen bir gendir. AID, antikor hafızası oluşumu için anahtar bir moleküldür. AID, “switch” bölgelerine etki ederek CSR ve değişken bölgelere etki ederek SHM'yi indüklemek için gereklidir (7,52).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar da AID ekspresyonunun KLL'li hastalarda anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. İleri evredeki hastalarda bu genin ifadesinin erken evredeki hastalardan daha fazla olduğu yönünde yeni bulgular bulunmaktadır. IgV_H mutasyonun olup olmamasına bağlı olarak hastalık klinik seyir açısından iki alt gruba ayrılmıştır. IgV_H genlerinde somatik hipermutasyon saptanmayan hastalar, IgV_H

bölgelerinde somatik hipermutasyon görülen hastalara göre klinik olarak daha kötü seyreder. IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olan hastalar da AID ekspresyonunun çok az veya hiç olmadığı görülürken, IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olmayan hastalarda AID ekspresyonunun daha fazla olduğu görülmüştür. IgV_H bölgelerinde somatik mutasyon olmayan ve AID ekspresyonu yüksek olan hastalarda prognozun diğer hastalardan daha kötü olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular eşliğinde AID'in KLL'de kötü bir prognostik faktör olabileceği düşünülmüştür (30,45).

Son yıllarda AID enziminin sadece IgV_H ve Ig C bölgelerinde değil, aynı zamanda diğer non-immunoglobulin genlerde de mutasyonlara ve kırıklara yol açabileceği ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, 2004 yılında Ramiro ve arkadaşlarının , 2008 yılında Robbiani ve arkadaşlarının yaptıkları “knock-out” transgenik hayvan çalışmaları sonucunda IgH/myc translokasyonları için AID'in gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulara göre, AID geninin hedefi sadece Ig genleriyle sınırlı değildir. Tahminen birkaç proto-onkogen de mutasyona uğrar ve AID eksprese eden B hücreli tümörlerde Ig lokusuyla transloke olur (47,48).

Helicobacter pylori'nin neden olduğu enfeksiyona bağlı olarak ortaya çıkan mide maltomalarında p53 mutasyonlarından AID enziminin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (36).

2011 yılında Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bcr/abl translokasyonları ile AID ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve AID ekspresyonunun bcr/abl translokasyonu bulunan hastalarda daha fazla eksprese edildiğini ve daha kötü prognoza sahip hastalık oluşumuna neden olabileceğini göstermişlerdir (33).

Hayvan modellerinde B hücreli tümör gelişimi insidansı, AID yokluğu durumunda azalmıştır. Çeşitli B hücreli lenfoma ve lösemilerde AID ekspresyonu çalışmaları, AID ekspresyonu ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Ortak sonuçlar, tümör genezisde AID enziminin gerekliliği olduğu ve AID'in, B hücreli lenfoma ile lösemi hastalığının prognozunu etkilediği yönündedir (28,31,41).

KLL'li hastalarda özellikle 17p13, 11q22.3, 13q14 ve 13q34 bölgelerinde delesyonlar vardır. Bu genetik değişikliklerin neden(ler)i henüz net olarak ortaya konamamıştır.

Delesyon tipleri ile KLL prognozu arasındaki ilişki bilinektedir. 17p13, 13q14 ve 11q22.3 bölgelerinde delesyon olan hastalarda prognozun daha kötü, 13q34 bölgesinde delesyon olan hastalarda ise prognozun daha iyidir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında 17p13, 11q22.3 ve 13q14 bölgelerinde delesyonu olan hastalarda AID ekspresyonunun hem kontrol, grubuna hem de delesyonu olmayan KLL'li hastalara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır. 13q34 bölgesinde delesyon olan hastalarda ise kontrol grubuna ve delesyonu olmayan hasta grubuna göre AID ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuç AID'in ileride KLL'de prognostik bir faktör olarak kullanılabileceği izlenimini vermektedir (24,40,45,51).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları şu başlıklar altında değerlendirebiliriz:

1) Hançer ve arkadaşları KLL'li hastalarda AID gen ekspresyonu üzerine yaptıkları çalışmada KLL'li hastalar ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir ilişki bulmuş ve hastalarda AID ekspresyonunun arttığını ileri sürmüşlerdir (23). Çalışmamızda ise KLL'li hastalar ile sağlıklı kontroller arasında AID gen ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır.

