



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMATİNİB TEDAVİSİNE DİRENÇ GÖSTEREN
KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA
BCR-ABL GENİ KİNAZ BÖLGESİ MUTASYONLARININ
BELİRLENMESİ VE KLİNİKLE İLİŞKİSİ**

BETÜL KOÇKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. MUSTAFA AKKİPRİK

2015 - İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Betül KOÇKAN
Tez Başlığı : İmatinib Tedavisine Direnç Gösteren Kronik Miyeloid Lösemi Hastalarında BCR-ABL Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Belirlenmesi ve Klinikle İlişkisi
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji AD
Sınav Tarihi : 30.11.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Mustafa AKKIPRIK

Kurumu

M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ayşe Özer

M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Yrd. Doç. Dr. Tayfur TOPTAŞ

M.Ü. Tıp Fak. Hematoloji AD

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03.12.2015 tarih ve 40 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

- Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
- Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

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 olmadığı beyan ederim.

Betül KOÇKAN

02.12.2015



I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her konuda özveri, sabır ve bilimsel katkıları ile bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa Akkiprik'e,

Akademik, bilimsel tecrübeleri ve manevi desteği ile eğitim sürecime değer katan sayın hocam Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Kıymetli bilgilerinden istifade ettiğim sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Can Erzik'e, Yrd. Doç. Dr. Fatih Eren'e ve Yrd. Doç. Dr. İlter Güney'e,

Tez çalışmamın örneklerini temin etmede gösterdiği yardımlarından ötürü Marmara Üniversitesi Pendik Eğt. ve Arş. Hastanesi Hematoloji Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Tayfur Toptaş'a,

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri dostlukları, yardımları, sorduğum sorulara sabırla verdikleri cevapları, yol göstermeleri ve bilimsel tecrübeleri için M.Ü. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın kıymetli doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, sevgili Çiğdem Albayrak'a,

Her anlamda yardımcı, anlayışlı, dostluğu, bilgi ve tecrübe birikimi için Tıbbi Biyolog Serap Sevil Şahin'e,

Mütemadiyen sevgi, emek ve destek gösteren; her şeyimle özveriyle ilgilenen, eğitim hayatım boyunca her türlü zorluğuma sabırla ortak olan canım anneme, babama ve biricik ablama,

Sevgileri, daimi dostlukları ve manevi destekleriyle hep yanımda olan çok sevdiğim arkadaşlarım Çiğdem Aydın'a ve Dr. Selma Atiye Kılıç'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığınca, SAG-C-YLP-110315-0057 nolu proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

I. Teşekkür.....	i
II. İçindekiler.....	ii
III. Şekil ve Tablo Listesi.....	v
IV. Kısaltma ve Simgeler.....	viii

1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4. 1. Lösemi.....	6
4. 2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML).....	7
4. 2. 1. Tanım ve Tarihçe.....	7
4. 2. 2. Tanı.....	8
4. 2. 3. İnsidans.....	10
4. 2. 4. Etiyoloji.....	10
4. 2. 5. Klinik Özellikler.....	11
4. 2. 6. Prognostik Faktörler ve Progresyon.....	12
4. 3. KML’de Sitogenetik Değişiklikler.....	13
4. 4. KML’de Moleküler Patogenez	15
4. 4. 1. BCR Geninin Yapısı ve Proteini.....	15
4. 4. 2. ABL1 Geninin Yapısı ve Proteini.....	16

4. 4. 3. BCR-ABL1 Füzyon Geninin Yapısı ve Proteini.....	17
4. 4. 4. p210BCR-ABL Füzyon Proteinin Karakteristiksel Özellikleri.....	20
4. 5. KML Progresyonu İle İlişkili Hücresel ve Moleküler Olaylar.....	20
4. 6. KML’de Progresyonun Hücresel ve Moleküler Mekanizmaları.....	21
4. 6. 1. BCR-ABL1’de Kinaz Aktivasyonu.....	21
4. 6. 2. BCR-ABL1’de Değişen Adezyon Özellikleri.....	23
4. 6. 3. Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu.....	23
4. 6. 3. 1. Ras ve MAP Kinaz Yolağı.....	23
4. 6. 3. 2. Jak-Stat Yolağı.....	24
4. 6. 3. 3. PI3 kinaz yolağı.....	25
4. 6. 3. 4. Myc yolağı.....	25
4. 6. 4. Diğer mekanizmalar.....	26
4. 7. KML’de Genetik Anomalileleri Tespit Etme Yöntemleri.....	27
4. 7. 1. Sitogenetik Yöntemler.....	29
4. 7. 2. Nested PCR.....	29
4. 7. 3. ASO PCR.....	30
4. 7. 4. Dizi Analizi.....	30
4. 8. KML’de Tedavi Yöntemleri.....	31
4. 8. 1. Kemoterapi.....	32
4. 8. 2. Lökoferez ve Splenektomi.....	32
4. 8. 3. Otolog KHT.....	32
4. 8. 4. Allojenik KHT.....	32
4. 8. 5. İnterferon α (IFN- α).....	33
4. 8. 6. İmatinib mesilat.....	33
4. 8. 6. 1. İmatinib Direnci.....	35

4. 8. 7. Diğer TKİ'ler.....	36
4. 9. BCR-ABL Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonları.....	38
4. 10. KML'de Tedavi Takibi ve Tedaviye Yanıtın Monitörizasyonu.....	40
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
5. 1. Kullanılan Aletler.....	48
5. 2. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	49
5. 3. Kullanılan Kimyasallar.....	49
5. 4. Kullanılan Çözeltiler.....	49
5. 5. Kullanılan Materyaller.....	50
5. 6. RNA İzolasyonu.....	50
5. 7. cDNA Sentezi.....	52
5. 8. Nested PCR.....	53
5. 9. Dizi Analizi.....	56
6. BULGULAR.....	57
6. 1. Klinik Bulgular.....	57
6. 2. Nested PCR Bulguları.....	60
6. 3. Dizi Analizi Bulguları.....	61
7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	68
8. KAYNAKLAR.....	73
9. ÖZGEÇMİŞ.....	79

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Tablo 1: KML hastalığının üç evresine göre değişen kan hücrelerinin sayısal özellikleri.....	8
Şekil 1: KML hastasının periferik yayması.....	9
Şekil 2: 46,XX,t(9;22)(q34;q11) Karyotip görüntüsü.....	9
Tablo 2 : Sokal İndeksi.....	12
Tablo 3 : Hasford Skorlama.....	12
Şekil 3: Philadelphia kromozomunun şematik gösterimi.....	14
Şekil 4: BCR proteinin yapısı.....	15
Şekil 5: ABL1 proteinin yapısı.....	16
Şekil 6: BCR-ABL füzyon geni oluşumu ve Ph kromozomunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 7: ABL geninde oluşan kırıklar.....	18
Şekil 9: ABL ve BCR genlerinde çeşitli noktalardaki kırıklar sonucu oluşan kimerik mRNA'ların şematik gösterimi.....	19
Şekil 10 : KML'nin patogenezinde sorumlu mekanizmalar.....	21
Tablo 4: KML'de mutasyon tespit etme yöntemleri ve özellikleri.....	28
Şekil 11: Nested PZR çalışma akışı.....	30
Şekil 12: Kronik miyeloid lösemi tedavisinin tarihsel gelişimi.....	31
Şekil 13: İmatinib'in etki mekanizması.....	35
Tablo 5: Nilotinib ve Dasatinib için BCR-ABL mutasyonu duyarlılığı.....	37
Şekil 14: BCR-ABL füzyon transkript şeması.....	38
Şekil 15: İmatinib'e dirençli olan hastalarda BCR-ABL KD'de günümüze dek tespit edilen amino asit değişimlerinin haritası.....	39
Şekil 16: BCR/ABL KD mutasyonları.....	39
Tablo 6: TKI tedavilerine karşı direnç ile karakterize olan ABL1 mutasyonları....	40

Tablo 7: BCR-ABL KD mutasyon durumuna göre en uygun alternatif terapötik seçeneklerin özeti.....	40
Tablo 8: KML tanısı ve monitörizasyonu.....	41
Şekil 17: MRD testinin sonuçları ve sitogenetik yanıt ile rezidüel hücre sayısı arasındaki ilişki.....	41
Tablo 9: KML’de Tam hematolojik yanıt ve Sitogenetik Yanıt.....	42
Tablo 10: KML’de Moleküler Yanıt (MR).....	43
Tablo 11: ELN tanımına göre birinci basamak TKİ'lere yanıt ve 2. Basamak TKİ'lere intolerans halinde yanıt.....	44
Tablo 12: Sitogenetik ve moleküler monitörizasyonun zamanlaması.....	45
Tablo 13: İmatinib tedavisi başarısızlığı durumunda 2. Nesil tedavi için yanıt tanımlamaları.....	46
Tablo 14 : BCR-ABL KD mutasyon analizi öneri özeti.....	47
Tablo 15: Birinci step Nested PCR karışımı.....	53
Tablo 16 : 1. Step Nested PCR Programı.....	54
Tablo 17: 2. step Nested PCR Karışımı.....	55
Tablo 18 : İkinci basamak Nested PCR Programı.....	55
Tablo 19 : KML hastalarının klinik verileri.....	58
Tablo 20: KML hastalarının mutasyonla ilişkili diğer klinik verileri.....	59
Şekil 18: ABL geninde 2. Aşama Nested PCR’ın 1. Primer çifti ile 447 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu.....	60
Şekil 19: ABL geninde 2. Aşama Nested PCR’ın 2. Primer çifti ile 333 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu.....	60
Tablo 21: Tespit edilen mutasyonlar ve özellikleri.....	61
Şekil 20: 3 nolu hastada A>G dönüşümü ile D241G mutasyonu.....	62
Şekil 21: 9 nolu hastada A>G dönüşümü ile heterozigot D241G mutasyonu.....	62
Şekil 22: 4 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu.....	63

Şekil 23: 5 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu.....	63
Şekil 24: 7 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu.....	64
Şekil 25: 10 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu.....	64
Şekil 26: 28 nolu hastada A>T dönüşümü ile homozigot K285N mutasyonu.....	65
Şekil 27: 14 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot C369C mutasyonu.....	65
Şekil 28: 24 nolu hastada G>A dönüşümü ile heterozigot A380T mutasyonu.....	66
Şekil 29: 15 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot C369C mutasyonu.....	66
Şekil 30: 40 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot A366V mutasyonu.....	67

IV. KISALTMAVE SİMGELER

Abl: Abelson

Akt: Serin-tirozin kinaz

AF : Akselere faz

ALL : Akut lenfoblastik lösemi

AML : Akut myeloid lösemi

ATP: Adenozin trifosfat

ASO-PCR: Allel spesifik oligonükleotit-polimeraz zincir reaksiyonu

BCR: Breakpoint cluster region

BF : Blastik faz

cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

CCR: Compleet sitogenetik yanıt

CHR: Compleet hematolojik yanıt

dHPLC : Denatüran yüksek performanslı likit kromatografi

DNA: Deoksi ribonükleik asit

dNTP : Deoksi ribonükleotit trifosfat

FISH: Floresan insutu hibridizasyon

GAP : GTPase activating protein domain

GDP Guanidin difosfat

GTP Guanidin trifosfat

Grb-2: Growth faktör reseptör bağlanma proteini

Hgb: Hemoglobin

IFN: nterferon

JAK: Janus ailesi kinazlar

kb : kilobaz

kDa : kiloDalton

KF : Kronik faz

KML: Kronik myeloid lösemi

MAPK : Mitogen activated protein kinase

M-BCR : Majör BCR

m-BCR : Minör BCR

mRNA : mesajcı ribonükleik asit

MMR: Majör moleküler yanıt

μ -BCR : Mikro BCR

μ M : mikromolar

μ l: Mikrolitre

Myc: Myelositomatozis onkogeni

MCR: Majör sitogenetik yanıt

NLS: Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri

P-loop : İmatinib bağlanmasını etkileyen bölge

PCyR: Parsiyel sitogenetik yanıt

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Ph: Philadelphia kromozomu

PI-3: Fosfotidilinositol-3

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

Q-RT-PCR : Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RasGAP : GTPase activating protein

RNA : Ribonükleik asit

RT-PCR : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

STAT: Sinyal transducer and activator of transcripition

SH1, 2, 3 : Src homoloji bölgeleri

Sos : Son of sevenless

TBE : Tris Baz EDTA

Tyr177 : 177. pozisyondaki tirozin

μL : Mikrolitre

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece

İMATİNİB TEDAVİSİNE DİRENÇ GÖSTEREN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA BCR-ABL GENİ KİNAZ BÖLGESİ MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ VE KLİNİKLE İLİŞKİSİ

Öğrencinin Adı: Betül Koçkan

Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa Akkiprik

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: BCR-ABL geni kinaz bölgesi mutasyonlarını ve frekanslarını dizi analizi yöntemi ile belirlemek ve belirlenen mutasyonların klinik açıdan önemini değerlendirmek amaçlanmıştır. KML’de tanı ve tedavi sürecinde mutasyon analizi yapmanın önemini vurgulamak ve rutin kullanıma geçmesini desteklemek de amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Periferal kandan RNA İzolasyonu, ardından cDNA Sentezi yapılmıştır. BCR/ABL geni kinaz bölgesi, Nested PCR ile amplifiye edilmiştir ve dizi analizi ile sekanslanmıştır.

Bulgular: 45 hastanın 11’inde (%24.44) mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar; 4 hastada E255K (%8.8), 2 hastada D241G (% 4.4), 2 hastada C369C (% 4.4), 1 hastada A366V (%2.2), 1 hastada K285N (%2.2) ve 1 hastada A380T (%2.2) mutasyonlarıdır.

Sonuçlar: Mutasyonlar, İmatinib tedavisine suboptimal yanıt, yanıt kaybı ve direncin ana sebeplerinden biridir. Özellikle 4 hastada tespit edilen E255K mutasyonu İmatinib ve Nilotinib tedavisine direnç ile karakterize olan bir mutasyondur.

Anahtar Sözcükler: Kronik Miyeloid Lösemi, BCR-ABL Kinaz Bölgesi, Mutasyon, İmatinib Direnci, DNA Dizi analizi

DETERMINATION OF BCR-ABL KINASE DOMAIN MUTATIONS AND CLINICAL RELATIONSHIPS IN IMATINIB - RESISTANT CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

Student: Betül Koçkan

Supervisor: Ass.Prof. Mustafa Akkiprik

Department: Medical Biology and Genetics

2. SUMMARY

Aim: Purpose of this study, determining of BCR-ABL kinase domain mutations and frequencies with Sequence analysis method to identify and to evaluate the clinical significance of the identified mutation and relationships. The importance of mutation analysis and support the routine use was aimed.

Methods: Isolation of RNA from peripheral blood and cDNA synthesis was performed. BCR / ABL kinase domain was amplified with the Nested PCR. Sequencing of these regions was made with sequence analysis.

Results: Mutations were detected in 11 of 45 patients (24.44%). E255K was detected in 4 patients (8.8%), D241G was detected in 2 patients (4.4%), C369C was detected in 2 patients (4.4%), K285N was detected in 1 patient (2.2%), A380T was detected in 1 patient (2.2%) and A366V mutation was detected in 1 patient (2.2%).

Discussion: Mutations are one of the main reasons for suboptimal response, loss of response and resistance to Imatinib therapy. In particular, the E255K mutation was detected in four patients, which is characterized by resistance to Imatinib and Nilotinib treatment.

Key words: CML, BCR-ABL Kinase Domain, Mutation , Imatinib Resistance , DNA Sequencing

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20-30'unu meydana getiren Kronik Miyeloid Lösemi (KML), t(9;22) (q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu ile karakterize olan bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır (Deininger ve ark., 2000; Corbin ve ark., 2003.) t(9;22) translokasyonu, kromozom 9'daki ABL (Abelson) onkogeni ve kromozom 22'deki BCR (Breakpoint Cluster Region) geninin füzyonu ile, yani BCR-ABL füzyon geni oluşumu ile sonuçlanır (Litzow, 2006). Ph kromozomu KML hastalarının % 95'inde bulunur ve KML için ayırt edici bir belirteç olarak kabul edilir (Deininger ve ark., 2000; Wongboonma ve ark., 2012). Bu resiprokal kromozomal translokasyon , aberant tirozin kinaz aktivisine yol açar (Quintas-Cardama ve Cortes, 2009). KML patogeneze bakıldığında BCR-ABL-pozitif hücreler; artmış proliferasyona (mitojenik aktivite), apoptoz inhibisyonuna ve değişmiş adezyon özelliklerine sahiptir ve hücrelerin aşırı çoğalması ile hastalıkta malign fenotip görülür (Deininger ve ark., 2000). KML'nin 3 fazı vardır: kronik, akselere ve blast krizi. Hastalık, ek genetik anomalilerin birikmesi ile ilerler (Corbin ve ark., 2003).

Hastalığın tedavisi için dünya genelinde ilk basamak tedavisi olarak İmatinib Mesilat (Gleevec, Glivec, STI-571) kullanılmaktadır. İmatinib, önemli klinik yararı olan ilk tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) olarak Aralık 2001'de FDA tarafından onaylanmıştır (Druker, 2009; O'Brien ve ark., 2009). İmatinib, 2- fenilamino pirimidin sınıfı protein kinaz inhibitörüdür ve ABL protein kinazın ATP bağlanma bölgesinin kullanılması suretiyle oluşturulmuştur. İmatinib'in rolü, BCR-ABL otofosforilasyonunu ve substrat fosforilasyonunu inhibe etmek, proliferasyonu inhibe etmek ve apoptozu başlatmaktır. İmatinib, BCR-ABL pozitif hücrelerde proliferasyonu inhibe eder ancak BCR-ABL negatif hücreleri yani normal hücreleri etkilmez. İmatinib ile KML tedavisinde hedeflenmiş terapi revolüsyonu olmuştur (Walz ve Sattler, 2006). Erken faz KML hastalarında İmatinib çok yüksek başarı göstermesine rağmen, ileri faz KML hastalarda İmatinib'e karşı gelişen direnç nedeniyle başarı oranı azalmıştır. İmatinib direncine neden olan olası mekanizmalar; klonal kromozom evolüsyonu , BCR-ABL amplifikasyonu, ABL kinaz domaini

mutasyonlarıdır (La Rosee ve Deininger , 2010). Yapılan çalışmalara göre hastaların yaklaşık %20'sinde BCR-ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları sebebiyle İmatinib tedavisinde başarısızlık meydana gelmiştir (Vaidya ve ark., 2015). Özellikle akselere faz ve blast kriz fazında görülen mutasyonlar, kinaz domain yapısını değiştirerek ilacın bağlanma afinitesine zarar verir (Wang ve ark., 2014). BCR-ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları, direnç gelişen hastalarda %30 - %90 oranında görülür (Cortes ve ark., 2007). Mutasyonların 90'dan fazla tipi vardır (Wongboonma ve ark., 2012). Mutasyonların ABL kinaz domaindeki lokasyonlarına göre başta İmatinib'e ve ikinci nesil TKİ'lerine (Nilotinib, Dasatinib gibi) direnç gelişir. Hastalarda iki şekilde direnç gözlenir; ilki primer direnç; tedaviye yanıtızsızlık halidir. İkincisi ise sekonder dirençtir, başlangıçta tedaviye yanıt gösterildiği halde zamanla tedavi yanıtında azalma olmasıdır (Litzow, 2006; Wei ve ark., 2006). Çeşitli direnç mutasyonları TKİ terapısından önce bulunabilir ve tedavi sonucunu etkileyebilir (Wongboonma ve ark., 2012).

En sık görülen mutasyon, T315İ mutasyonudur. Bu mutasyonda, sitozin-timin baz dönüşümü sonucu ABL geni kinaz domaini 315. pozisyondaki treoninin izolösine dönüşür. Dirençli hastaların %15-25'inde T315İ mutasyonu mevcudiyeti nedeni ile İmatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörlerine tam bir duyarsızlık oluşur (Litzow, 2006; Bartholomeusz ve ark., 2007 ; Quintás-Cardama ve ark., 2008). İmatinib'e duyarlı başlıca kinaz domain mutasyonları; T315İ , Y253H/F , M351T , G250E , E255K/V , F359V ve H396R olarak belirtilmiştir (Apperley , 2007). İmatinib doz artırılması, ikinci nesil TKİ (Nilotnib, Dasatinib)'leri ve allojenik kök hücre transplantasyonu, İmatinib dirençli olgular için tedavi seçenekleridir. İkinci nesil TKİ seçiminde, BCR-ABL kinaz domaini mutasyonları ve hastada eşlik eden diğer hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır (Soverinive ark., 2011).

BCR-ABL KD (Kinaz Domain) mutasyonlarına göre en uygun alternatif terapötik seçenekler şöyledir; T315I mutasyonu varsa; tedavi için hematopoietik kök hücre transplantasyonu veya araştırılan ilaçlar düşünülmelidir. V299L, T315A ve F317L/V/I/C mutasyonları varsa, tedavi için Dasatinib'ten ziyade Nilotinib düşünülmelidir. Y253H, E255K/V ve F359V/C/I mutasyonları varsa, tedavi için Nilotinib'ten ziyade Dasatinib düşünülmelidir. Başka bir mutasyon varsa, tedavi için

yüksek doz İmatinib ya da Dasatinib ya da Nilotinib düşünülmelidir (Soverini ve ark., 2011).

Mutasyonları saptama yöntemi olarak; dizi analizi, subklonlama sonrası dizi analizi, denatüran yüksek performanslı likit kromatografi (DHPLC), pyrosequencing, double-gradient denatüran elektroforez, Allel spesifik oligonükleotid (ASO) PCR, Q RT PCR, Nested PCR yöntemleri kullanılabilir (Ai J ve Tiu RV, 2014). Mutasyon belirleme hassasiyeti en iyi olan yöntemi seçmek daha avantajlı olacaktır. Bu bağlamda en duyarlı yöntem Allel Spesifik Oligonükleotit PCR yöntemidir; %0.01 hassasiyetle mutasyon saptayabilir. Dizi analizi de sık kullanılan yöntemdir, %10-25 gibi düşük hassasiyet gösterir, avantajlı yanı ise yeni mutasyon saptayabilmesidir ve ASO PCR yöntemi ile belirlenen mutasyonları doğrulamak için de kullanılabilir. Bu yöntem hastalıkla ilgili tüm mutasyonların frekansını popülasyon bazında görebilme olanağı sunar. D-HPLC ise % 0.1–10 oranında mutasyon saptama hassasiyetine , Pyrosequencing % 0.1–5 mutasyon saptama hassasiyetine, Ultra-deep sequencing ise %1 mutasyon saptama hassasiyetine sahiptir (Shah ve ark., 2002; Ai J ve Tiu RV, 2014).

Mutasyon analizinin pratik yararının daha iyi anlaşılması, hayati bileşen olarak KML hastalığının yönetimine ışık tutacaktır, mutant hücrelerin erken teşhisi alternatif tedavi seçenekleri ile ilgili kararlarda yol göstericidir (Soverini ve ark., 2011 ; Ai J ve Tiu RV, 2014).

Bu çalışmanın amacı ; BCR-ABL geni kinaz domaini mutasyonlarını ve frekanslarını Dizi analizi yöntemi ile belirlemek ve belirlenen mutasyonların klinik açıdan önemini ve ilişkisini değerlendirerek birinci ve ikinci nesil ilaç seçimine katkı sağlar nitelikte öneride bulunmak , dizi analizi yöntemi ile henüz literatürde yer almayan ancak Türk popülasyonunda mevcut olması muhtemel mutasyonların varlığını tespit edip literatüre katkı sağlamaktır. KML’de ilaç seçimi ve hastalık takibi esnasında mutasyon analizi yapmanın önemini vurgulamak ve rutin kullanıma geçmesini destekleyerek literatüre katkı sağlamak da hedefler arasındadır.

4. GENEL BİLGİLER

4. 1. Lösemi

Kanserlerin %2'sini oluşturan lösemi, lenfatik sistemi ve kemik iliğini etkileyen , kan hücrelerinin özellikle akyuvarların anormal çoğalması ile karakterize olan bir kanser türüdür. Periferel kandan ve kemik iliğinden örnek malign hücrelerin defalarca ve güvenli bir şekilde elde edilebilme özelliği, lösemide ufuk açıcı keşiflerin yapılmasına katkı sağlamıştır. Bu nedenle lösemiler, kanser biyolojisinin anlaşılması ve tedavi geliştirilmesi için model hastalık olmuştur. PubMed verileri göstermiştir ki, 1964 yılından bu yana, dünya çapında hekimler ve bilim insanları lösemiler hakkında 254.000'den fazla makale yayınlamıştır ve bunların 80.000'den fazlası son 10 yılda gerçekleşmiştir (Freireich ve ark., 2014).

Lösemiler incelendiğinde, malign hücrelerin, kan yapıcı organlarda normal hücrelerin yapımını engellediği görülür. Normal alyuvarların yapımının azalması ile anemi; normal akyuvarların yapımının azalması ile enfeksiyonlara yatkınlık, mikrobik hastalıklar ve ateş; trombositlerin yapımının azalması ile de çeşitli kanamalar (burun kanaması, diş eti kanamaları gibi) meydana gelir. Yetişkinlerde çocuklara nazaran yaklaşık 10 kat daha fazla oranda lösemi tanısı konur ve hastalığın riski yaş ilerledikçe artar. Lösemi tipleri , hastalığın özelliklerine göre isim alır. Akut lösemilerde hastalık çabuk gelişir, klinik seyir hızlıdır, oluşan immatür hücreler normal görevlerini yerine getiremez, hastalar kısa sürede kötüleşir. Kronik lösemiler yavaş seyirlidir, hastalarda çok sayıda matür hücre oluşur ve bunlar bazı normal fonksiyonlarını yerine getirebilir, hastalarda ani kötüleşme görülmez. Lökositler, lenfositik ve myelositik (miyeloid) serilerden gelişir. Lenfositik lösemiler, lenfosit artışı ile karakterizedir. Miyeloid lösemiler, granülositlerin artması ile karakterizedir. Bu özelliklere göre löseminin dört tipi vardır ; Akut lenfoblastik lösemi (ALL), Akut miyeloid lösemi (AML), Kronik lenfoblastik lösemi (KLL), Kronik miyeloid lösemi (KML). Löseminin bu temel dört tipi, ayrıca alt tiplerine göre de sınıflandırılabilir. Hastalığın alt tipini bilmek önemlidir, çünkü tedavinin özelliği alt tiplere göre değişmektedir (<https://www.lls.org> Erişim tarihi: 5 Ocak 2015; <http://www.cancer.gov/publications> Erişim tarihi: 7 Ocak 2015).

4. 2. Kronik Miyeloid Lösemi

4. 2. 1. Tanım ve tarihçe

Kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılan ve yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20-30'unu meydana getiren Kronik Miyeloid Lösemi (KML), hematopoetik kök hücrelerin klonal artışı ile tanı konan bir hastalıktır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hücre artışı, periferel kanda olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve splenomegali ile karakterizedir. KML, Polisitemia Vera, Myelofibrozis ve Esansiyel Trombositemi ile birlikte myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. KML'de patolojik açıdan hücreler farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. KML'nin 3 fazı vardır: kronik, akselere ve blast krizi. Hastalık, ek genetik anomalilerin birikmesi ile ilerler (Corbin ve ark., 2003). Tedavi edilmezse kaçınılmaz olarak 4 yıl içinde kronik fazdan akselere faza ve blast krize dönüşüm gerçekleşir. Hastaların % 95'inde bulunan ve KML için ayırt edici bir belirteç olarak kabul edilen Ph kromozomu, t(9;22) translokasyonu sonucu oluşur. Bu resiprokal translokasyonda, kromozom 9'daki ABL (Abelson) onkogeni ile kromozom 22'deki BCR (Breakpoint Cluster Region) geninin füzyonu olan BCR-ABL1 meydana gelir (Deininger ve ark., 2000; Litzow, 2006; Wongboonma ve ark., 2012).

İlk kez 1845 yılında tanımlanan KML'nin en önemli belirteci olan Philadelphia kromozomu, 1960 yılında keşfedilmesine rağmen, ancak 1973 yılında bu yapının 9. ve 22. kromozomlar arasındaki dengeli resiprokal translokasyondan kaynaklandığı tespit edilmiştir. 12 yıl sonra, bu translokasyonun BCR-ABL geninde Abelson tirozin kinazın onkogenik füzyonuna sebep olduğu anlaşılmıştır. (Günümüzde KML tanısı ve tedaviye yanıtın izlenmesi için BCR-ABL'nin nitel ve nicel değerlendirmesi FISH ya da Polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmaktadır). KML tedavisinin tarihi gelişimine bakıldığında, 1964 yılında oral Busulfan tedavisinin en yaygın kullanılan tedavi olduğu görülür. Daha sonraki dönemlerde İnterferon alfa ve Cytarabine, KML için standart ilaç tedavisi olmuştur. BCR-ABL füzyon kinazı hedefleyen TKİ'lerin geliştirilmesi, KML tedavisinde devrime ve diğer birçok neoplazmlarda TKİ denemelerine yol açmıştır. Bu TKİ'lerin ilki olan İmatinib (CGP57148B ve STI-571 olarak da bilinir), 1990'lı yıllarda geliştirilmiş, 2001 yılında FDA tarafından

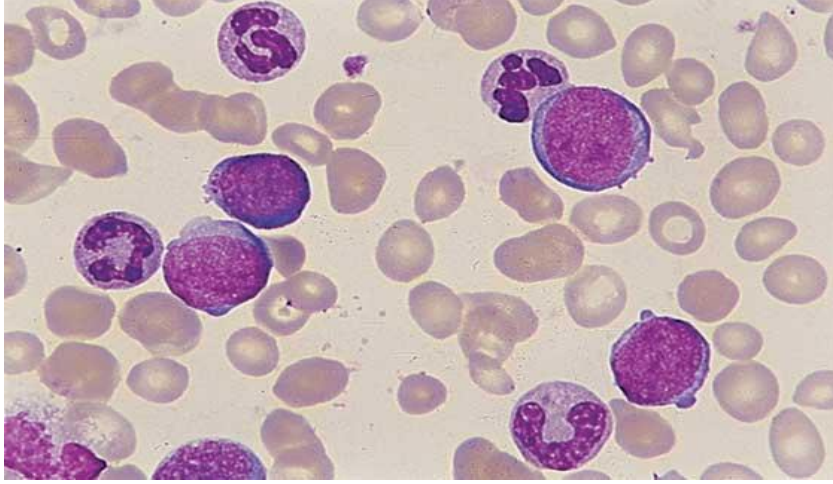
onaylanmıştır. Sonraki yıllarda Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Ponatinib gibi ikinci ve üçüncü nesil TKİ'leri geliştirilmiştir (Freireich ve ark., 2014.)

4. 2. 2. Tanı

Tam Kan Sayımı (CBC) testi, kan hücrelerinin sayısını ve tiplerini ölçmek için kullanılır. Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, kemik iliği hücrelerindeki kromozomal anomalileri ve diğer değişiklikleri incelemek için yapılır. KML'de hemoglobin konsantrasyonu düşer ve beyaz küre sayısı çok yüksek seviyelere çıkar. Platelet sayısı KML'nin şiddetine bağlı olarak artabilir veya azalabilir (Tablo1). Boyanmış kan hücrelerinin ışık mikroskopunda incelenmesi KML hastalarında beyaz kürelerin karakteristik özelliklerini gösterir: az miktarda immatür hücreler (lösemik blast hücreleri ve promiyelositler) ve çok sayıda olgunlaşmakta olan veya tam olarak olgunlaşmış beyaz küreler (miyelositler ve nötrofiller). Sağlıklı bireylerin kanında blast hücreleri, promiyelositler ve miyelositler bulunmaz (Şekil 1) (<https://www.lls.org> Erişim tarihi: 5 Ocak 2015, www.kmlhastaligi.org; Erişim tarihi: 5 Mart 2015).

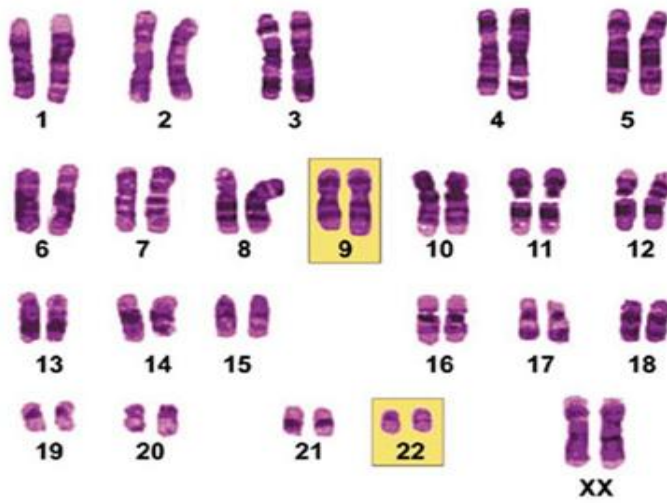
Tablo 1: KML hastalığının üç evresine göre değişen kan hücrelerinin sayısal özellikleri (<http://www.kmlhastaligi.org> Erişim tarihi 5 Mart 2015)

	KRONİK FAZ	AKSELERE FAZ	BLAST KRİZ FAZ
LÖKOSİT	$\geq 20 \times 10^9/L$	artar	artar
BLAST	<%15	%10-%30	>%10
BAZOFİL	artar	≥ 20	-
TROMBOSİT	Normal/artar	azalır	azalır
KEMİK İLİĞİNDEKİ HÜCRE MİKTARI	artar	artar	artar
KROMOZOM	t(9;22)	t(9;22)	t(9;22)



Şekil 1: KML hastasının periferik yayması. Lökositoz, blast artışı-dört miyeloblast ve nötrofiller görülmektedir. (http://hematolojiatlası.com/atlas_content.php?id=51 Erişim tarihi: 3 Kasım 2015)

Sitogenetik incelemeler, kemik iliği materyali kullanımıyla t(9;22)(q34;q11.2) Ph kromozomu hedeflenerek yapılır. Tipik bir konvansiyonel sitogenetik inceleme sırasında 20 metafaz incelenmelidir (Şekil 2). Uygulama amaçları; KML tanısının doğrulanması ve diğer kromozomal değişikliklerin saptanmasıdır. FISH uygulamalarında ise BCR ve ABL genlerinin kırık noktaları hedeflenir. Materyali kemik iliği ve periferik kandır. Uygulama amaçları; KML tanısının doğrulanması, sitogenetik yanıtın rutin görüntülenmesi, rutin MRD ölçümüdür (Cortes ve ark., 2003).



Şekil 2: 46,XX,t(9;22)(q34;q11) Karyotip görüntüsü.(http://www.rayur.com/chronic-myeloid-leukemia-cml.html/chromosomen_gr2 Erişim tarihi: 11 Kasım 2015).

Kantitaif RT-PCR’da BCR-ABL mRNA’sı hedeflenir. 0.0001-0.001 oranında duyarlılığa sahiptir. Materyali periferel kan ve kemik iliğidir. Uygulama amaçları; rutin MRD ölçümü, füzyon gendeki kırık noktaların tanımlanmasıdır (www.LLS.org; erişim tarihi: 07 Kasım 2014).

4. 2. 3. İnsidans

Yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20-30 unu meydana getiren KML, 25-60 yaşları arasında gözlenir. Erkeklerde kadınlara nazaran daha sık gözlenmektedir (2’ye karşı 1,5). Erkeklerde insidans, 1977 ve 1997’ye nazaran 1997 – 2003 yılları arasında %4.4. azalmıştır. İnsidansı 1,5/100.000 olan KML’nin yaşla birlikte görülme sıklığı artar. İnsidans 40’lı yaş ortalarına kadar yaş ilerledikçe hafifçe, sonra hızla artar. Çocukluk çağı lösemilerinin %5’inden azını oluşturur. Hastalar genellikle kronik evredeyken tanı için başvurur. Hastaların yaklaşık %85’i kronik evrede tanı alırken %10’u akselere evrede ve %5’i blastik evrede tanı alır. KML hastaları tipik olarak 3-5 yıl boyunca normaldir daha sonra evrelerin ilerlemesiyle AML benzeri bir tablo meydana gelir ve bazı hastalar hayatını kaybeder (O'Brien ve ark., 2009; <http://thsk.saglik.gov.tr> ; erişim tarihi : 3 Ocak 2015).

4. 2. 4. Etiyoloji

KML doğumda mevcut olmayan, sonradan kazanılan, bir kemik iliği hücresinin DNA’sının genetik hasarından kaynaklanabilen bir hastalıktır. Bilim insanları KML etyolojisinde rol alan etmenleri net olarak ortaya koyamasa da hastalığın gelişiminde yüksek doz radyasyona maruz kalmanın rol aldığı bilinmektedir. Sitotoksik ilaçlara maruz kalma ile bir ilişkisi bulunamamıştır, viral etiyolojiyi destekleyen bir bulgu yoktur. İmatinib öncesi dönemde sigara kullanımı blastik krize dönüşümü hızlandırmıştır ve bu nedenle KML’de yaşam süresi negatif etkilenmiştir. Atom bombasına maruz kalanlarda insidans artmıştır. Çernobil kazası sonrasında KML insidansında artış olmamıştır, bu da KML gelişiminin yalnızca büyük dozda radyasyon maruziyeti ile indüklendiğini gösterir (<https://www.lls.org> Erişim tarihi: 5 Ocak 2015).

4. 2. 5. Klinik özellikler

KML yavaş büyüyen bir hastalıktır ve kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositlerin gelişimine tamamen müdahale etmez. Bu nedenle, hastalarda KML var olsa bile hiçbir belirti olmayabilir, bazı hastalar tanı konsa bile asemptomatiktir. Genellikle rapor edilen semptomlar şunlardır; çok yorgun olmak veya kolayca yorulmak, günlük aktiviteler sırasında nefes darlığı, açıklanamayan kilo kaybı, genişlemiş dalak veya kaburga altında karnın sol üst tarafında ağrı hissetmek, kırmızı kan hücrelerinde azalma, gece terlemeleri, sıcaklıkların tolere edilememesi gibi (<https://www.lls.org> Erişim tarihi: 5 Ocak 2015). Daha az sıklıkla görülen belirtiler ise; enfeksiyon, tromboz veya kanamadır. p210 + olan hastalar daha yavaş seyirlidir. KML ilerledikçe semptomlar artar. Açıklanamayan ateş, kilo kaybı ve ilaç dozunda artış ihtiyacı, kemik ve eklem ağrısı, kanama, tromboz ve enfeksiyonlar akselere veya blast faza dönüşü gösterir. Fiziksel muayenedeki en önemli bulgu ise splenomegalidir. Tedaviye rağmen varlığını sürdüren splenomegali , hastalığın ilerlediğine işaret eder. Lenfadenopati ve myeloid sarkomlar hastalığın ileri evreleri dışında ender görülür, görüldüğünde prognozun kötü olduğunu düşündürür. Tanı anında immatür ve matür granülositlerde artış ile beyaz küre sayı yüksekliği vardır. Dolaşımda blast oranı <%5 ve blast-promyölesit oranı <%10 olarak bulunur. Tanı esnasında kemik iliği sellülaritesi ve eritroid seriye göre myeloid seri oranında artma vardır. Hastaların yarısında fibrozis bulunur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre KML evrelerinin özellikleri sıralanmıştır. Akselere evre özellikleri; periferik kan lökositlerinin ve kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması, periferik kandaki bazofillerin en az %20 oranında olması, tedavi ile ilişkisiz kalıcı trombositopeni, tedaviye yanıtız ve giderek artan dalak boyutu ve lökosit sayısı, sitogenetik olarak klonal dönüşümün gerçekleşmesidir. Blastik evre özellikleri; periferik kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki hücrelerin %20'sinin blast olması, ekstramedüller blast proliferasyonu, kemik iliği biyopsisinde gruplar halinde blastların olmasıdır (Vardiman ve ark., 2002).