a) Delesyonu olan ve olmayan KLL hastalarının AID ekspresyon düzeyini sağlıklı kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında delesyonu olmayan hastalarda AID ekspresyon düzeyinde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenirken, delesyonu olan hastalarda ise sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Buna göre AID ekspresyonunun sadece delesyonu olan hastalarda yüksek saptanması, AID'in ileride prognostik bir parametre olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Hançer ve arkadaşlarının çalışmasında KLL hastalarının delesyon bilgileri yer almadığından sonuçlar arasındaki farklılık buradan kaynaklanıyor olabilir.

2) Çalışmamızda 17p13, 13q14 bölgelerinde AID gen ekspresyonunun hem sağlıklı kontrollere, hem de delesyonu olmayan hastalara göre anlamlı bir artış gösterdiğini, 11q22.3 delesyonu olan hastalarda bu anlamlılığın istatistiksel olarak anlamlılık sınırında olduğu saptanmıştır. 13q34 delesyonu olan grupta ise anlamlılık saptamadık. Bu bilgi doğrultusunda:

a) Hastalarda gözlenen delesyonlar ile prognoz arasındaki ilişki göz önüne alındığında, AID gen ekspresyon düzeyinin delesyonlu hastalarda arttığı ve prognoz tanısı ve takibinde ileride kısa ve kolay uygulanabilir bir parametre olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızı 22'si delesyonlu olmak üzere toplam 44 hasta üzerinde gerçekleştirdiğimiz dikkate alındığında daha geniş hasta grupları ile prospektif çalışmalar kurularak AID ekspresyon düzeyinin KLL'li hastalarda prognostik bir parametre olup olamayacağı daha net olarak ortaya konabilir.

b) AID ekspresyon düzeyinin sadece delesyonu olan hastalarda yüksek olduğu gözlenirken delesyonu olmayan hastalarda yüksek olmaması, hastalarda gözlenen bu bölge delesyonlarından bu genin etkili olabileceği izlenimini vermektedir. Fakat elde ettiğimiz verilerle bu bağlantıyı kesin olarak kurmak mümkün görünmese de AID'in DNA üzerinde kırıklar yaratabilme özelliği ve bu özelliğin sadece Ig genlerinde değil diğer bazı non-Ig genlerde de oluşturabildiğini gösteren çalışmaların bulunması bu ilişkiyi oldukça kuvvetlendirmektedir (47,48). Bu teoriyi doğrulamak için transgenik hayvan çalışmaları oluşturularak, AID ile delesyonlar arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılabilir.

c) Çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda da belli kromozal bölgelerde delesyonların görüldüğü bilinmektedir. Bu hastalıklarda delesyonlar ile AID ekspresyon düzeyi karşılaştırılarak çalışmadan elde edilen sonuçların farklı hastalıklar üzerinde de AID'in etkisi olup olmadığı araştırılabilir.

3) Hem Rai, hem de Binet evrelemesine göre ayrılan hasta gruplarından elde edilen AID ekspresyon düzeyleri birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

a) Bu sonuca göre, AID ekspresyonunun evreden tamamen bağımsız olarak hastalığın prognoz takibinde kullanılabileceği sonucunu verebilir. Bu sayede erken evrede olup hızlı ilerleyen hastalık durumunda veya prognozun takibi açısından evrelemenin yetersiz kaldığı durumlarda AID ekspresyonu anlamlılık taşıyan bir parametre olarak kullanılabileceği izlenimini vermektedir.

b) İstatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de ilerleyen evrelerde AID değerinin azaldığı görülmektedir. Bu durum ileri evredeki hastaların ilaç tedavisi almasından kaynaklı olabilir. Liu ve arkadaşları bcr/abl translokasyonu olan KML'li vakalarda ilaç tedavisi almış hastaların AID ekspresyon düzeyinin ilaç almamış gruba

göre anlamlı derece azaldığını göstermişlerdir (58). Bu durum bizim çalışmamız içinde yer alan ileri evre hastalar içinde geçerli olabilir. Bu sebeple çalışmanın geniş olgu serilerinde, tedavi öncesi ve sonrası AID düzeyleri karşılaştırılarak bu ilişki ortaya konulmalıdır.