4. 2. 6. Prognostik faktörler ve progresyon

KML’li hastaların klinik seyri farklılık gösterir. İmatinib tedavisi öncesi dönemde 2 yıl içinde ölüm oranı %10 oranındadır, daha sonraki yıllarda %20’dir, ortalama yaşam süresi yaklaşık 4 yıldır. Hastalığın risk durumu Sokal İndeksi ve Hasford Sistemi kullanılarak belirlenir (Tablo 2 ve Tablo 3). Sokal indeksi en önemli prognostik gösterge olarak, dolaşımdaki blast oranı, dalak büyüklüğü, trombosit sayısı, yaş ve sitogenetik klonal dönüşüm baz alınarak geliştirilmiştir. Hasford Sistemi, IFN alfa tedavisi üzerinden geliştirilmiştir.

Tablo 2 : Sokal İndeksi (Sokal ve ark., 1984)

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

Tablo 3 : Hasford Skorlama (Hasford ve ark., 1998)

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

KML’nin temel özelliği, malign klondaki kromozom instabilitesi akkiz olarak ilave t(9;22), trizomi 8 veya 17, p53 kaybı ile sonuçlanır. Bu ilave genetik ve moleküler anomalilerin oluşması fenotipik dönüşüm için önemlidir. p53 geninde heterojen yapısal değişiklikler hastalık progresyonu ile ilişkilidir. Ayrıca sporadik değişen MYC geni varlığı gösterilir. BCR/ABL lokusunda yeni oluşan progresif DNA metilasyonu ve LINE-1 hipometilasyonu, blastik faza geçişi işaret eder. Blastik faza geçişte interlekin-1 ve tümör süpresör protein fosfataz A2’nin inaktivasyonu da

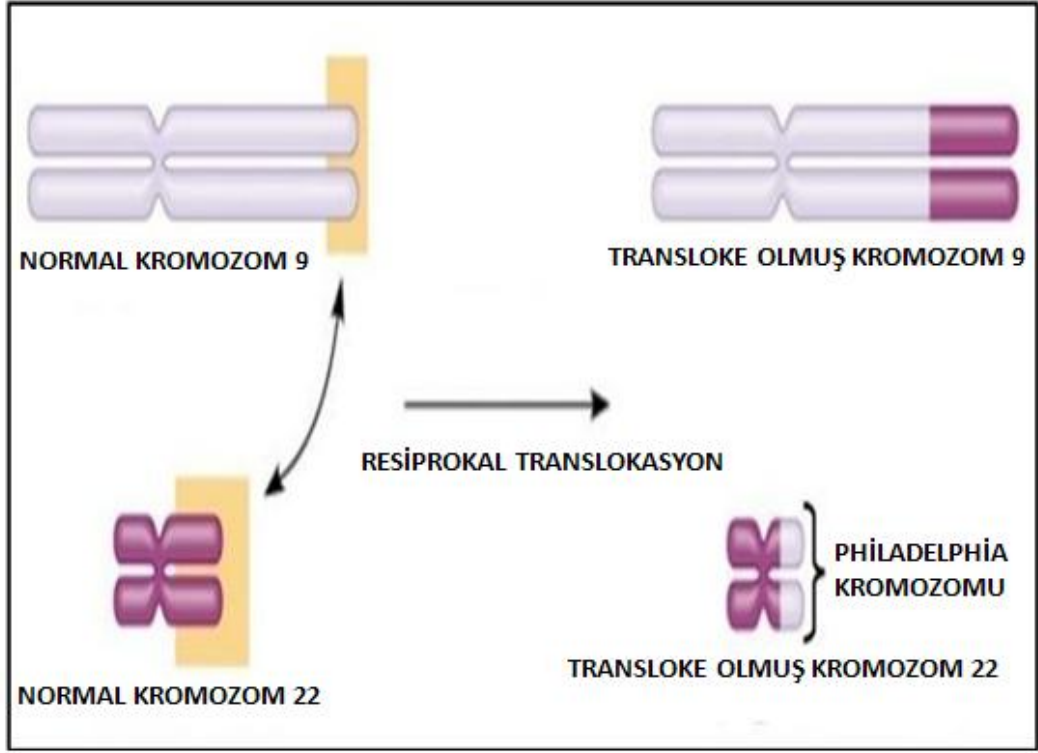
görülebılır. Sonuç olarak, İmatinib'e dirençli KML hastalarında akselere faza ve blast krizine ilerleme riski yüksektir.

4. 3. KML'de Sitogenetik Değişiklikler

t(9; 22) (q34; q11) resiprokal translokasyonu, derivatif kromozom 22 üzerinde BCR / ABL gen füzyonu ile sonuçlanır, Ph kromozomu olarak adlandırılır ve KML'de başlangıç olgusu olarak düşünülür (Şekil 3) (Syed ve ark., 2008). Bu resiprokal translokasyon ile oluşan BCR-ABL gen füzyonu, FISH yöntemi ile tespit edilebilir (Deininger ve ark., 2000).

Vakaların % 2-10'unda bu kimerik gen, 9q34, 22q11 translokasyonuna ek olarak bir ya da birkaç diğer kromozomal bölgeyi içeren varyant yeniden düzenlemeler ile oluşturulur. En belirgin kromozomal bölgeler şunlardır; 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12 ve 22q13. Mevcut veriler varyant düzenlenmelerin herhangi bir özel fenotipik veya prognostik etkisi kazandırmadığını göstermektedir (Johansson ve ark., 2002).

Ph kromozomuna ek olarak rastgele olmayan kromozom anomalilerinin ortaya çıkması KML'de sık görülen bir durumdur ve klonal evrim olarak adlandırılır. Klonal evrim, hastalığın ilerlemesinin bir göstergesidir ve oldukça proliferatif KML progenitörlerinin genetik kararsızlığını yansıtır (Syed ve ark., 2008). Artmış genetik instabilite, yüksek dereceli malign fenotiplerin ortaya çıkmasını kolaylaştırır (Bennour ve ark., 2013). Başlangıçta blastik faz KML hastalarında tanımlanmıştır, vakaların % 50 ila % 80'inde ortaya çıkar ve rastgele olmayan kromozomal anomalileri içerir. Bunlar; çift Ph (%30), trizomi 8 (vakaların %34'ünde, ek değişiklikler ile), izokromozom 17q (%20), 19. ve 20. kromozomların trizomileri (%13) ve 20q anormalileridir (Johansson ve ark., 2002; Cortes ve ark., 2003; Bennour ve ark., 2013).



Şekil 3: Philadelphia kromozomunun şematik gösterimi.

(<http://www.slideshare.net/1slid/15-chromosomalinheritance-text> Erişim tarihi: 3 Kasım 2015)

Sitogenetik klonal evrim daha sonra, kronik faz KML hastalarının %10 ila %5'inde tanımlanmıştır ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Ardından sitogenetik klonal evrim akselere faz KML'yi tanımlayan unsurlardan biri olarak kabul edilmiştir, hastaların yaklaşık yarısında IFN tedavisi ile anormal klon baskılanması ile ilişkili gösterilmiştir. Akselere faz KML'nin tek bir özelliği olarak sitogenetik klonal evrim, allojenik kök hücre transplantasyonunda iyi prognoz ile ve %60 gibi uzun süreli sağkalım oranı ile ilişkilidir. İmatinib tedavisi döneminde ise sitogenetik klonal evrim, kronik ve akselere faz hastalarında olumsuz sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Cortes ve ark., 2003). Diğer anomaliler; -Y (erkek hastaların %8'inde), +21 (%7), +17 (%5) ve monozomi 7 (%5)'dir (Johansson ve ark., 2002). Ek genetik anomalilerin net sonucu; hastalık agresif faza dönüşürken ortaya çıktıklarından muhtemelen daha habis bir fenotip potansiyeli oluşturmalarıdır (Syed ve ark., 2008).

4. 4. KML’de Moleküler Patogenez

4. 4. 1. BCR geninin yapısı ve proteini

22q11’de lokalize olan BCR geni, 130 kb uzunluğundadır ve 23 ekzon içerir. Sürekli eksprese edilen BCR geninin insan dokularındaki mRNA seviyelerinin, beyin ve hematopoietik hücrelerde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Normal BCR geni 160-kd ağırlığındaki BCR proteinini kodlar (Şekil 4). Hematopoietik hücrelerle ilgili olarak BCR proteini, öncelikle miyeloid farklılaşmanın erken dönemlerinde eksprese edilir, hücrelerin polimorfonükleer lökositlere olgunlaşmasında seviyesi önemli ölçüde azalır. BCR geninin normal ürünün, immünofloresan boyama ve hücre fraksiyonu çalışmaları ile sitoplazmik bir protein olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu proteinin özellikle G proteinleri tarafından düzenlenen hücresel sinyal iletim yollarını kapsadığı belirtilmiştir. Ayrıca BCR’nin XPB proteini ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. XPB; DNA onarımı, genel transkripsiyon başlatma ve hücre döngüsü regülasyonunda rol oynar (Laurent ve ark., 2001).



Şekil 4: BCR proteinin yapısı. N terminalde; dimerizasyon domaini (DD) ve siklik adenosin monofosfat kinaz homolog domainleri. Y177, Grb-2’ye bağlanmak için önemli bir otofosforilasyon bölgesidir. Üst kısımdaki oklar, BCR-ABL füzyon proteinlerindeki kırılma noktalarını göstermektedir. (Rho-GEF); Rho guanidin nükleotid değişim faktörü. (CaLB); Kalsiyum-bağımlı lipid bağlanma bölgesi. (Rac-GAP); Rac-GTPaz (Laurent ve ark., 2001).

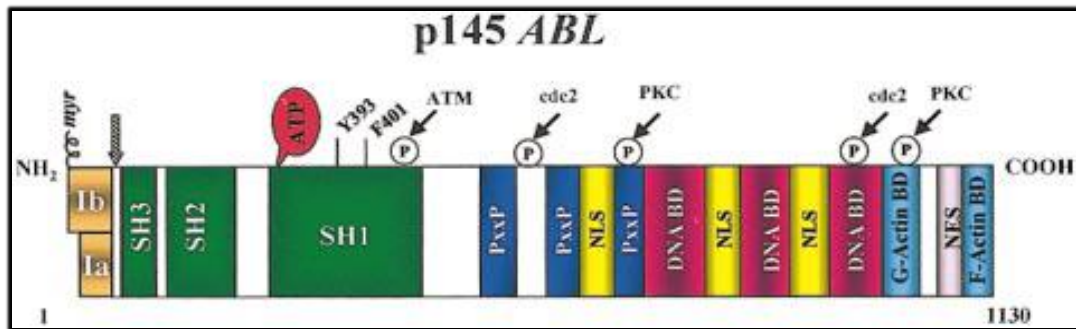
BCR geni pek çok farklı fonksiyonel domaini ihtiva eder. 1. ekzon; serin/treonin kinaz domaini, SH2 bağlanma domainleri ve oligomerizasyon bölgesini içerir. BCR sentral ve COOH terminal GAP bölgeleri G proteinleri ile etkileşim içindedir. G proteinleri; hücre içi sinyal, hücre iskeleti organizasyonu, hücre büyümesi ve normal gelişiminde temel oyuncularlardır. Bu verilere göre BCR, ökaryotik hücrelerde iki

büyük hücre içi sinyal mekanizmasına katılır; fosforilasyon ve GTP-bağlanması (Laurent ve ark., 2001).

4. 4. 2. ABL1 geninin yapısı ve proteini

9. kromozomda lokalize olan ABL1 geni, 11 ekzondan oluşur ve 145 kd ağırlığında bir nonreseptör tirozin kinazı kodlar. 1a ve 1b olmak üzere ilk ekzonunun iki alternatifi vardır. Farelerde tanımlanmış olan Abelson murine leukemia virusunun Gag-v-Abl onkogeninin insanlardaki homologudur (Wang, 2014). Sürekli ifade edilen ABL1 füzyon geni, hücresel transformasyon için gerekli olan ABL1 tirozin kinazı kodlar. Büyüme faktörleri, sitokinler, hücre adezyonu, DNA hasarı, oksidatif stres ve diğer sinyallere yanıt olarak, hücre çoğalmasını, farklılaşmayı, hayatta kalmayı veya ölümü, retraksiyon veya göçü teşvik etmek için ABL aktive edilir (Greuber ve ark., 2013).

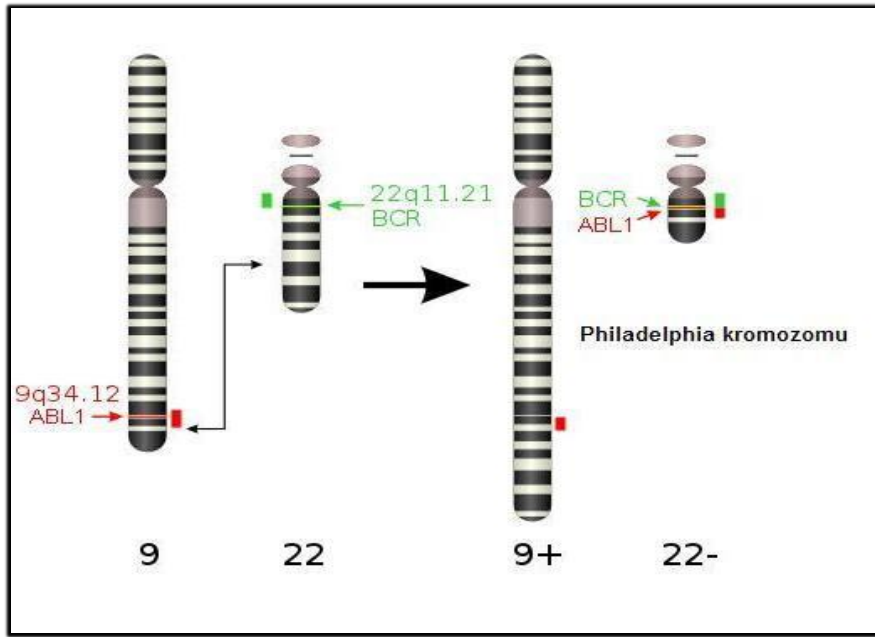
Çeşitli yapısal bölgeler ABL proteininde tanımlanabilir (Şekil 5). NH₂ terminaline doğru üç SRC homoloji bölgesi (SH1-SH3) yer almaktadır. SH1 bölgesi, tirozin kinaz fonksiyonu taşır. SH2 ve SH3 bölgeleri ise diğer proteinler ile etkileşimi sağlar. Molekülün merkezinde prolin bakımından zengin sekanslar, diğer proteinlerin SH3 bölgeleri ile etkileşime girmesini sağlar. Karboksi terminaline doğru nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) ve DNA-bağlanma ve aktin bağlanma motifleri bulunur (Deininger ve ark., 2000).



Şekil 5: ABL1 proteinin yapısı. Üst kısımdaki oklar Bcr-Abl füzyon proteininin kırılma noktalarını gösterir. ATM, cdc2 ve PKC fosforilasyon bölgeleridir. PxxP; prolin bakımından zengin bölgelerdir.

4. 4. 3. BCR-ABL1 füzyon geninin yapısı ve proteini

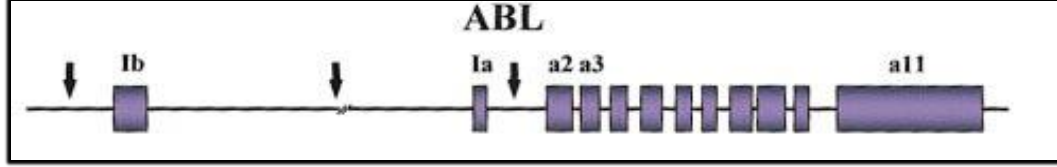
KML hastalarının yaklaşık %90'ında görülen Philadelphia kromozomu, kromozom 9'daki ABL (Abelson) onkogeni ile kromozom 22'deki BCR (Breakpoint Cluster Region) gen bölgesinin karşılıklı t(9; 22q34; q11) translokasyonu ile oluşur (Litzow, 2006). BCR-ABL füzyon geni oluşumu ile kısalmış kromozom 22 meydana gelir (Şekil 6). Translokasyon ile hibrid BCR-ABL geninin yapısal aktivasyonu gerçekleşir ki bu durum, mutasyona uğramış hücrelerin anti-apoptotik avantaj kazanmasını sağlayarak hücrelerin aşırı çoğalması ve malign transformasyon ile KML'nin patofizyolojik temelini oluşturur (Shet ve ark., 2002; Srivastava ve Dutt, 2013).



Şekil 6: BCR-ABL füzyon geni oluşumu ve Ph kromozomunun şematik gösterimi. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Philadelphia_Chromosom.svg Erişim tarihi 4 Kasım 2015)

BCR-ABL geninin 5' ucu BCR'den, 3' ucu ABL'den gelen eksonlardan oluşur. Ph kromozomunun oluşumunda 9. ve 22. kromozomlarda farklı bölgelerde kırıklar meydana gelir. 11 ekzonlu ABL geni 9q34'de kırılma çoğunlukla genin iki alternatif ilk ekzonu (1b ekzonu ve 1a ekzonu) arasındaki intronda oluşabilir. Ya da ilk

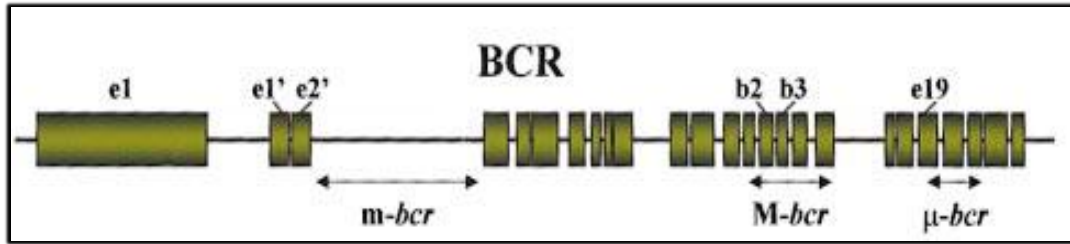
alternatif ekson Ib'nin upstream bölgesinde kırık oluşabilir. Veya ikinci alternatif ekson Ia'nın downstream bölgesinde kırık oluşabilir (Şekil 7) (Deininger ve ark., 2000; Laurent ve ark., 2001).



Şekil 7: ABL geninde oluşan kırıklar. Lokasyonları ok işaretleri ile gösterilmektedir (Deininger ve ark., 2000).

ABL geninde kırılma noktasının tam konumu ne olursa olsun, füzyon transkripti hemen hemen her zaman ABL ekson 2 (a2)'yi içerir (Laurent ve ark., 2001).

23 ekzon içeren BCR geninde kırık oluşumu M-bcr, m-bcr, μ -bcr olmak üzere üç farklı noktada gerçekleşir (Şekil8) (Deininger ve ark., 2000).



Şekil 8: BCR geninde kırık oluşumu. Lokasyonlar alt kısımdaki ok işaretleri ile gösterilmektedir (Deininger ve ark., 2000).

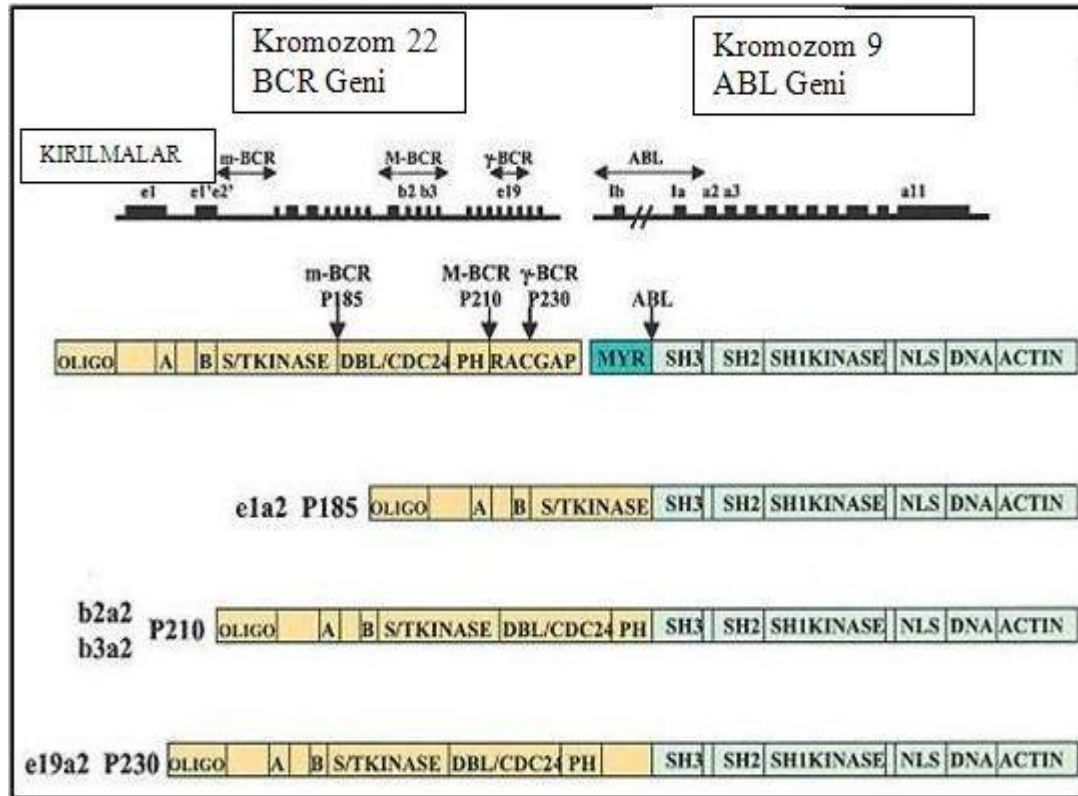
Kırık, 12-16. ekzonları (ekzon b1-b5 olarak da adlandırılır) kapsayan 5.8-kb'lık alan içinde oluşur. Bu bölge major breakpoint cluster region (M-bcr) bölgesidir. Kırılma noktası 13. ekzondan (e13-b2 / b2a2) ya da 14.ekzondan (e14-b3/b3a2) sonraki intronda yer alır. Kırılma sonucunda b2a2 veya b3a2 mRNA'sı oluşur, 210-kd ağırlığında kimerik proteini kodlar, p210^{BCR-ABL} olarak adlandırılır, KML hastalarının yaklaşık %95'inde görülür (Şekil 12) (Deininger ve ark., 2000).

Kırık, e2' ve e2 ekzonları arasında 54.4 kb'lık alanın upstream bölgesinde oluşur. Bu bölge minor breakpoint cluster region (m-bcr) olarak adlandırılır. Sonuç olarak e1a2

mRNA'sı oluşur, 190-kd ağırlığında bir proteini kodlar, p190^{BCR-ABL} olarak adlandırılır, KML hastalarında düşük oranda görülür (Deininger ve ark., 2000).

Kırık, 19. ekzonun downstream bölgesinde oluşur. Bu bölge micro breakpoint cluster region (μ -BCR) bölgesidir. Sonuç olarak e19a2 mRNA'sı oluşur, 230-kd ağırlığında füzyon proteinini kodlar, p230^{BCR-ABL} olarak adlandırılır. KML hastalarında çok düşük oranda görülür; Ph-pozitif kronik nötrofilik lösemi ile ilişkilidir (Deininger ve ark., 2000). Ph translokasyonu tarafından oluşturulan füzyon gen, BCR promoter düzenlenmesi altındadır (Laurent ve ark., 2001).

ABL ve BCR genlerinde çeşitli noktalardaki kırıklar sonucu oluşan kimerik mRNA'lar oluşmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9: ABL ve BCR genlerinde çeşitli noktalardaki kırıklar sonucu oluşan kimerik mRNA'ların şematik gösterimi.

(www.nature.com/onc/journal/v20/n40/fig_tab/1204638f1.html Erişim tarihi: 4 Kasım 2015).

4. 4. 4. p210^{BCR-ABL} füzyon proteinin karakteristik özellikleri

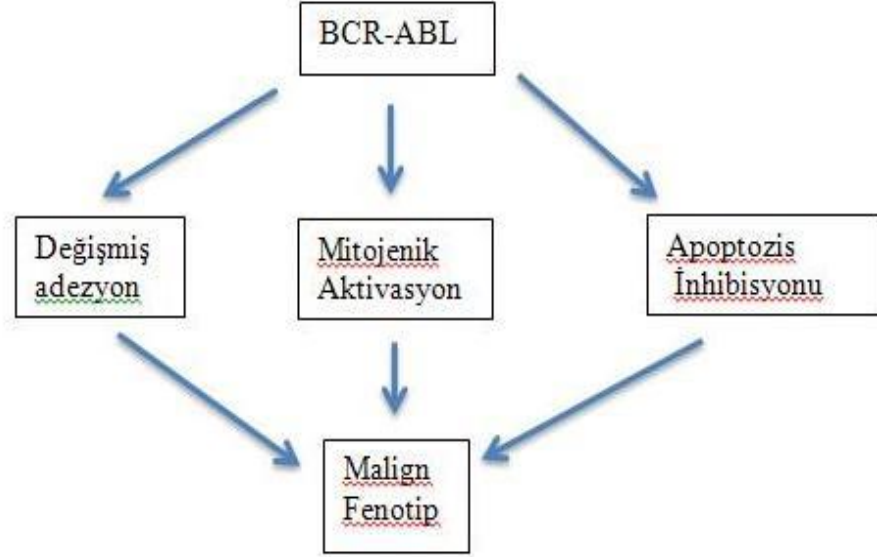
KML hastalarında en sık görülen füzyon protein türü, p210^{BCR-ABL} onkoproteinidir. Bu onkoprotein fonksiyonel özellikleri şunlardır; hematopoietik hücre hatlarında büyüme faktörü bağımsız ve lösemik hücre büyümesine neden olur. Esas olarak tirozin kinazı aktive eder. Sitoskeletal aktin ve mikrofilamanlara bağlanabilir. Miyeloid farklılaşma ile ekspresyonu azalır. Substratları, Ras ilişkili sinyal iletim moleküllerini içerebilir. Tirozin fosfoprotein Crkl ve SH2 / SH3 adaptör proteinleri ile kompleksleri vardır. Docking protein p62^{dok} ile etkileşime girer. Apoptozu önleyebilir. Jak/Stat yolağı ile (özellikle STAT5) bağlantılıdır. Fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt yolağı ile bağlantılıdır. Jun kinaz'ı etkinleştirir. XPB proteini ile etkileşir ve düzenler. Dönüşüm aktivitesi kısmen Ras yolağı aracılıdır. Adezyon özelliklerinde değişiklikleri tetikleyebilir. Ship proteininin ekspresyonunu down-regüle eder. Bu özelliklerin dışındaki diğer karakteristik özellikleri şöyledir: Transkript boyutu; 8.5-kb BCR-ABL transkripti, lokalizasyonu; sitoplazmik bir proteindir (Laurent ve ark., 2001).

4. 5. KML Progresyonu İle İlişkili Hücresel ve Moleküler Olaylar

KML progresyonu ile ilişkili hücresel, genetik ve moleküler olaylar, tümör supresör gen inaktivasyonu ve ilgili diğer hususlar şu şekilde özetlenmiştir;

- Hücresel olaylar; artan proliferasyon, ilaç direnci, azalmış apoptoz, diferansiyasyonun engellenmesi, anormal immün gözetim
- Genetik ve moleküler olaylar; onkogen oluşumu/aktivasyonu, Ph duplikasyonu, c-myc, RB, AML-EV1
- Tümör supresör gen inaktivasyonu; p53 kaybı, p16^{INK4A}
- Diğer Hususlar; c-ABL hipometilasyonu, genomik instabilite, bozulmuş DNA onarımı, imprinting kaybı.

4. 6. KML’de Progresyonun Hücresel Ve Moleküler Mekanizmaları



Şekil 10 : KML’nin patogeneğinde sorumlu mekanizmalar. Üç büyük mekanizma malign transformasyonda rol oynamaktadır; stroma hücreleri ve hücre dışı matrikste değişmiş adezyon, yapısal olarak aktif mitojenik sinyalizasyon ve apoptoz inhibisyonu. Dördüncü olası mekanizma, ABL inhibitör proteinlerinin proteazom aracılı degradasyonudur (Deininger ve ark., 2000).

4. 6. 1. BCR-ABL1’de kinaz aktivasyonu

Tirozin kinaz aktivitesi hücresel sinyalizasyon, çoğalma, yaşama, diferansiyasyon, motilite ve büyüme için gereklidir. Kinaz aktivitesi, belirli aminoasitlere (tirozin, serin, treonin) fosfat grubu ekleme işlevini ifade eder. Çeşitli sistemlerde yüksek tirozin kinaz aktivitesi onkojenik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. ABL proteinini normal olarak, çok düşük yapısal kinaz aktivitesine sahip bir nonreseptör tirozin kinazıdır. p210Bcr-Abl ve p190Bcr-Abl proteinlerinde ise tirozin kinaz enzimatik aktivitesi aktif haldedir. Tirozin kinaz aktivitesi, füzyon proteinlerde ABL segmentinde bulunan kinaz domaininden kaynaklanır. BCR-ABL’nin dönüşüm aktivitesinin derecesinin, tirozin kinaz etkinliğinin derecesiyle korole olduğu görülmüştür ve bu aktivite, büyüme faktörü bağımsız olarak hücrelerin BCR-ABL kazanmasına sebebiyet vermektedir. Ayrıca BCR-ABL, hücresel proteinlerin (P62DOK proteinini; Adaptör fonksiyon, Crkl; Adaptör, Shc; Adaptör, Talin; hücre

iskeleti/hücre membranı, Paxillin; hücre iskeleti/hücre membranı, Fak; hücre iskeleti/hücre membranı, Fes; myeloid diferansiyasyon, Ras-GAP; Ras-GTPaz, GAP-associated proteinleri; Ras aktivasyonu, PLC; fosfolipaz, PI3 kinase (p85 subunit); Serin kinaz, Syp; sitoplazmik fosfataz, Bap-1; 14-3-3 protein, Vav; Hematopoietik diferansiyasyon gibi) tirozin fosforilasyonunu indükler. Otofosforilasyon nedeniyle BCR-ABL'de fosfotirozin belirgin bir artıştır. (Deininger ve ark., 2000; Laurent ve ark., 2001).

BCR-ABL füzyonu gerçekleşip molekülde dimerizasyon meydana gelince, ABL üzerindeki tirozinlerin transfosforilasyonu tetiklenir ve bu durum ABL kinazı aktive eder. Fosforile tirozinler, diğer proteinlerde SH2 domaini için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu şekilde BCR-ABL1, hücre içinde farklı sinyal iletim molekülleri ile ilişkiye geçer (Deininger ve ark., 2000).

p210 BCR/ABL'nin coiled coil bölgesinin oligomerizasyonu ve ABL'nin SH3 domainin delesyonu veya pozisyonel değişikliği sonucunda BCR-ABL onkoproteini, tirozin kinazı aktive eder. Bu, p210BCR/ABL'nin, Y-177 tirozin kalıntısı üzerinde kendisini fosforile etmesi ile sonuçlanır (Shet ve ark., 2002). Çeşitli proteinlerin SH3 domaine bağlandığı tanımlanmıştır; bunlardan Abi-1 ve Abi-2 (Abl interactor proteins 1 ve 2), SH3 domainin inhibisyon fonksiyonunu aktive eder. Başka bir aday inhibitör; Pag / Msp23'dür (Deininger ve ark., 2000).

KontROLSÜZ kinaz aktivitesi sonucu düzensiz hücre proliferasyonu, lösemik hücrelerin kemik iliği stromasına aderansında azalma, mutajenik uyarılara karşı apoptotik yanıtta azalma görülür (Goldman ve Melo, 2003). BCR-ABL, DNA tamir mekanizmaları modülasyonunun, hücre siklusu kontrol noktalarının ve Bcl-2 protein ailesi üyelerinin irradasyonu ile sitostatik ilaçlara karşı direnci teşvik eder. Sinyal yollarının uyarılması ile BCR-ABL, büyüme faktörlerinin yokluğunda hücrelerde proliferasyonu sağlar, external sağkalım faktörlerinin yokluğunda apoptozdan korur ve invazyon ve metastazı teşvik eder. Hücreleri genotoksik tedavilere dirençli hale getirir (Rana ve ark., 2011).

4. 6. 2. BCR-ABL1’de değişen adezyon özellikleri

KML progenitör hücreleri, kemik iliği stroma hücreleri ve ekstraselüler matrikse azalmış adezyon özelliği gösterir. Bu senaryoda stromaya adezyon, hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenler ve KML hücreleri bu düzenlemekten kaçır. KML’de aktif terapötik madde olan İnterferon-alfa, adezyon defektlerini tersine çevirme özelliğindedir. Stroma ve progenitör hücreleri arasındaki etkileşimde beta-integrinler önemli bir role sahiptir. KML hücreleri beta1 integrinin normal progenitörlerde bulunmayan bir adezyon-inhibitör varyantını eksprese eder. Reseptörlerine bağlandığında integrinler dışarıdan içeriye doğru normal sinyal iletimini başlatma yeteneğine sahiptir; bu sinyallerin aktarımı, normalde inhibe olan proliferasyonun KML hücrelerinde bozulduğunu düşündürür. Bcr-Abl kinaz aktivitesinin inhibisyonu, beta1 integrin-aracılı adezyonu restore eder (Deininger ve ark., 2000; Laurent ve ark., 2001).

4. 6. 3. Sinyal yolaklarının aktivasyonu

BCR-ABL onkoproteini, majör sinyal yolaklarının aktivasyonu ile KML progresyonunda hayati bir role sahiptir. Bu sinyal yolakları; Ras-MAP kinaz yolağı, JAK-STAT yolağı ve PI3K-Akt yolağıdır. BCR-ABL füzyon proteini, KML gelişiminde önemli bir role sahip olan c-myc, c-fos ve CDK genlerinin aktivasyonuna neden olur (Rana ve ark., 2011)

4. 6. 3. 1. Ras ve MAP kinaz yolağı

Bcr-Abl ve Ras arasında çeşitli bağlantılar tanımlanmıştır. Tirozin177 otofosforilasyonu, adaptör molekülü Grb-2 için bir bağlanma bölgesi sağlar. Grb-2 Sos proteinine bağlanır, GTP-bağlı aktif formunda Ras’ı stabilize eder. Diğer iki adaptör molekül, Shc ve Crkl, Ras’ı etkinleştirebilir. Bu moleküller BCR-ABL substratlarıdır, SH2 (Shc) veya SH3 (Crkl) domainlerinden BCR-ABL’ye bağlanırlar. Bağlanma proteini p62DOK de bu yolakla ilişkilidir, Dok-1 (p62DOK), bu ortamda en önemli fosfoproteinlerden biridir; Crkl, RasGAP ve BCR-ABL ile

kompleksler oluşturur. Ras aktivasyonu, Ph⁺ lösemilerin patogenezinde önemlidir (Deininger ve ark., 2000).

Sitokin reseptörlerinin uyarılması (İL-3 gibi) Ras'ı aktive eder ve aktif Ras proteini, serin-threonin kinaz Raf'a bağlanır ve Raf proteini hücre membranında toplanır, serin treonin aminoasitlerince fosforillenir ve Raf proteini aktive olur. Aktif Raf, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden sinyalizasyon kaskadını başlatır. MAP kinaz yolunun üçüncü ayağı olan p38'in, BCR-ABL transforme edilmiş hücrelerde ve mitojenik potansiyeli olan diğer yolaklarda aktif olduğuna dair bulgular vardır (Deininger ve ark., 2000).

4. 6. 3. 2. Jak-Stat yolağı

Hematopoiezis, büyüme faktörleri tarafından düzenlenir ve miyeloid hücrelerinde, interlökin 3 gibi sitokinlerde ve granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktöründe kendi reseptörlerine bağlanarak Jak/Stat sinyal yolunu aktive eder. Kendi tirozin artıkları üzerinde fosforilasyonları, Jak proteinini aktive edebilir ve onlar da tirozin fosforilasyonu yoluyla Stat proteinlerini aktif hale getirebilir (Laurent ve ark., 2001).

Stat transkripsiyon faktörlerinin (Stat1 ve Stat5) fosforilasyonu birçok BCR-ABL pozitif hücre hatlarında ve primer KML hücrelerinde bildirilmiştir. Stat5 aktivasyonu malign dönüşüme katkı sağlamaktadır. Stat5, BCR-ABL transforme edilmiş hücrelerde anti-apoptotik bir etkiye sahiptir ve Bcl-xL'in transkripsiyonel aktivasyonunu içerir. Fizyolojik uyaranlarla Jak-Stat yolağının aktivasyonunun tersine, Bcr-Abl önce Jak proteinleri fosforilasyondan olmadan, doğrudan Stat1 ve Stat5 transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir (Deininger ve ark., 2000). Stat5'in BCR-ABL-aracılı aktivasyonu ve Bcl xL düzeylerindeki müteakip artış, apoptozise direncini arttırabilir (Shet ve ark., 2002).

Fosfo-Stat5, büyüme faktörlerinden bağımsız gelişim için gereklidir ve KML hastalarından geliştirilen BCR-ABL hücre hatlarının anti-apoptotik aktivitesine ve transformasyonuna katkıda bulunur (Laurent ve ark., 2001).

4. 6. 3. 3. PI3 kinaz yolağı

PI3 kinaz aktivitesi, BCR-ABL pozitif hücre proliferasyonu için gereklidir. PI3 kinaz aktive olduğunda BCR-ABL, PI3 kinaz, Cbl ve Crk ve Crkl adaptör molekülleri ile multimerik kompleksler oluşturur (Deininger ve ark., 2000). PI-3k, inositol halkasının D-39 pozisyonunda phosphoinositollerini fosforilatlama faaliyeti ile tespit edilmiştir ve yeni fosfoinosititler üretir. Aktif PI3K ve AKT, değişmiş hücre adezyonu ve göçünde yer almaktadır. BCR-ABL, PI3K-AKT yolunun aktivasyonuna neden olur, bu da programlanmış hücre ölümünü baskılar (Rana ve ark., 2011) p210BCR/ABL, PI(3)K/Akt yolağını aktive ederek BCL-2 ekspresyonunu artırır, ve STAT5'i fosforile eder, bu durum KML progenitörlerinin apoptoz direncini artırır. PI(3)- K/Akt yolağının fosforilasyonu ve aktivasyonu, BCR-ABL'de antiapoptozisin majör yolağıdır. Ayrıca PI(3) kinaz, protein kinaz B yoluyla aktive olur, bu durum, bcl-2 familyasının bir üyesi olan pro-apoptotik BAD proteininin fosforilasyonu ve inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. BCL-2 ekspresyonunun artışı, apoptozun azalmasına neden olur. BCR-ABL-aracılı STAT5 aktivasyonu sonucu Bcl xl seviyelerindeki artış, apoptosise direncini arttırabilir (Shet ve ark., 2002).