4) Yaptığımız çalışmada KLL’li hastalarda gözlenen 4 bölgedeki delesyonların varlığı ya da yokluğu dikkate alınmıştır. Çalışmanın tüm hastalar da sitogenetik analiz sonrası diğer kromozom bölgelerinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığı incelenerek tekrar edilmesi çalışma sonuçlarının ve ana fikrin doğrulanması yönünde önemli bir adım olacaktır.

Sonuç olarak, KLL vakalarında özellikle de delesyonu olan hasta grubunda AID ekspresyonunun yüksek bulunması, KLL’li hastalar da bu parametrenin gelecekte hızlı ve basit bir prognoz belirteci olabileceği izlenimi vermektedir. Ayrıca bu çalışma sonucunda çeşitli lenfoproliferatif hastalıklarda görülen translokasyon-AID ilişkisi dışında, AID’in sadece Ig genlerinde değil non-Ig genlerde de kırıklar yaratarak delesyonların oluşumunda rol oynadığı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Abbas K, Lichtman AH. Temel İmmünoloji. 1. baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2007.
2. Alkan S. Kronik lenfositik lösemi (KLL): patogenezi ve biyolojisi, 2006, Türk Hematoloji Derneği: www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/kroniklenfositik.pdf
3. Aktan M. KLL tedavisi: genç ve refrakter hastalar. 2006, Türk Hematoloji Derneği: http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/klltedavisi.pdf
4. Bai L, Zhu WG. p53: structure, function and therapeutic applications. Journal of Cancer Molecules 2006; 4: 141–153.
5. Basu U, Franklin A, Schwer B, Cheng HL, Chaudhuri J, Alt FW. Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation. Biochemical Society Transactions 2009; 37: 561–568.
6. Başaran N. Tıbbi Genetik. 7.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2003.
7. Bransteitter R, Sneed JL, Allen S, Pham P, Goodman MF. First AID (activation - induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies. THE Journal of Biological Chemistry 2006; 281(25): 16833–16836.
8. Brara SS, Sachob EJ, Tessmerb I, Croteaua DL, Erie DA, Diaza M. Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. DNA Repair 2008; 7: 77–87.
9. Cascalho M. Advantages and disadvantages of cytidine deamination. The Journal of Immunology 2004; 172: 6513–6518.
10. Daily L. Understanding chronic lymphocytic leukaemia (CLL) a guide for patients and families. Leukaemia Foundation Bayer Health Care; 2007.
11. Damle R.N, Calissano C. ve ark. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. Best Practice & Research Clinical Haematology 2010; 23: 33–45.

12. Delgado J, Matutes E, Morilla AM et al. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *American Society for Clinical Pathology* 2003; 120: 754–759
13. Dighiero G, Hamblin T J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1017–1029.
14. Dinçol G, Aktan M ve ark. *Klinik Hematoloji*. İstanbul: Nobel Tıp; 2003.
15. Doi T, Kato L, Ito S, Shinkura R, Wei M, Nagaoka H, Wang J, Honjo T. The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *PNAS* 2009; 6(8): 2758 – 2763
16. Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A. TP53 and gastric carcinoma: a review. *Human Mutation* 2003; 21: 251–270.
17. Gündüz E, Gündüz M et al. p53 tümör baskılayıcı genin 72. Kodon Polimorfizminin baş-boyun kanserlerindeki prognostik rolü. *Yeni Tıp Dergisi* 2009; 26: 96–101.
18. Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *American Society of Hematology* 2009; 440–449.
19. Hallek M, Cheson B.D ve ark. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456.
20. Hancer VS, Kose M, Diz-Kucukkaya R, Yavuz AS, Aktan M. Activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2011; 52: 79-84.
21. Honjo T. *Molecular biology of B cell*. 2004.
22. Jankovic M, Robbiani DF, Dorsett YD et al. Role of the translocation partner in protection against AID-dependent chromosomal translocations. *PNAS* 2010; 107(1): 187–192.