4. 6. 3. 4. Myc yolağı

Myc'nin aşırı ekspresyonu birçok insan malinitesinde gösterilmiştir. BCR-ABL tarafından Myc'nin aktivasyonu, SH2 bölgesine bağlıdır. Hücresel bağlamda, Myc proliferatif veya apoptotik bir sinyal oluşturabilir, onun bu ikili fonksiyonunun apoptotik kolunun, PI3 kinaz yolağı gibi diğer mekanizmalar ile KML'de dengeleyici olması muhtemeldir (Deininger ve ark., 2000). c-MYC, BCR-ABL aracılı transformasyonda rol oynar; p53 fonksiyonunu antagonize ederek etkilerine aracılık edebilir ya da BCR-ABL ile işbirlik eden onkogen olarak davranır. MYC ekspresyonu kronik faz KML'de normaldir ama blast krizindeki hastalarda artmıştır. c-MYC aşırı ekspresyonu; artmış transkripsiyon sonucu, hastalığın ilerlemesi sırasında sık gözlenen trizomi 8 sonucu veya poliadenilasyonu nedeniyle c-MYC mRNA'sının stabilizasyonu sonucu oluşur (Shet ve ark., 2002).

4. 6. 4. Diğer mekanizmalar

Klinik olarak kronik faz KML, tedavide önemli bir yönetim sorunu çıkarmaz çünkü beyaz kan hücresi sayımı hastaların çoğunda sitotoksik maddeler ile kolayca kontrol edilir ve nötrofil ve trombosit fonksiyonları büyük ölçüde normaldir. Ancak, hastalık genellikle tanıdan sonra 5 yıl içinde akselere ve blast krize kaçınılmaz şekilde ilerler (Deininger ve ark., 2000; Holyoake ve Helgason, 2015).

Bu gelişimin altında yatan mekanizmalar, önceki bölümlerde anlatılanlara ek olarak şunlardır: BCR-ABL mRNA'sının artmış ekspresyonu, genellikle hastalığın ilerlemesi ile ilişkilidir. Bu, Philadelphia kromozomu dublikasyonu nedeniyle olabilir. Bu nedenle akselere faz ve blast krizinde apoptoza karşı artan dirence yol açabilir. KML karakteristik özelliği olmasına rağmen, yalnız başına apoptoz hastalığın transformasyonu için yeterli değildir ve hastalığın ilerlemesi, örneğin bir tümör baskılayıcı gen kaybı gibi ek anomalilerin varlığını gerektirir (Shet ve ark., 2002).

KML tedavi edilmezse yaklaşık 5 yıl içinde kronik fazdan akselere faza ve blast kriz fazına ilerler. BCR-ABL1, Ph kromozomunu eksprese eder ve yapısal tirozin kinaz aktivasyonuna neden olur ki bu durum birçok kanserde düzensiz olduğu belirlenen PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK ve JAK/STAT yollarını stimüle eder. KML'de proliferasyon artışı ve apoptoz inhibisyonu yanında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondride seviyesi artar ve bu artış, DNA hasarı ve kromozomal anomaliler ile sonuçlanır. KML hastalarında Tirozin Kinaz Inhibitörü tedavisi ile sağkalım uzamıştır (Holyoake ve Helgason, 2015).

KML'nin kronik fazdan ilerlemesi sırasında Ph klonunun doğal kontrolünde MHC-sınırlı ve MHC-sınırsız mekanizmalar önemli bir rol oynamaktadır. Hedef hücrelerin Fas reseptörü tetiklemesi ile T lenfosit aracılı öldürmesi malign KML hücrelerinin yok edilmesinde önemli bir rol oynar. KML progenitör hücreleri işlevsel Fas ligandını eksprese eder, bu, önemli bir immün gözetimden kaçış faktörü olabilir. Kronik faz ile karşılaştırıldığında, blast krizindeki hastalardan elde edilen KML hücreleri Fas-aracılı apoptoza direnç gösterir (Shet ve ark., 2002).

Genetik açıdan moleküler düzeyde en sık görülen anomali, 17. kromozomun kısa kolunda bulunan bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün delesyonudur, miyeloid blast

krize geçişte esas öncüdür. P53 fonksiyonunun kaybı; mutasyonlar, delesyonlar ve yeniden düzenlemeler nedeniyle olabilir ve miyeloid blast krizinde % 25 oranında görülür. Lenfoid blast krizinde olan hastaların yaklaşık % 50'sinde kromozom 9 üzerinde bulunan p16INK4A geninin homozigot delesyonu vardır, bu gen KML'nin blast krize ilerlemesi ile ilişkilidir. Daha az sıklıkla görülen kazanılmış diğer genetik anomaliler; retinoblastoma geninin delesyonu, c-MYC ve N-RAS'ın aşırı ekspresyonu ve bir onkogen olan AML-EVI1'in üretimidir. AML/EVI1 füzyon proteini, diferansiyasyonu engeller ve proliferasyonu stimüle eder. (Shet ve ark., 2002).

c-ABL proksimal promoter metilasyonundaki değişikliklerin KML ilerlemesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Kronik fazda ABL promotörü nadiren metile olur; geç kronik faz, akselere faz ve blast krizinde progresif hipermetilasyon olur. Metilasyon ile c-ABL promotörünün susturulması, nükleer P145 ABL düzeyinin azalmasına neden olur; apoptoz azalır ve genomik instabilite artar (Shet ve ark., 2002).

BCR-ABL'nin Na-K-ATPaz'da ve HPRT genomik lokusunda mutasyon oranını arttırdığı belirlenmiştir. İkisi de mutasyon frekansını ölçmek için yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir (Deininger ve ark., 2000).

4. 7. KML'de Genetik Anomalileleri Tespit Etme Yöntemleri

BCR-ABL1 füzyon gen ürünü KML tanısı, ilaca yanıtın monitörizasyonu, MRD takibi durumlarında çeşitli yöntemlerin kullanımı ile değerlendirilir (Tablo 4). KML'de genetik anomalileleri tespit etmek için; sitogenetik yöntemler, FISH, dizi analizi, subklonlama sonrası dizi analizi, denatüran yüksek performanslı likit kromatografi (DHPLC), pyrosequencing, double-gradient denatüran elektroforez, Allel spesifik oligonükleotid (ASO) PZR, Q RT PZR, Nested PZR yöntemleri kullanılabilir (Ai J ve Tiu RV, 2014).

Tablo 4: KML’de mutasyon tespit etme yöntemleri ve özellikleri (Ai J ve Tiu RV, 2014).

METOD	HASSASIYET	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Dizi analizi	% 10–25	.Yaygın olarak kullanılır, .Yeni mutasyon tespiti	. Zaman tüketici ve yoğun emek alır, . Nispeten duyarsız, . RNA örneklerinin kalitesine bağlıdır
D-HPLC	% 0.1–10	. Dizi varyasyonu tespit edebilir, . Doğrudan dizi analizi yapılacak çok sayıda örneğin taranması için kullanılabilir	. Dizi analizi kadar yaygın kullanılmaz, . Mutant altklon bol ise yalancı negatif sonuç vermesi mümkün
Pyrosequencing	% 0.1–5	. Son derece duyarlı ve özgül, . Internal kalite ve negatif kontroller	. Kısa okuma uzunluğu . Yaygın kullanılmaz . Mutant % 1’in altına tespit edilirse hata eğilimi yüksek
ASO PCR	% 0.001– 0.01	. Son derece hassas . Kantitatif . Uygulaması kolay	. Yaygın kullanılmaz, . Belirli mutasyonları tespit etmek için tasarlanır, emek alıcı, . yakın yerleşimli mutasyonlara duyarsız

4. 7. 1. Sitogenetik yöntemler

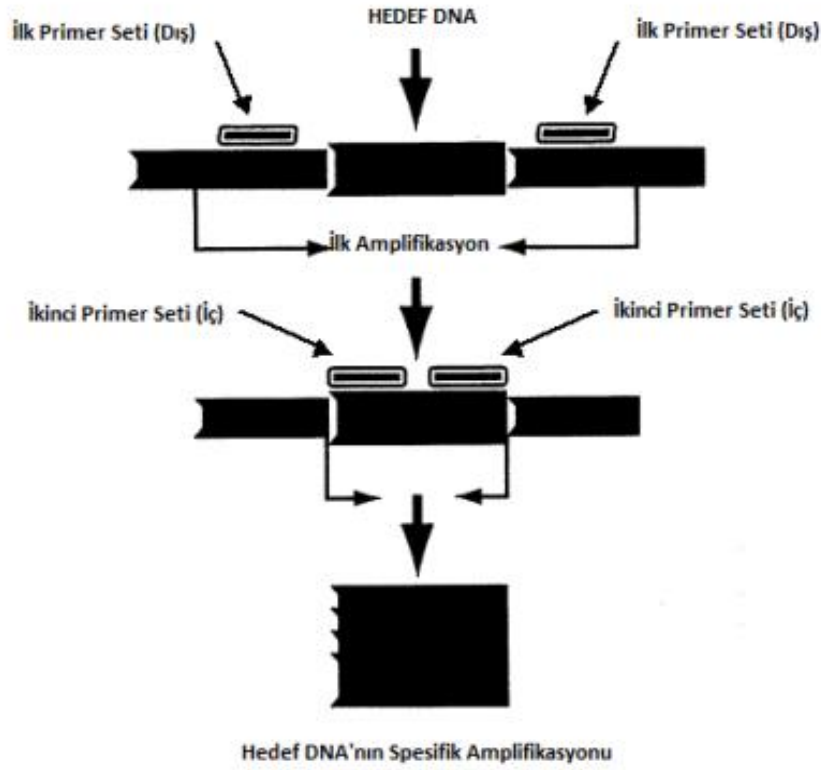
Sitogenetik takip, kemik iliği incelemesinde Ph (+) metafaz bakılması esasına dayanır; sitogenetik yanıt, floresans insitu hibridizasyon (FISH) ve/veya konvansiyonel sitogenetik incelemeleri ile takip edilir. Tanıda, 3. ve 6. ayda, tam sitogenetik yanıt elde edilmesine kadar 6 ayda bir, daha sonra 12 ayda bir (düzenli moleküler takip yapılamıyorsa)

- Tedaviye yanıtsızlık (primer veya sekonder direnç) durumunda her zaman

-Açıklanamayan anemi, lökopeni, trombositopeni gelişiminde her zaman yapılmalıdır (Soysal ve Eşkazan, 2012).

4. 7. 2. Nested PCR

Nested (Yuvalanmış) PCR, standart PCR'ın bir modifikasyonudur. İstenmeyen primer bağlanma bölgelerinin amplifikasyonu (yanlış eşleşme, nonspesifik bağlanma) nedeni ile oluşan ürün kontaminasyonunu azaltmayı amaçlar. Böylece PCR tekniğinin hassasiyeti artırılır. İstenilen DNA dizisinin bulunup çoğaltılmasında hassasiyeti 10000 kat artırdığı tahmin edilmektedir. Bu reaksiyon mekanizmasında birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonunu içermektedir. İlk amplifikasyonda hedef DNA'nın dış bölgesine özgün iki dış primer kullanılır ve 15-30 döngü ile bu uzun bölge çoğaltılır. İkinci amplifikasyon basamağında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak 15-30 döngü ile küçük bölgenin çoğaltılması sağlanmaktadır (Şekil 11). İkinci PCR işleminden sonra ortada istenilmeyen DNA dizisi kalmamaktadır. İkinci PCR işleminde kullanılan primerlerin 3' ucunda bulunan iki veya üç nükleotidlik dizi yöntemin hassasiyetini ortaya çıkarmaktadır. Eğer 3' nükleotid dizisi hedef DNA dizisinin komplementeri değilse amplifikasyon meydana gelmeyecektir. Bu durumda hedef olmayan dizilerin çoğaltımı engellenecektir. Yöntemin en büyük avantajı, nonspesifik amplifikasyon olasılığının çok düşük olmasıdır. Yüksek hassasiyete sahip bu tekniğin dezavantajı ise yüksek kontaminasyon riskidir (Sevindik ve Abacı, 2012).



Şekil 11: Nested PCR çalışma akışı (Sevindik ve Abacı, 2012).

4. 7. 3. ASO PCR

Bilinen mutasyonları tespit etmek için tasarlanan bir PCR çeşitidir. % 0.001– 0.01 oranında mutasyon saptama hassasiyetine sahiptir. Kantitatifdir. Uygulaması kolay, hızlı ve ekonomiktir. Ancak yaygın kullanılmaz. Dezavantajı ise yakın yerleşimli mutasyonlara karşı duyarsız olmasıdır (Ai J ve Tiu RV, 2014).

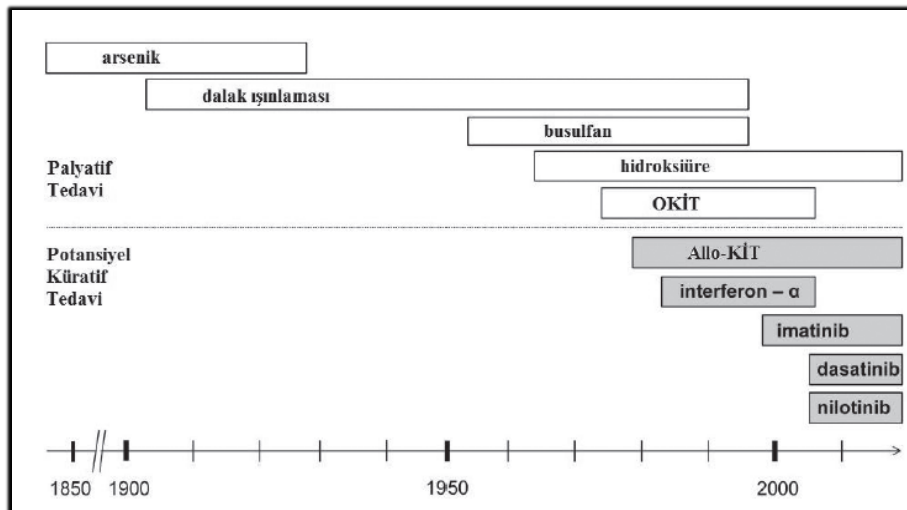
4. 7. 4. Dizi analizi

DNA Dizi Analizi için iki yöntem mevcuttur. Bunlar; Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir. DNA dizi analizinde en sık kullanılan yöntem zincir sonlanma yöntemidir, enzimatik DNA sentezine dayanır. Yöntemin temelinde DNA polimeraz, dNTP'leri (deoksiribonükleozit trifosfat) ve ayrıca deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri substrat olarak kullanabilir. Sentezlenen DNA'ya bir

ddNTP'nin katılması ile 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentez durur. Dizi analizi uygulaması gerçekleştirilirken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Karışımların her biri kalıp DNA zincirini, bir primeri, dNTP'lerin dördünü ve ddNTP'lerden birini içerir. Spesifik zincir sonlanmasını sağlamak için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Her bir reaksiyonda az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığından yeni zincir sentezi gelişigüzel sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir. Elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanır, jel üzerinde yan yana yürütülür. Elektriksel alanın etkisi ile DNA parçaları en kısıf en önde olmak üzere ilerleyerek jel üzerinde adeta bir merdiven görüntüsü oluşturur. Jel üzerinde tespit edilen bu DNA parçaları, reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin türüne göre okunur (Klug ve ark., 2006).

4. 8. KML'de Tedavi Yöntemleri

Tedavinin amacı; BCR/ABL transkriptini içeren artık hücrelerin eradikasyonu ile oluşan uzun süreli, sürekli, nonklonal hematopoez elde etmektir. Bu nedenle amaç, tam moleküler remisyon ve kürdür. Tedavi seçenekleri; İnterferon α , İmatinib mesilat, diğer TKİ'ler (Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Ponatinib), allojenik kök hücre transplantasyonu, kemoterapi (busulfan, hidroksiüre), otolog kök hücre transplantasyonu, lökoferez ve splenektomidir (Şekil 12) (Pavlu ve ark., 2011).



Şekil 12: Kronik miyeloid lösemi tedavisinin tarihsel gelişimi (Pavlu ve ark., 2011).

4. 8. 1. Kemoterapi

Hastalarda beyaz küre sayısını hızla düşürmek, semptomları azaltmak ve splenomegaliyi geri döndürmek için kullanılır. Bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan hidroksiüre, hızla hastalığı kontrol eder. Başlangıç dozu 1-4 gram/gündür; doz lökosit sayısının %50 azalması ile yarıya indirilir. Hidroksiüre ile sitogenetik remisyon nadirdir. Busulfan alkilleyici bir ajan olup erken öncü hücrelere etki eder. Etkisi uzun sürelidir ama yan etkileri sebebiyle önerilmemektedir. Hidroksiüre veya busulfan gibi bir tane ajanla kemoterapi kronik fazda KML'nin denetimini, lökosit sayısının normal düzeyde tutulmasını ve semptomatik splenomegalinin kontrol edilebilmesini sağlayabilir. Fakat sitogenetik ve moleküler yanıt oluşturamaz. Uzun süreli sağkalımda da anlamlı bir etki gösteremez (Goldman JM., 2010).

4. 8. 2. Lökoferez ve Splenektomi;

Kronik faz KML'de yoğun lökoferez kan hücre sayısını kontrol edebilir ancak hantal ve pahalı bir işlemdir. Geçmiş dönemde KML'li hastalarda akselere fazın dalak içinde olabileceği düşüncesi ile splenektomi yapılırdı. Ancak günümüzde bu şekilde değerlendirilmemektedir; kemoterapi veya İmatinib'e cevap vermeyen ağırlı splenomegalide kullanılır.

4. 8. 3. Otolog KHT

Eğer diğer malign hücreler ile birlikte bulunan rezidüel normal öncü hücreler elde edilebilirse, KML otolog kök hücre transplantasyonu ile güçlü bir şekilde tedavi edilebilir. Otolog KHT, 1970'li yıllarda KML tedavisinde yer almıştır ancak sonraki yıllarda terk edilmiştir (Pavlu ve ark., 2011).

4. 8. 4. Allojenik KHT

Transplantasyon işlemi ile ilişkili erken mortalite ile komplikedir. Kök hücre transplantasyonunun seyri şu etkenlere bağlıdır; hastanın yaşı ve hastalık fazı, donörün tipi veya akraba/akraba dışı HLA uyumlu, hazırlama rejimi,

posttransplantasyon rejimi. Allojenik KHT sonrası rölaps olan KML hastalarında donör lenfosit infüzyonları ile birlikte İmatinib kullanılması hızlı moleküler remisyona neden olur. Allojenik KHT tedavisi ile yaşlı hastalarda mortalite olasılığı daha yüksektir. Hastalık evresi transplantasyon başarısı ile ilişkilidir; kronik fazda, blastik fazda uygulananlara göre hastalıktan bağımsız yaşam süresi daha uzundur. İmatinib'in keşfi ile Allojenik KHT, KML için ilk tedavi seçeneği olmaktan çıkmıştır. AlloKİT, TKİ tedavisine kalıcı yanıt alınamayan hastalarda kür sağlayabilen ve 2. kuşak TKİ'ne yanıtsız hastalarda 3. veya 4. sıralarda yer alan bir tedavi yaklaşımıdır. Kronik faz KML hastalarında 2. Kuşak TKİ'den en az birine dirençli veya tolere edememesi durumunda uygulanabilir. Nakil sonrası RQ-PCR ile takip edilen hastalarda nüks olursa donör lenfosit infüzyonları ve/veya TKİ uygulanabilir (Pavlu ve ark., 2011).

4. 8. 5. İnterferon α (IFN- α)

İmatinib tedavisi öncesi, allojenik kök hücre transplantasyonu mümkün olmadığı zaman IFN- α etkindir. INF-alfa, TKI kullanılmadığı durumlarda kullanılabilir. INF - alfa + TKI kullanışlıdır fakat deneysel aşamadır. Kronik faz-KML olgularında kullanıldığı zaman hastaların %70'inden fazlasında hematolojik yanıt, %15-30'unda ise majör sitogenetik yanıt alınmıştır (Baccarani ve ark., 2013).

4. 8. 6. İmatinib mesilat

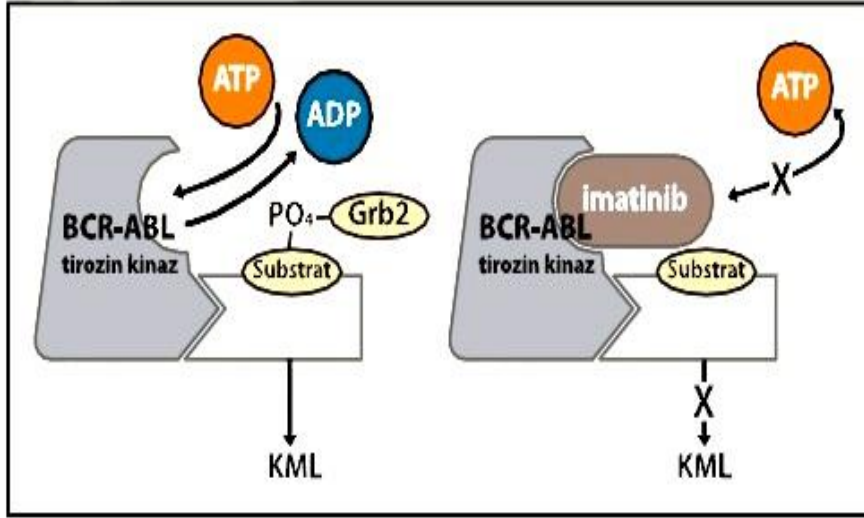
İmatinib mesilat (Gleevec, STI571), 1990 yıllarında Nicholas Lydon tarafından geliştirilmiştir, oral yolla kullanılabilen bir moleküldür. KML tedavisi için 2001 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. İmatinib, Tip II protein kinaz inhibitörü sınıfında yer alır ve tirozin kinazların aktivitesini azaltır. Tirozin kinazlar, ATP'den fosforu koparıp tirozin amino asidine transfer eden enzimlerdir. Hücre büyümesi, proliferasyon, apoptozis ve hücre içi uyarı iletiminde önemli görevleri vardır. İnsan vücudunda birçok tirozin kinaz enzimi mevcutsa da İmatinib'in hedef aldığı tirozin kinaz bölgesi; abl, c-kit ve PDGF-R (trombosit kökenli büyüme faktörü) bağlı tirozin kinazlarda mevcuttur. İmatinib bilhassa BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesini azaltmakla görevlidir (Tuğlu ve Melli, 2012).

İmatinib, BCR/ABL sinyal iletimde yer alan proteinlerin tirozin fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olan inaktif yapıdaki ABL kinazın ATP'ye bağlanma yerinde kompetitif inhibisyon ile görev yapar. Hücrelerde apoptozu uyarır. Yeni tanı KML'de İmatinib (400 mg/gün), IFN- α ve sitarabin'den daha etkindir. İmatinib tedavisi alan hastalarda 18. ayda tam remisyon oranı % 97'dir. Moleküler remisyon elde edilen (% 26) ve İmatinib ile tedavi edilen hastalar tedavi öncesi değere göre kıyaslandığında 18. ayda BCR/ABL yazılımında 3 log azalma ile tanımlanır, bu hastalar 5. yılda hastalıksız sağ kalım olan hastalarda moleküler remisyon oranı %98'dir. 18. ayda tam remisyon elde edilemeyen hastalarda 5 yıllık hastalıksız sağ kalım %98'dir.

İmatinibin biyoyararlanımı %98'dir. Sitokrom (CYP) P450 enzim sistemleri tarafından karaciğerde metabolize edilir. Bu enzimler CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19'dir. Bu enzimlerin aktivitesinde herhangi bir değişiklik İmatinib'in plazma konsantrasyonunu değiştirir. İmatinibin en önemli metaboliti Ndemethylated piperazine'dir. Eliminasyonun büyük kısmı metabolitlerin safra ve gaita ile atılmasıyla gerçekleşir, az bir kısmı idrar ile uzaklaştırılır, %25'i değişmeden atılır. İmatinibin yarı ömrü 18 saattir. Kronik faz-KML hastalarında imatinib tedavisinin dozu oral olarak 400 mg/gün'dür. Kronik fazdaki KML hastalarına uygulandığında %80'e varan oranda komple sitogenetik cevap alınır. Yan etkileri arasında mielosüpresyon, kilo artışı, kan hücrelerinde azalma, baş ağrısı, ödem, bulantı, döküntü, kas ve iskelet ağrıları, halsizlik, doza bağımlı hepatotoksisite yer alır. İmatinibin daha az görülen bir yan etkisi, kalp yetmezliğidir. Puberte öncesi çocuklarda kullanıldığında gelişme geriliği yapabildiği ifade edilmiştir. (Tuğlu ve Melli, 2012; Soysal ve Eşkazan, 2012).

İmatinib, 2-fenilaminopirimidin bir türevidir, Abl-onkogenine yüksek afinite ve selektivite gösterir. Abl-onkogeni, protein kinaz aktivitesi ile etkisini gösterir. Katalitik bölgesinde bir "nukleotid-bağlayıcı-cep" ve bir "aktivasyon loop" mevcuttur. "Aktivasyon loop" kısmı tirozin kinazın aktivitesini kontrol eder. İmatinib, Abl-Nukleotid bağlayıcı-cep kısmına bağlanır, "aktivasyon loop" bölümünü inaktive eder ve böylece ATP bağlanmasını önler. Bu sayede İmatinib etkin bir TKİ olarak BCR-ABL substrat proteinlerindeki tirozin residülerinin ATP ile fosforilasyonunu önler. Sonuç olarak BCR-ABL sinyal iletim yolları inhibe olur

(Şekil 13). İmatinib, lösemili hücrelerde sinyal yollarını etkin bir şekilde inhibe eder, normal hücre sinyal mekanizmalarına olumsuz etkisi yoktur (Tuğlu ve Melli, 2012).



Şekil 13:İmatinib'in etki mekanizması. (http://www.kmlhastaligi.org/icerik.php?id=117&alt_id=142&tab=0 Erişim tarihi: 3 kasım 2015)

4. 8. 6. 1. İmatinib direnci

Kronik myeloid löseminin moleküler temeline dair edinilen bilgiler, hedeflenmiş bir anti-kanser bileşiğin gelişmesine olanak sağlamıştır ki bu bileşik, 2-fenilaminopirimidindir (eski adı CGP57148, şimdi İmatinib Mesilat).

Kronik Miyeloid Lösemi hastalarının büyük bir çoğunluğu TKİ İmatinib Mesilat'a cevap vermesine rağmen ilaca karşı direnç de novo veya tedavi sırasında ortaya çıkabilir. Daha önceki çalışmalara göre hastaların yaklaşık %20'sinde İmatinib tedavisi, BCR/ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları nedeniyle başarısızdır. Kinaz bölgesi dışındaki mutasyonların da İmatinib direncine bir dereceye kadar katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Kinaz domaini, kinaz aktivitesi üzerinde otoinhibitör etkiye sahiptir ve bu bölgedeki mutasyonlar enzimi aktive edebilir (Vaidya ve ark., 2015).

İmatinib mesilat'ın direnç mekanizması; BCR-ABL aşırı ekspresyonunu, BCR-ABL onkogen amplifikasyonunu, ABL-aktivasyon bölgesi içindeki mutasyonları, artmış

seviyede plazma 1 asit glikoproteinini, sitogenetik ve klonal gelişimleri içerir. İmatinib mesilat direncinin üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler araştırılmaktadır. Bunlardan biri de, İmatinib mesilat dozunu arttırmaktır. Yapılan deneylere göre, akselere faz KML’de 600 mg imatinib mesilat, 400 mg İmatinib mesilat’a kıyasla daha iyi sağ kalım oranına sahiptir. (Kantarjian ve ark., 2003)

4. 8. 7. Diğer TKİ’ler

İmatinib intoleransı, İmatinib direnci, İmatinibe suboptimal yanıt gibi durumlarda 2. Nesil TKİ’lerden birine geçiş olur. İlaç seçerken, ilaçların yan etkileri ve hastada mevcut olan komorbiditeler göz önünde tutulmalıdır.

2. nesil TKİ olan Nilotinib (Tasigna, eski adı AMN107), 2007 yılında onaylanmıştır. KML kronik faz ve akselere fazda dirençli olan hastalar için ve İmatinib dahil olmak üzere bir önceki tedaviye intolerant olan hastalar için tasarlanmıştır. İmatinib’e benzer olarak BCR-ABL kinazın inaktif konformasyonuna bağlanır, ancak daha güçlü ve seçici bir inhibitördür. İmatinibe dirençli veya intolerant KML-CP yetişkinlerin günde iki kez 400 mg Nilotinib ile tedavi edilmesi uygundur (Jabbour ve ark., 2010; Ai ve Tiu, 2014).

2. nesil TKİ olan Dasatinib (Sprycel®), ABL1 ve SRC kinaz inhibitörüdür. 2010 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Kronik faz KML hastalarında başlangıç dozu olarak günde bir kez 100 mg kullanılır. Kronik, blastik veya akselere faz ve İmatinib dahil olmak üzere önceki tedaviye intolerant veya dirençli olan KML hastalarında günde iki kez 70 mg kullanılır. İmatinib ve Nilotinib’e göre Dasatinib, A-loop mutasyonlarından daha az etkilenir. (Jabbour ve ark., 2010; Ai ve Tiu, 2014; Chen ve Chen, 2015)

Bosutinib (Bosulif) 2012 yılında, intolerant ve dirençli KML hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır. Dasatinib gibi SRC/ABL1 inhibitörüdür. Bu TKİ, T315 amino asidini etkileyen mutasyonlara duyarsızdır (Ai ve Tiu, 2014).

Ponatinib (Iclusig, önceki adı AP24534) 2012 yılında, intolerant ve dirençli KML hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır. T315I mutasyonuna sadece Ponatinib duyarlıdır (Baccarani ve ark., 2015).

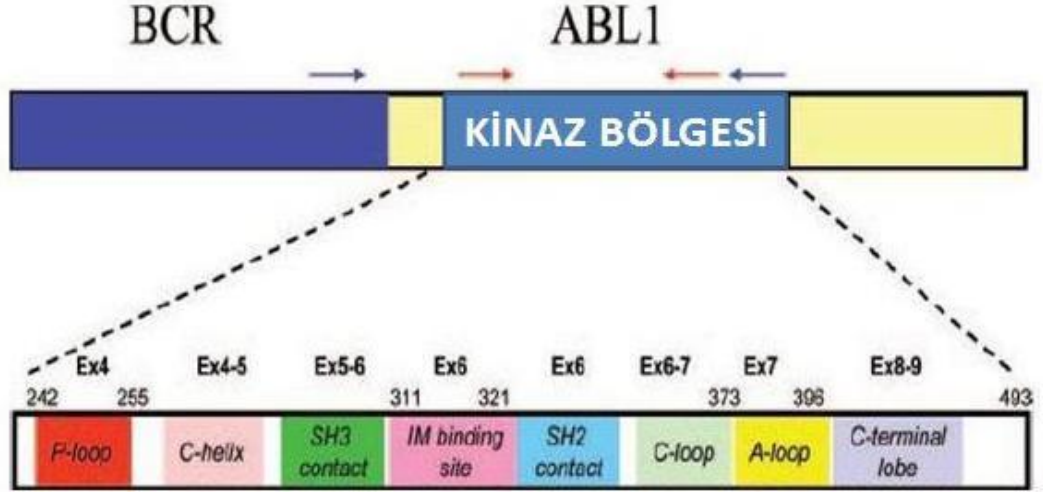
Ne yazık ki 2. Nesil TKİ'leri karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, ikinci nesil TKİ seçimi; hasta özellikleri, yaş ve eşlik eden hastalıklar, ilk TKİ ile yan etkilerin tipine göre, BCR-ABL1 kinaz nokta mutasyonların varlığına göre ve ayrıca ilaç bulunabilirliği, maliyeti ve doktor deneyimine göre yönlendirilir (Baccarani ve ark., 2015). 2. Nesil TKİ'ler için BCR-ABL nokta mutasyonunun duyarlılıkları ile ilgili detaylar Tablo 5'te belirtilmiştir.

Tablo 5: Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib ve Ponatinib için BCR-ABL mutasyonu duyarlılıkları (Jabbour ve ark., 2010; Baccarani ve ark., 2015).

<i>DUYARLILIK</i>	<i>NİLOTİNİB</i>	<i>DASATİNİB</i>	<i>BOSUTİNİB</i>	<i>PONATİNİB</i>
DUYARLI	M244V L248V G250E Q252H E275K D276G V299L T315A F317L M351T E355A/G L387F F486S	M244V G250E Y253F/H F311L M351T F359V V379I L387M H396P		
AZ DUYARLI	E255K/V Y253H F359C/V	Q252H E255K/V V299L F317L T315A	G250E E255K/V	E255K/V H396R
DİRENÇLİ	T315I	T315I	T315I	

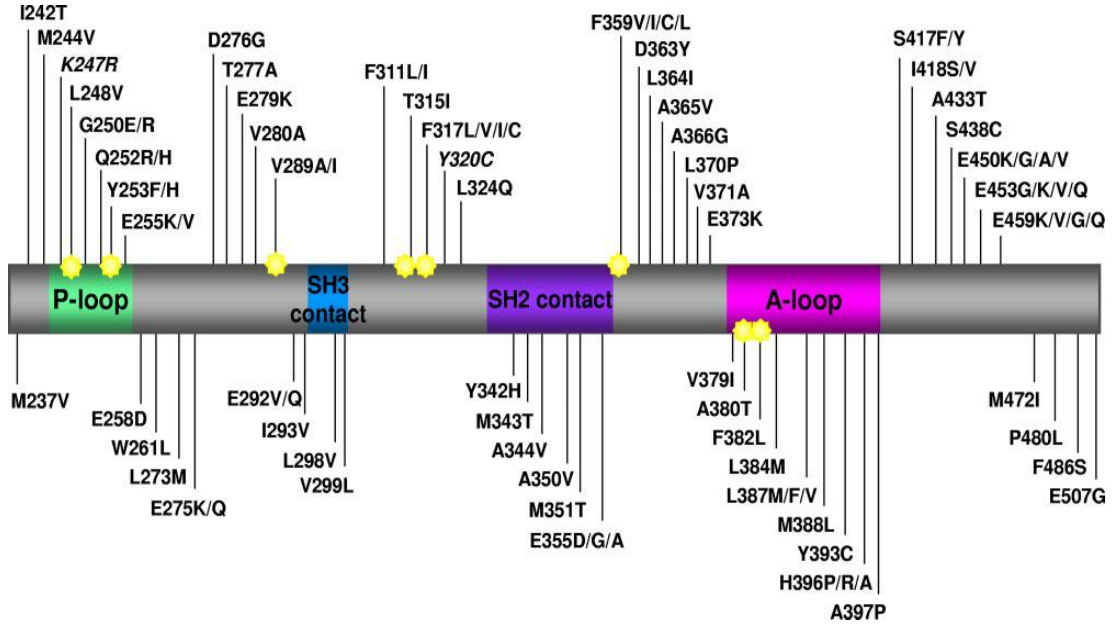
4. 9. BCR-ABL Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonları

BCR-ABL kinaz bölgesi mutasyonları, İmatinib dirençli hastalarda %50 ila % 90 oranında gözlenmiştir. Yapısal olarak ABL kinaz bölgesi, yüksek oranda korunmuş bir P-loop, katalitik bölge ve aktivasyon loop'dan oluşur (Şekil 14).

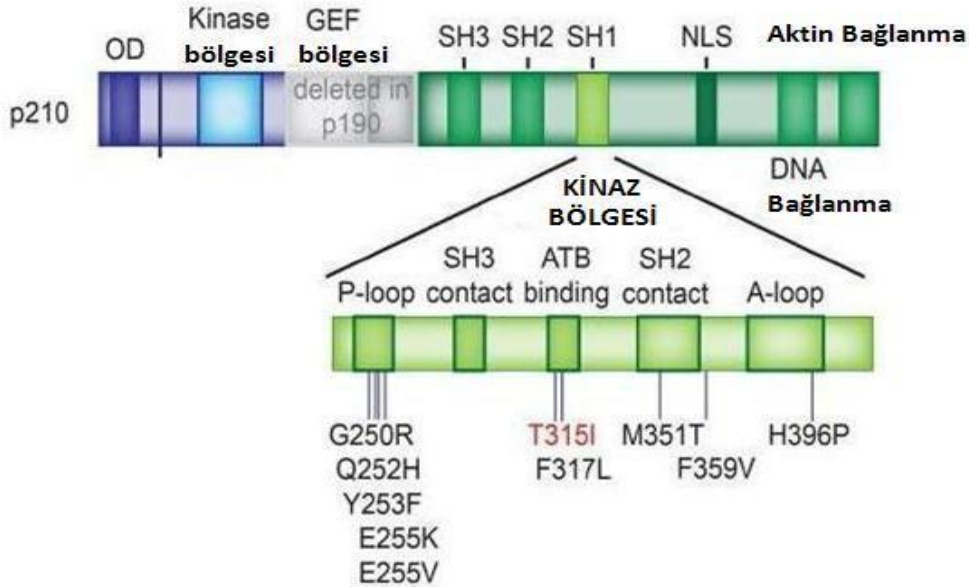


Şekil 14: BCR-ABL füzyon transkript şeması (Jones ve ark., 2009).

Bir mutasyon, iki yol ile İmatinib bağlanmasına etki edebilir; birinci yolda, kinaza ilacın bağlanmasında yer alan bir amino asidi değiştirerek doğrudan inhibisyon yapar. Örneğin T315I mutasyonu, kodon 317'de fenilalaninin lösine dönüştüğü mutasyon [F317L], ve kodon 359'da fenilalaninin sistein veya valine dönüştüğü mutasyon [F359C/V]. İkinci yolda ise mutasyon, BCR-ABL protein konformasyonunu değiştirerek dolaylı inhibisyon yapar. Örneğin, kodon 250'de glisinin glutamik asite dönüştüğü mutasyon [G250E], kodon 252'de glutaminin histidine dönüştüğü mutasyon [Q252H], kodon 253'de tirosinin histidine dönüştüğü mutasyon [Y253H] ve kodon 255'de glutamik asitin lisin veya valine dönüştüğü mutasyon [E255K/V] (Şekil 15 ve Şekil 16). T315İ mutasyonu, İmatinib dirençli hastalarda %4 - %15 sıklığında tanımlanmıştır. Ayrıca 2. Nesil TKİ olan Nilotinib ve Dasatinib'e karşı da direnç oluşturur. Ek olarak T315İ mutasyonu, artmış ATP afinitesi ile de ilişkilidir, bu da dirence katkı sağlayabilir (Jabbour ve ark., 2011).



Şekil 15: İmatinib'e dirençli olan hastalarda BCR-ABL KD'de günümüze dek tespit edilen amino asit değişimlerinin haritası. (P-loop, fosfat bağlayıcı loop'u belirtir; SH2 contact ve SH3 contact; , SH2 ve SH3 domaini proteinlerini içeren temas bölgelerini belirtir; A-loop, aktivasyon loop'u belirtir; Yıldız, Hidrojen bağları veya Van der Waals etkileşimleri yoluyla doğrudan İmatinib bağlayan amino asit pozisyonlarını belirtir. K247R ve Y320C, tek nükleotid polimorfizmidir. Numaralandırma Abl la izoformuna göre yapılmıştır.) (Soverini ve ark., 2011).



Şekil 16: BCR/ABL KD mutasyonları (Bert ve Hunger, 2014).