23. Karakuş S. Kronik Lenfositik Lösemide Tanı ve Prognoz. 7–10.Ekim.2009, Türk Hematoloji Derneği:
<http://www.thd.org.tr/html/35thd/Sema%20KARAKU%C5%9E.pdf>
24. Karaüzüm S.B. Hematolojik malignansilerde sitogenetik. Türk Hematoloji Derneği:
http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/molhem_02.pdf
25. Kern W. PDQ Hematoloji. 1. baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık;2004.
26. Kılıçturgay K. İmmünoloji. 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2003.
27. Kipss T.P. Chronic lymphocytic leukemia zap70 and the b-cell receptor. Mediana 2007; 67(2): 41–47.
28. Kotani A, Kakazu N, Tsuruyama T, Okazaki I, Muramatsu M, Kinoshita K, Nagaoka H, Yabe D, Honjo T. Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. PNAS 2007; 104(5): 1616–1620.
29. Klug WS, Cummings M.R. Genetik Kavramlar. 6.baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2003.
30. Köse M. Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminazın (AID) ekspresyon düzeyi ile kronik lenfositik lösemnin prognozu arasındaki ilişki. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç hastalıkları A.B.D, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2010.
31. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. The New England Journal of Medicine 2010; 362:1417–1429.
32. Leukemia-chronic lymphocytic. 12.09.2010, www.cancer.org
33. Liu M, Schatz DG. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. Trends in Immunology 2009; 30(4): 173–181.
34. Longerich S, Basu U, Alt F, Storb U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. Current Opinion in Immunology 2006; 18: 164–174.
35. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. İmmünoloji. 7. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2008.

36. Marusawa H, Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Current Opinion in Immunology* 2010; 22: 442–447.
37. Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2008; 40: 1399–1402.
38. Maul RW, Saribasak H, Martomo SA et al. Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nature Immunology* 2011; 12(1): 70–77.
39. McCarthy H et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 4903–4908.
40. Mona Leuenberger, Simona Frigerio ve ark. AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. *Modern Pathology* 2010; 23: 177–186.
41. Nagaoka H, Tran TH, Kobayashi M, Aida M, Honjo T. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *International Immunology* 2010; 22(4): 227–235.
42. Noguchi E, Shibasaki M et al. Association between a new polymorphism in the activation-induced cytidine deaminase gene and atopic asthma and the regulation of total serum IgE levels. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001; 108(3): 382–386.
43. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 573–583.
44. Opezzo P ve ark. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 2003; 101: 4029–4032.
45. Palacios F, Moreno P et al. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients:

link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010; 115(22): 4488–4496.

46. Paydaş S. Kronik lenfositik lösemi (KLL), saçlı hücreli lösemi (SHL), mantle hücreli lenfoma (MHL).

47. Ramiro AR, Jankovic M et al. AID is required for *c-myc*/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 2004; 118: 431–438.

48. Robbiani DF, Bothmer A, Callen E et al. AID is required for the chromosomal breaks in *c-myc* that lead to *c-myc*/IgH translocations. *Cell* 2008; 135: 1028–1038.

49. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *American Society of Hematology* 2009; 421–429.

50. Shivarov V, Shinkura R, Doi T et al. Molecular mechanism for generation of antibody memory. *Philosophical Transactions of the Royal B Society* 2009; 364: 569–575.

51. Swanepoel D.C, Houlston R.S. Genetic variation and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Seminars in Cancer Biology* 2010; 20: 363–369.

52. Takaishi S, Wang TC. Activation-induced cytidine deaminase (AID), which mediates antibody diversification, is now implicated as an inducer of p53 mutagenesis in cancer cells. *Nature Medicine* 2007; 13(4): 470–476.

53. Unniraman S, Schatz DG. AID and Igh switch region-Myc chromosomal translocations. *DNA Repair* 2006; 5: 1259–1264.

54. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137: 413–431.

55. Yamane A, Resch W, Kuo N et al. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nature Immunology* 2011; 12(1): 62–70.

56. Yebernes VG, Ramiro AR. Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12(9): 432–439.

57. Zuckerman V et al. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *Journal of Pathology* 2009; 219: 3–15.

58. Zijie L et al. AID expression is correlated with Bcr-Abl expression in CML-LB and can be down-regulated by As₂O₃ and/or imatinib. *Leukemia Research* 2011; 1-5

FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi:

Proje Adı: “17p13, 11q22.3 ve 13q34 delesyonu olan ve olmayan Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda AID gen ekspresyon-mutasyon düzeyinin araştırılması ”.