KML hastalarında mevcut olan mutasyonlar dikkate alınarak yapılan TKİ seçimi, daha yararlı bir tedavi sağlayacaktır (Tablo 6 ve Tablo 7).

Tablo 6: TKİ tedavilerine karşı direnç ile karakterize olan ABL1 mutasyonları

EKZON 4	EKZON 6	EKZON 7	EKZON 8	EKZON 9
M244V	T315İ	L387M	Q459K	P486S
L248V	F317L	H396R		
G250E	M351T	S417Y		
Q252H/R	E355G			
E255K	F359V			
Y253F/H				

Tablo 7: BCR-ABL KD mutasyon durumuna göre en uygun alternatif terapötik seçeneklerin özeti (Soverini ve ark., 2011).

. T315İ
Hematopoietik kök hücre nakli veya araştırma kapsamındaki ilaçlar
. V299L, T315A ve F317L/V/I/C
Dasatinib'den ziyade Nilotinib düşünülebilir
. Y253H, E255K/V ve F359V/C/I
Nilotinib'den ziyade Dasatinib düşünülebilir
. BAŞKA HERHANGİ BİR MUTASYON
Dasatinib veya Nilotinib'den ziyade yüksek doz İmatinib düşünülebilir

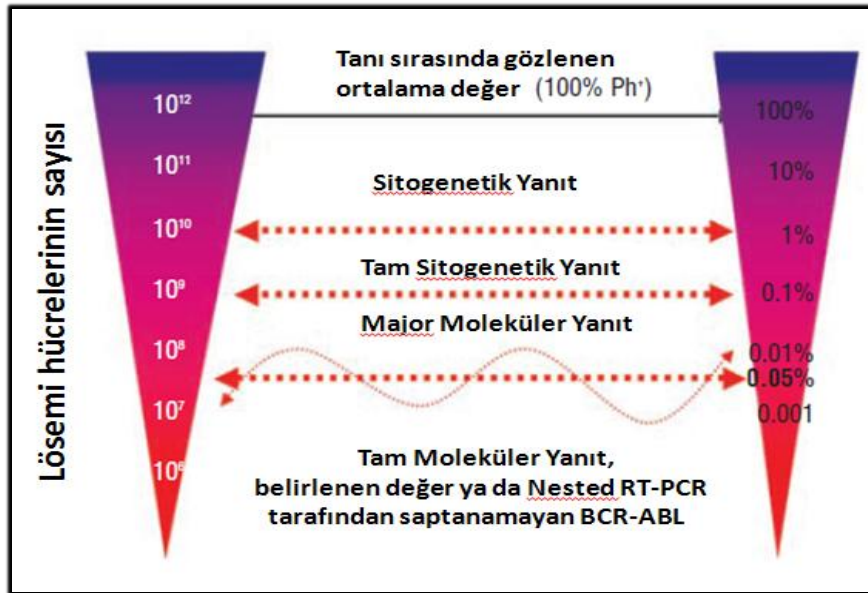
4. 10. KML'de Tedavi Takibi ve Tedaviye Yanıtın Monitörizasyonu

Kronik miyeloid lösemi tedavisine yanıt hematolojik, sitogenetik ve moleküler olarak değerlendirilir, bu değerlendirmelerin detayları Tablo 8'de belirtildiği gibidir (Baccarani ve ark., 2013; Baccarani ve ark., 2015). KML'de tedavi yanıtı izlenirken hematolojik ve sitogenetik değerlendirme, RT PCR ile moleküler takip ve moleküler

mutasyon analizi yapılır (Soysal ve Eşkazan, 2012). BCR-ABL1 füzyon gen ürünü seviyeleri ile KML hastalarındaki rezidüel lösemik hücre sayıları koroledir (Şekil 17) (Baccarani ve ark., 2008).

Tablo 8: KML tanısı ve monitörizasyonu (Kİ:Kemik İliği; PK:Periferik Kan) (<http://www.kmlhastaligi.org> Erişim tarihi 3 Kasım 20159).

TEST	HEDEF	MATERYAL	DUYARLILIK
SİTOGENETİK	Ph kromozomu	Kİ	%1-10
FISH	Bcr ve abl genlerinin kırık noktaları	PK/Kİ	%0.5-5
RT-PCR	Bcr/abl mRNA	PK/Kİ	%0.0001



Şekil 17: MRD testinin sonuçları ve sitogenetik yanıt ile rezidüel hücre sayısı arasındaki ilişki (Baccarani ve ark., 2008).

Hematolojik değerlendirme; hematolojik takip, fizik muayene, tam kan sayımı ve çevresel kan yaymasını kapsamaktadır. Tanı sonrasında tam hematolojik yanıt sağlanana kadar 15 günde bir, daha sonra en az 3 ayda bir veya gerek olduğunda yapılmalıdır (Soysal ve Eşkazan, 2012).

Majör sitogenetik yanıt, tam ve parsiyel sitogenetik yanıtı içerir (Ph + metafaz %0 - %35). Konvansiyonel sitogenetik incelemede en az 20 metafaz değerlendirilmelidir. Konvansiyonel sitogenetik inceleme; Ph dışındaki kromozom anomalilerini de saptar (Soysal ve Eşkazan, 2012).

Tablo 9: KML’de Tam hematolojik yanıt (CHR) ve Sitogenetik Yanıt (CyR) (Baccarani ve ark., 2013; Baccarani ve ark., 2015)

Tam hematolojik yanıt (CHR) · BCR-ABL1 transkriptinde 1-log azalma ($\leq$ %10) · Lökosit sayısı $< 10.000/\mu\text{L}$ · Periferik kanda bazofil $< \%$5 · Periferik kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi · Trombosit sayısı $< 450.000/\mu\text{L}$ · Splenomegali (-) · Akselere/blastik faz bulgusu (-) · Ekstramedüller tutulum (-)
Sitogenetik Yanıt (CyR) • Tam sitogenetik yanıt (CCyR): BCR-ABL1 transkriptinde 2-log azalma ($\leq$ %1) ve Ph + metafazın olmaması • Parsiyel sitogenetik yanıt (PCyR): Ph + metafaz %1- %35 • Minör sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %36 - %65 • Minimal sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %66 - %95 • Sitogenetik yanıtsızlık: $> \%$95 Ph + metafaz

RT-Q PCR, KML’de tedavi yanıtını takip etmede ve minimal rezidüel hastalık takibinde önemlidir. İmatinib cevabını değerlendirmede kullanılır. Ph kromozomu ve

p210, p190 ve p230 kimerik protein ürünlerini araştırmada kullanılır. RT-Q PCR ile moleküler takip, MMY elde edilmesi ve doğrulanmasına kadar 3 ayda bir, daha sonra en az 6 ayda bir yapılmalıdır (Soysal ve Eşkazan, 2012).

Tablo 10: KML’de Moleküler Yanıt (MR) (Baccarani ve ark., 2013; Baccarani ve ark., 2015).

• Majör moleküler yanıt (MMR): • BCR-ABL/ABL oranının uluslararası skalaya göre $\leq \%0.1$ olması, • BCR-ABL kimerik mRNA’da başlangıç değerinden 3 log veya daha fazla azalma olması. (örn: 25 $\rightarrow$ 0.025)
• Derin moleküler yanıt (MR4) • BCR-ABL1 transkriptinde 4-log azalma. • BCR-ABL/ABL oranının uluslararası skalaya göre $\leq \%0.01$ olması,
• (MR4.5 ve sonrası; MR5-7) • BCR-ABL1 transkriptinde 4.5-log azalma, • BCR-ABL/ABL oranının uluslararası skalaya göre $\leq \%0.0032$ olması.
• Tam moleküler yanıt (CMR): • RT- PCR veya nested PCR yöntemi kullanıldığında ardışık iki ölçüm ile BCR-ABL kimerik mRNA’sının saptanmaması. • Yani; BCR-ABL1 = 0 (10⁻⁴ duyarlılığında)

KML’de tedavi yönetimine ilişkin kılavuzlar ve öneriler çeşitli bilimsel dernekler tarafından hazırlanmıştır. European LeukemiaNet (ELN) uzmanlarından oluşan kurul 2006, 2009 ve 2013 yılında bilimsel hakemli-dergilerde önerilerini sunmuştur. En son 2013 yılında sunulan ELN önerileri; mevcut beş tirozin kinaz inhibitörünün kullanımı, sitogenetik ve moleküler yanıtın değerlendirilmesi ve tedavi stratejisi ile ilgilidir. Buna göre, üç TKİ (İmatinib, Nilotinib, Dasatinib) ilk basamak tedavi olarak tavsiye edilir. Bosutinib ve Ponatinib, ikinci basamak tedavi olarak önerilir. Ponatinib özellikle T315I mutasyonunun mevcudiyeti halinde tavsiye edilir.

Tedaviye optimal cevabın sağlanması; sağkalım ve aynı zamanda derin, istikrarlı, tedavi gerektirmeyen remisyon, BCR-ABL transkript seviyesinin tedavi başlangıcından 3 ay sonra $\leq \%10$ olmasını, 6 ay sonra $\leq \%1$, 1 yıl sonra $\leq \%0.1$ ve daha sonrasında $\leq \%0.01$ olmasını gerektirir. Moleküler monitörizasyon, her başarısızlık durumunda mutasyon analizini içermelidir. Akselere ve blastik fazda başarılı bir tedavi, TKİ'leri ve bir çok durumda da allojenik kök hücre naklini gerektirir (Baccarani ve ark., 2015).

Tablo 11: ELN tanımına göre birinci basamak TKİ'lere yanıt ve 2. Basamak TKİ'lere intolerans halinde yanıt (Baccarani ve ark., 2015).

ZAMAN	OPTİMAL YANIT	UYARI	BAŞARISIZLIK
Başlangıç		Klonal kromozom anomalisi/ Ph+, major route	
3 ay	BCR/ABL1 $\leq \%10$ ve/veya Ph + $\leq \%35$	BCR-ABL1 $>\%10$ ve/veya Ph+ $\%36-95$	CHR yok ve/veya Ph+ $> \%95$
6 ay	BCR-ABL1 $\leq \%1$ ve/veya Ph + 0 (CCyR)	BCR-ABL1 $\%1-10$ ve/veya Ph + $\%1-35$ (PCyR)	BCR-ABL1 $> \%10$ ve/veya Ph+ $>\%35$
12 ay	BCR-ABL1 $\leq \%0.1$ (MMR)	BCR-ABL1 $\%0.1-1$	BCR-ABL1 $>\%1$ ve/veya Ph + $\geq \%1$
Daha sonra ve herhangi bir zaman	MMR veya daha iyisi	CCA (Klonal kromozom anomalisi)/Ph- (-7 ya da 7q-)	CHR kaybı, CCyR kaybı, onaylanmış MMR kaybı, mutasyonlar, CCA/Ph+

ELN tanımlarına göre KML tedavisinde hastalara uygulanabilen 1. Ve 2. Nesil TKİ tedavisi ve transplantasyon ile ilgili öneriler Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tedavi Önerisi yaparken TKİ seçiminde ilacın tolere edilebilirliğine, güvenliğine ve hastanın yaşına, eşlik eden hastalıklara dikkat edilir (<http://www.leukemia-net.org>; erişim tarihi 29 Ekim 2015).

Tablo 12: Sitogenetik ve moleküler monitörizasyonun zamanlaması (CBA: ilik hücre metafazının kromozom bantlama analizi, en az 20 metafaz analiz edilmeli.) (<http://www.leukemia-net.org>; erişim tarihi 29 Ekim 2015)

Tanı sırasında	Ph- ise; CBA, FISH (gizli veya varyant translokasyonlar için), kalitatif PCR (transkript türü)
Tedavi sırasında	MMR elde edilene dek her 3 ayda bir RQ-PCR, daha sonra her 3-6 ayda ve/veya CCyR elde edilene dek 3, 6 ve 12 ayda bir CBA, daha sonrasında her 12 ayda bir. CCyR bir kez elde edilince, FISH uygulanabilir.
Başarısızlık, hastalığın ilerlemesi	RQ-PCR, Mutasyon analizi ve CBA. Blast fazda immünofenotipleme.
Uyarı	Moleküler ve sitogenetik testler daha sık. CBA ise, myelodisplazi ya da CCA/Ph- durumlarında.

Dasatinib ve Nilotinib ile ikinci basamak tedavi sonuçlarına geçici ve ağırlıklı olarak uygulanabilecek ELN tanımlamaları Tablo 13’de belirtilmiştir. Buna göre optimal yanıt, en iyi uzun vadeli sonucu ve tedavi değişimi için herhangi bir belirti olmamasını ifade eder. Başarısızlık, ölüm riskini ve hastalığın ilerlemesini sınırlamak için hastaya başka bir tedavi uygulanması gerektiğini ifade eder. Uyarı, tedavi başarısız ise, tedavide doğru zamanda değişiklik yapmak için hastalığın özelliklerinin ve tedavi yanıtının daha sık monitörize edilmesi gerektiğini ifade eder (Baccarani ve ark., 2015).

Tablo 13: İmatinib tedavisi başarısızlığı durumunda 2. Nesil tedavi için yanıt tanımlamaları (geçici olarak kullanılabilir, 3.nesil tedavi yanıtı için geçerli değildir.) (http://www.leukemia-net.org; erişim tarihi 29 Ekim 2015)

ZAMAN	OPTİMAL YANIT	UYARILAR	BAŞARISIZLIK
Başlangıç		CHR elde edilememesi, İmatinib kullanımında CHR kaybı, 1.Nesil TKİ kullanımında CyR eksikliği, yüksek risk	
3 ay	$BCR-ABL \leq \%10$ ve/veya $Ph + < \%65$	$BCR-ABL > \%10$ ve/veya $Ph + \%65-95$	CHR elde edilememesi ya da $Ph+ > \%95$ ya da yeni mutasyonlar
6 ay	$BCR-ABL \leq \%10$ ve/veya $Ph + \leq \%35$ (PCyR)	$BCR-ABL \leq \%10$ ve/veya $Ph+ \%35-65$	$BCR-ABL > \%10$ ve/veya $Ph+ > \%65$ ve/veya yeni mutasyonlar
12 ay	$BCR-ABL \leq \%1$ ve/veya $Ph + 0$ (CCyR)	$BCR-ABL \%1-10$ ve/veya $Ph + \%1-35$ (PCyR)	$BCR-ABL > \%10$ ve/veya $Ph+ > \%35$ ve/veya yeni mutasyonlar
Daha sonra, Ve herhangi bir zaman	MMR veya daha iyisi	CCA (Klonal kromozom anomalisi)/ $Ph- (-7$ ya da $7q-)$ ya da $BCR-ABL > \%0.1$	CHR kaybı, CCyR ya da PCyR kaybı, yeni mutasyonlar, MMR kaybı, CCA/ $Ph+$

Moleküler mutasyon analizi, suboptimal yanıt, yanıtsızlık veya yanıt kaybı durumunda ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri veya baska tedavilere geçmeden önce daima bakılmalıdır. Akselere ve blastik evrede başvuran hastalarda mutasyon analizi çalışılması önerilir (Soysal ve Eşkazan, 2012). Mutasyon analizi ile ilgili detaylar Tablo 14’de belirtilmiştir.

Tablo 14 : BCR-ABL KD mutasyon analizi öneri özeti (Soverini ve ark., 2011).

. TANIDA
Sadece AP / BC hastalarında
. BİRİNCİ BASAMAK İMATİNİB TEDAVİSİ SIRASINDA
Başarısızlık durumunda
MMR kaybına yol açan BCR-ABL transkript seviyelerinde bir artış durumunda
Suboptimal yanıtı sebep veren diğer durumlarda
. İKİNCİ BASAMAK DASATİNİB VEYA NİLOTİNİB TEDAVİSİ SIRASINDA
Hematolojik veya sitogenetik başarısızlık durumunda

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5. 1. Kullanılan Aletler

Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)

Isı Bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)

Soğutmalı Santrifüj IEC, MP4R (A.B.D.)

Isı döngü cihazı (Biomtra, ABD)

Manyetik Karıştırıcı, Elektro-Mag (Türkiye)

Hassas Terazı, Mettler AT261 (İsviçre)

Hassas Terazı, Mettler PJ6000 (İsviçre)

Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (A.B.D.)

Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)

Etüv, Heraeus (Almanya)

Laminar Flow, Özge A.Ş (Türkiye)

Otoklav, All American (A.B.D)

Spektrofotometre, Unicam 8625 (İngiltere)

Kırık Buz Makinası, Scotsman (A.B.D.)

Buz Dolabı, Arçelik (Türkiye)

Derin Dondurucu -20oC, Philco (Türkiye)

Derin Dondurucu -80oC, Thermo 702 (A.B.D.)

Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)

Biyolojik Güvenlik Kabini (A.B.D)

5.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Eppendorf Tüp 1.5 mL, Axygen (A.B.D.)

Eppendorf Tüp 2.0 mL, Axygen (A.B.D.)

Falkon Tüp 15 mL, TPP (İsviçre)

Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

Filtreli Mikropipet Uçları (Mavi, Sarı, Beyaz), Axygen (A.B.D.)

PerfectPure Kandan RNA İzolasyon Kiti, 5 PRIME (A.B.D.)

Bio-Speedy İlk Zincir cDNA Sentez Kiti, Bioeksen (Türkiye)

Bio-Speedy One DNA Polimeraz Kiti, Bioeksen (Türkiye)

5.3. Kullanılan Kimyasallar

DNA Ladder, GeneOn

BCR/ABL Dış Primerler-Nested PCR-1.Step, 10 pmol/ul

BCR/ABL - F: 5'-ACAGCATTCGCTGACCATCAATAA-3',

BCR/ABL - R: 5'-ATGGTCCAGAGGATCGCTCTCT-3

BCR/ABL İç Primerler-Nested PCR-2.Step, 10 pmol/ul

ABL - 1F : 5' -TGGTTCATCATCATTCAACGGTGG- 3',

ABL - 1R: 5'- TCTGAGTGGCCATGTACAGCAGC -3',

ABL - 2F: 5'-TCATGACCTACGGGAACCTC- 3',

ABL - 2R: 5'-ATACTCCAAATGCCCAGACG -3'

5.4. Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler;

10X TBE (Tris Buffered EDTA) Hazırlanışı;

108 g Tris baz

55 g Borik asit (pH 8,0)

7.44 g EDTA (40 ml, 0.4 M EDTA)

1X TBE Hazırlanışı;

10 X TBE'den 100 ml + 900 ml distile su

5.5. Kullanılan Materyaller

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bölümü'ne KML tanı ve tedavi takibi için başvuran ve İmatinib tedavisi gören hastalar ile Nilotinib ve Dasatinib tedavisi gören İmatinib dirençli hastalardan rutin olarak (3, 6, 12 ayda bir) alınan kan örneklerinin bir kısmı kullanılarak, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Nested PCR ile DNA Dizi Analizi gerçekleştirilmiştir.

5. 6. RNA İzolasyonu

Kan örneklerinden PerfectPure Kandan RNA İzolasyon Kiti, 5 PRIME (A.B.D.) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Başlamadan önce

Tüm numuneler için lizis çözeltisine TCEP (2 ul TCEP, her 200 ul Lizis çözeltisi için) eklendi. DNaz çözeltisi hazırlandı. Santrifüj de dahil olmak üzere tüm basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

RBC parçalama

- 1) 50 ml'lik bir tüp içinde 3 birim RBC Lizis Çözeltisi ile 1 birim numune karıştırıldı.
- 2) Karışım, ters çevirildi ve 10 dakika i oda sıcaklığında inkübe edildi, inkübasyon sırasında en az bir kez ters çevrildi.
- 3) 2 dakika boyunca 2000 x g'de santrifüj edildi, beyaz kan hücrelerini pellet haline getirmek için.

- 4) Süpernatantı döküldü ve 1 dakika boyunca temiz, emici kağıt üzerine tüp tersine çevrilip bekletildi.
- 5) 1 dakika sonra, mümkün olduğu kadar kalan RBC lisatı giderildi, emici kağıt üzerine tüp 5 kez vuruldu, WBC pelleti bozmadan.