Yapılacak işlemin tanımı: Bu çalışmada, 17p13, 11q22.3 ve 13q34 delesyonu olan ve olmayan Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda AID gen anlatımının araştırılması planlanmaktadır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Araştırmanın Amacı: Bu araştırmada, KLL hastalığında, hastalığın klinik seyrine bazı genlerdeki kayıpların etkili olduğu düşünülmektedir, çalışmamızın amacı klinik seyre etkili olduğu düşünülen bu gen kayıplarından başka bir genin sorumlu olup olmadığı arasındaki ilişkinin tespit edilmesidir.

Araştırmada Kullanılacak Yöntemler

- Rutin kontrolünüz sırasında sizden tam kan sayımı için alınmış olan 3 cc EDTA’lı kan örneği, ilgili laboratuvar sayım çalışmasını yaptıktan sonra buradan alınacaktır.
- Bu çalışma için sizden ayrıca bir kan örneği alınmayacaktır.
- Bu işlem sırasında görevli olan kişi oldukça dikkatli ve titiz davranacaktır. Alınan kanınız uygun koşullarda muhafaza edilip bölümümüze ulaştırılacaktır. Bu kandan DNA elde edilecektir ve bu DNA örnekleri bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır. Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 1 yıldır ve sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.
- Çalışmada, gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.
- Diğer bir çalışmada gönüllü DNA’sının kullanılması gerektiğinde, kendisinden izin alınacak gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlık ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Bu araştırmaya toplam 100 gönüllü katılacaktır.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan

ayrılabilir.

- Bu işlemler için gönüllüden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır, gönüllü istediği takdirde çalışmadan ayrılabilir.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkide bulunmayacaktır.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece gönüllüden kan örneğinin alınması ile sınırlıdır.
- Çalışma kabul kriterlerine ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırmacının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Araştırma sırasında elde edilen test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
- Araştırmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkmanız ya da çıkarılmanız halinde hastalığınızın tedavisi ile ilgili hiçbir aksama olmayacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacak ve sizden alınacak kandan elde edilecek tüm materyaller özel bir kodlama ile kodlanacak ve bu bilgiler üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Olası riskler ve faydalar:

Yapılacak araştırmanın getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır.

Olası yararlar :Bu incelemelerin esas amacı hastalığın oluşumuna yol açan mekanizmaların oluşumunu aydınlatmaktır.

Katılımcının/Hastanın Beyanı:

Sayın Dr..... tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi hematoloji AD'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına

inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte,

Prof. Dr. Melih AKTAN'ı 02124142000/32861 no'lu numaradan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir. **GÖNÜLLÜ ONAY FORMU**

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih:

Gönüllünün Adı-soyadı :
Gönüllünün Telefonu :
Adresi :

İmzası

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no. faks no,)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı:

İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı:

İmzası

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU



Sayı : 626

Tarih : 13/09/2010

Konu : Prof.Dr. Melih AKTAN hk,

Sayın Prof.Dr. Melih AKTAN
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi
İlgi :13.08.2010 tarihli 173 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Metin Yusuf GELMEZ'in yürüteceği 2010/532-139 dosya numaralı "17p13, 11q22.3 ve 13q34 Delesyonu Olan ve Olmayan Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) Hastalarda AID Gen Ekspresyon-Mutasyon Düzeyinin Araştırılması" tez çalışması komisyonumuzun 20.08.2010 tarihli 04 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı
Etik Değerlendirme Komisyon Başkanı

Eki: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	METİN YUSUF	Soyadı	GELMEZ
Doğ. Yeri	BORNOVA/İZMİR	Doğ. Tar.	02/06/1980
Uyruğu	TC	TC Kim No	41279033436
Email	yusufmetin@istanbul.edu.tr	Tel	+905334143216

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Lisans	İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., Tıbbi Biyolojik Bilimler	2004
Lise	İzmir Atatürk Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İstanbul Tıp Fakültesi	2007-
2.	Biyolog	Medimiks Medikal	2004-2007
3.	Biyolog	Yaşam Hastanesi	2004-2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Orta	Orta	65,00	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	84,458	85,471	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows XP, Vista	İyi
Microsoft Office	İyi

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Balık tutmak, aikido