WBC lizis

- 1) Hücre pelleti 20 s vortekslendi.
- 2) Örnekler lizis Çözeltisi / TCEP eklendi.
- 3) Tüpler 2 dakika yüksek hızda örnekleri homojen hale getirmek ve hücreleri lize etmek için vortekslendi.

Ön temizleme TM kolonu

1. lizat yukarı ve aşağı yavaşça 20 kere pipetlendi
2. tüm lizat bir Ön temizleme TM kolonu üzerine pipetlendi.
3. 1 dakika süre ile 400 x g'de santrifüjlendi.
4. Lizat yavaşça pipetlendi.

RNA bağlanması ve 1. Yıkama

- 1) Bir saflaştırma kolonu üzerindeki Açık bir tüpe tüm lizat pipetlendi.
- 2) 1 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.
- 3) Saflaştırma kolonu yeni bir tüpe aktarıldı.
- 4) Saflaştırma kolonuna 400 ul Yıkama 1 Çözeltisi eklendi.
- 5) 2 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.
- 6) tüpleri 180 derece döndürüldü ve 1 dakika süreyle 13,000-16,000 x g'de santrifüj edildi.

DNaz muamelesi

- 1) Saflaştırma kolonu yeni bir tüpe aktarıldı.
- 2) Kolona 50 ul DNaz Çözeltisi eklendi.
- 3) Oda sıcaklığında inkübe edildi.

- 4) Kolona 200 ul DNaz Yıkama çözeltisi eklendi.
- 5) 1 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.
- 6) Kolona 200 ul DNaz Yıkama Çözeltisi eklendi.
- 7) 2 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.

2. Yıkama

- 1) yeni bir tüpe saflaştırma kolonu aktarıldı.
- 2) saflaştırma kolonuna 200 ul 2. Yıkama Çözeltisi eklendi.
- 3) 1 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.
- 4) Saflaştırma kolonuna ek 200 ul 2. Yıkama Çözeltisi eklendi.
- 5) 2 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.

RNA Elüsyonu

- 1) Saflaştırma kolonu dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı.
- 2) Saflaştırma kolonuna 50 ul Elüsyon Çözeltisi eklendi.
- 3) 1 dakika boyunca 13,000-16,000 x g'de santrifüjlendi.
- 4) Saflaştırma kolonu atıldı.
- 5) Saflaştırılmış RNA ihtiva eden tüp buz üzerine kondu.
- 6) RNA -70°C -80°C de saklandı.

5.7. cDNA Sentezi

Bio-Speedy İlk Zincir cDNA Sentez Kiti, Bioeksen (Türkiye) kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

- 1) 10 ul RNA ve 2 ul oligo dT primeri bir toplama tüpü içinde birleştirilerek Karışım 1 elde edildi. Karışım 1, 10 dk 70 °C'de inkübe edildi.
- 2) Karışım 1, 5 dk buzda inkübe edildi.

- 3) Temiz bir PCR tüpüne 4 µl reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı, 1 µl ters transkriptaz ve 6 µl RNaz içermeyen su eklenerek Karışım 2 oluşturuldu.
- 4) Karışım 1 ve Karışım 2 bir tüpte birleştirilerek Karışım 3 oluşturuldu.
Karışım 3, yavaşça karıştırıldı.
- 5) Karışım 3, 37 °C’de 115 dk inkübe edildi.
- 6) Karışım 3, 95 °C’de 5 dk inkübe edildi.
- 7) Elde edilen cDNA karışımı -20 °C’de saklandı.

5. 8. Nested PCR

Bio-Speedy One DNA Polimeraz Kiti, Bioeksen (Türkiye) kullanılarak, 2 aşamada Nested PCR gerçekleştirildi. 1. Aşamada kullanılan dış primerler;

BCR/ABL - Forward: 5’-ACAGCATTCCGCTGACCATCAATAA-3’

BCR/ABL -Reverse: 5’-ATGGTCCAGAGGATCGCTCTCT-3

ile ABL geninde yaklaşık 1650 bp büyüklüğünde bir bölge amplifiye edildi.

Primerlerin sulandırılması:

- Ana stoklar 100 pmol/ µl olarak hazırlandı.
- Ara stoklar 10 pmol/ µl ve toplam hacim 100 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR yapılırken 10uM (20 µl hacimde) olan ara stok primerler kullanıldı.

Tablo 15: Birinci step Nested PCR karışımı

DNA Polimeraz tamponu	10 µl
Moleküler su	7.8 µl
DNA Polimeraz Enzimi	0.2 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
cDNA	1 µl
TOTAL	20µl

Birinci step Nested PCR, Touch-down PCR koşulları altında tasarlandı.

Tablo 16 : 1. Step Nested PCR Programı

Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	2 dakika	14 DÖNGÜ
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	
Bağlanma	67 °C → 60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	3 dakika	
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	23 DÖNGÜ
Bağlanma	60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	3 dakika	
Son uzama	72 °C	5 dakika	

Birinci step Nested PCR ile elde edilen PCR ürünleri 1/10 oranında dilüe edilerek 2. aşama Nested PCR’da kalıp olarak kullanıldı.

1.Step Nested PCR ürünlerinin 1/10 oranında dilüsyonu;

2 µl PCR ürünü + 18 µl ampül su (Toplam hacim 20 µl)

2. Aşama Nested PCR

2 çift iç primer kullanılarak gerçekleştirildi. 1. İç primer çifti ABL geninde 447 bp büyüklüğünde bir bölge amplifiye edildi;

ABL – 1-Forward : 5’ –TGGTTCATCATCATTCAACGGTGG- 3’,

ABL – 1-Reverse: 5’ - TCTGAGTGGCCATGTACAGCAGC -3’.

2. iç primer çifti ile, ABL geninde 333 bp büyüklüğünde bir bölge amplifiye edildi;
 ABL – 2-Forward: 5'-TCATGACCTACGGGAACCTC- 3',
 ABL – 2-Reverse: 5'-ATACTCCAAATGCCCAGACG -3'

Tablo 17: 2. step Nested PCR Karışımı (2 primer çifti için de aynı protokol uygulandı.)

DNA Polimeraz tamponu	10 µl
Moleküler su	6.8 µl
DNA Polimeraz Enzimi	0.2 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
1.step Nested PCR ürünü (1/10 dilüe)	2 µl
TOTAL	20µl

Tablo 18 : İkinci basamak Nested PCR Programı

Başlangıç Denatürasyonu	98 °C	30 saniye	40 DÖNGÜ
Denatürasyon	98 °C	10 saniye	
Bağlanma	60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	40 saniye	
Son uzama	72 C	5 dakika	

Nested PCR'ın ardından %2'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforez yapıldı.

%2'lik Agaroz Jelin Hazırlanışı;

1.6 gram Agar ve 80 ml TBE, bir erlenmayerde karıştırılıp 15 dakika kaynatıldı. Kaynatıldıktan 1 dakika sonra 4 µl Etidyum Bromür eklendi. 1 dakika soğuması beklendikten sonra jel tabağına döküldü ve jelin katılaşması beklendi.

Jele yüklenen ve PCR ürünlerinin elektroforezi yapıldı. Elektroforez; 240 mA, 100 V, 20 dk koşulları altında gerçekleştirildi.

PCR sonuçları UV görüntüleyici ile görüntülendi.

5. 9. DNA Dizi Analizi

Çalışmada Nested PCR ile amplifiye edilen BCR-ABL gen bölgesindeki mutasyonları ve genetiksel değişimleri saptamak amacıyla dizi analizi işlemi, hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

6. 1. Klinik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 45 KML hastası, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bölümü'nde tanısı, tedavisi ve takibi yapılan Ph+ hastalardır. Hastaların yaş ortalaması 46.6'dır (25-87). Hastaların 18'i kadın, 27'si erkektir. Hastalar KML tanısından itibaren (en az 1 yıl, en çok 14 yıl) tirozin kinaz inhibitörü tedavisi almıştır. Hastaların 32'si 1. Nesil TKİ olan İmatinib tedavisine yanıt kaybı gösteren, İmatinib tedavisine dirençli olan ve bu sebeple 2. Nesil TKİ olan Dasatinib veya Nilotinib tedavisi gören hastalardır. Hastaların 13'ü ise tedaviye yanıt gösterdiği için halen İmatinib tedavisi almaktadır. Hastaların 43'ü kronik fazda, 1'i akselere fazda ve 1'i AML'ye transforme olmuştur.

Hastalarda KML tanısından itibaren İmatinib ile, 3 hastada ise Hydrea ile tedaviye başlanmıştır. Tam hematolojik yanıt, tam sitogenetik yanıt ve majör moleküler yanıt takibi sonucunda, İmatinib tedavisine yanıt vermeyen hastalarda 2. Nesil TKİ olan Nilotinib ve Dasatinib'e geçilmiştir. Tedavi yanıtı sağlanan diğer hastalarda İmatinib ile tedaviye devam edilmiştir. Total tedavi süreci incelendiğinde; 7 hastada İmatinib'den Nilotinib' geçiş yapılmıştır. 9 hastada İmatinib'den Dasatinib'e geçiş yapılmıştır. 5 hastada tedavi sürecinde Nilotinib'den Dasatinib'e geçiş yapılmıştır; 1 hastada Dasatinib'den Nilotinib'e geçiş yapılmıştır. 1 hastada da Nilotinib'den Bosutinib'e geçiş yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalar sağ kalım açısından incelendiğinde, hastaların tamamının hayatta olduğu belirlenmiştir. (%100)

Hastalar ile ilgili diğer klinik veriler Tablo 19'da ve Tablo 20'de belirtilmektedir (Tablolarda ilgili kısımlarda boş olan bölmeler, hastaların ilgili klinik verilerine ulaşamadığını göstermektedir.)

Tablo 19 : KML hastalarının klinik verileri

HASTA KODU	yaş,cinsiyet	WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PLT($\times 10^3/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	SOKAL RİSKİ	SAĞKALIM
18	45,E	9900	195000	14.9G/dL	düşük	SAĞ
5	55,E	5600	137000	14.4		SAĞ
1	53,E	4500	84000	13.6	düşük	SAĞ
3	38,E	44.9	791000	14.4		SAĞ
42	35,K	5700	306000	13.6	düşük	SAĞ
17	38,K	4000	125000	10.9	düşük	SAĞ
7	27,E	5500	245000	12.9		SAĞ
36	38,K	.5100	142000	10.1	düşük	SAĞ
4	49,K	7000	269000	11.7	orta	SAĞ
14	48,K	6500	261000	12.2	yüksek	SAĞ
45	32,E	5523	269000	9.9	orta	SAĞ
26	86,K	4600	222000	10.6	orta	SAĞ
10	31,E	.9900	620000	7.4	orta	SAĞ
11	55,K	.8400	226000	13.7	düşük	SAĞ
9	44,K	7800	333000	9.2		SAĞ
21	56,K	110000	313000	9	orta	SAĞ
19	54,K	8400	290000	13.41	düşük	SAĞ
20	58,K	4200	115000	12.9	düşük	SAĞ
16	47,E	9400	379000	10.6	orta	SAĞ
28	63, E	4900	184000	12.6		SAĞ
22	46,E	5100	171000	14.3		SAĞ
44	27,K	5600	238000	10,6	düşük	SAĞ
29	66,E	12300	390000	11.6	düşük	SAĞ
2	39,E	3800	113000	14		SAĞ
39	34,E				düşük	SAĞ
6	60,K	4300	214000	12.4	düşük	SAĞ
34	50,E	8900	328000	12.1	düşük	SAĞ
30	56,E	8300	232000	11.2		SAĞ
43	60,E	12300	276000	14.8	orta	SAĞ
32	25,E	5800	164000	14.8		SAĞ
27	32,E	4900	186000	15.1		SAĞ
23	61,E	8300	209000	13.8	düşük	SAĞ
38	87,E	5000	840000	10.5	orta	SAĞ
15					düşük	SAĞ
24					düşük	SAĞ
40					yüksek	SAĞ

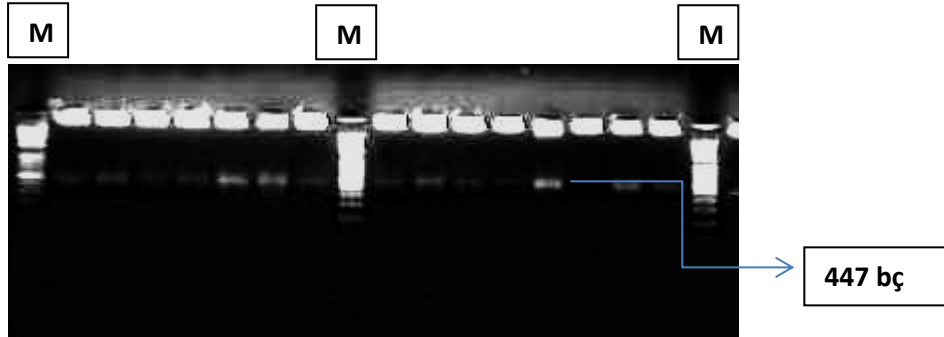
Tablo 20: KML hastalarının mutayonla ilişkili diğer klinik veriler

KOD	HASTALIK FAZI	KULLANILAN İLAÇ	MUTASYON	a.a. DEĞİŞİMİ	IS DEĞERİ	EN SON IS%
1	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,1 YIL,200mgX1	-	-	76%	. %41,339
2	KRONİK FAZ	DASATİNİB,1 YIL	-	-	%3.32	. % 1,302
3	KRONİK FAZ	İMATİNİB	D241G (HETEROZİGOT)	GAC-->GGC (A>G)	%42.9	. %36,85
4	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400mg,4 YIL	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	%0.151	. % 0,020
5	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,4 YIL,	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	%4.43	. % 14,41
6	KRONİK FAZ	DASATİNİB, 1YIL	-	-	%2.76	. %1.025
7	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400mg	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	%0.81	. % 0,011
8	KRONİK FAZ		-	-	%18.4	. %18.455
9	KRONİK FAZ	DASATİNİB, 1YIL	D241G (HETEROZİGOT)	GAC-->GGC (A>G)	%8.35	. %2,274
10	AML TRANSFORME	DASATİNİB, 1YIL	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	%38.4	. %12,99
11	KRONİK FAZ	DASATİNİB, 1YIL	-	-	%5.4	. %1,287
12	KRONİK FAZ		-	-	%0.05	-
13	KRONİK FAZ		-	-	% 0,04395	. %0,04
14	KRONİK FAZ	DASATİNİB,2 YIL,50 mgX2	C369C (HETEROZİGOT)	TGC--> TGT (C>T)	%0.0013	. negatif
15	KRONİK FAZ		C369C (HETEROZİGOT)	TGC--> TGT (C>T)	%0.11	. negatif
16	KRONİK FAZ	DASATİNİB, 1X100 mg,4 YIL	-	-	%0.012	. negatif
17	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,4 YIL,50mgX2	-	-	%0.001	. negatif
18	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,2 YIL,50mgX2	-	-	%1.43	. %2,494
19	KRONİK FAZ	DASATİNİB, 1X100mg, 3 YIL	-	-	%0.01	.negatif
20	KRONİK FAZ	DASATİNİB,4 YIL	-	-	% 0.0001	. negatif
21	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,2 YIL,50mgX2	-	-	%1.2	-
22	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400mg,3 YIL	-	-	%0.15	. neagtif
23	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB, 1YIL	-	-	%0.104	. %0,0523
24	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400 mg	A380T (HETEROZİGOT)	GCT-->ACT (G>A)	%0.15	. %0,0184
25	KRONİK FAZ		-	-	%0.112	. %0,044
26	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400mg	-	-	%0.447	. >%65
27	KRONİK FAZ	İMATİNİB, 400mg	-	-	%0.1572	. %0,0802
28	KRONİK FAZ	İMATİNİB, 400 mg	K285N (HOMOZİGOT)	AAA-->AAT (A>T)	%0.362	. % 0,054
29	KRONİK FAZ	İMATİNİB, 1 YIL	-	-	%19.17	. negatif
30	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400 mg	-	-	12%	. %12.113
31	KRONİK FAZ		-	-	>%65	. >%65
32	KRONİK FAZ	İMATİNİB 400 mg	-	-	15%	. % 15,819
33	KRONİK FAZ		-	-	%20.907	. %20.907
34	KRONİK FAZ	İMATİNİB 400 mg	-	-	14%	. % 14,577
35	KRONİK FAZ		-	-	%35,087	. %18,697
36	KRONİK FAZ	DASATİNİB,6 YIL,50 mgX2	-	-	>%65	. >%65
37	KRONİK FAZ		-	-	% 2,318	. % 2,318
38	KRONİK FAZ	İMATİNİB, 400 mg	-	-	% 3.27	. %0,197
39	KRONİK FAZ	NİLOTİNİB,1 YIL	-	-	%0.43	. %0,068
40	KRONİK FAZ		A366V (HETEROZİGOT)	GCC-->GTC (C>T)	%3.14	. %0,1329
41	KRONİK FAZ		-	-	%0,078	. %0,078
42	KRONİK FAZ	DASATİNİB,100mgX2	-	-	% 0,02262	. %0,0169
43	KRONİK FAZ	İMATİNİB 400 mg	-	-	%0.2	. %0,163
44	KRONİK FAZ	İMATİNİB,400 mg	-	-	. % 0,47	. %0,0334
45	AKSELERE FAZ	NİLOTİNİB,2 YIL,50mgX2	-	-	>%65	. %24,344

6. 2. Nested PCR Bulguları

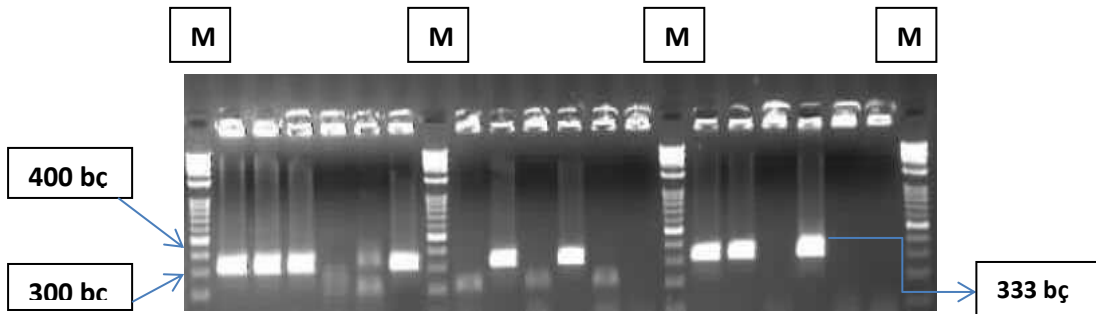
Çalışmada 40 hasta için ABL geninin 4-6 ekzonları ve 6-8 ekzonları amplifiye edilmiştir. 5 hasta için yalnızca ABL geni 6-8 ekzonları amplifiye edilmiştir; 4-6 ekzonlarının amplifikasyonunda sonuç elde edilememiştir.

2 aşamada gerçekleştirilen Nested PCR için hasta örneklerinin 2. Aşama PCR sonuçlarına dair agaroz jel görüntülemesi yapılmıştır. 2. Aşama Nested PCR'ın 1. Primer çifti ile ABL geninin 4-6 ekzonları (206-346 kodonları arası) hedeflenmiştir ve bu bölge için 447 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 18: ABL geninde 2. Aşama Nested PCR'ın 1. Primer çifti ile 447 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu.

2. Primer çifti ile ABL geninin 6-8 ekzonları (293-428 kodonları arası) hedeflenmiştir ve bu bölge için 333 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 19: ABL geninde 2. Aşama Nested PCR'ın 2. Primer çifti ile 333 bp büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu.

6. 3. Dizi Analizi Bulguları

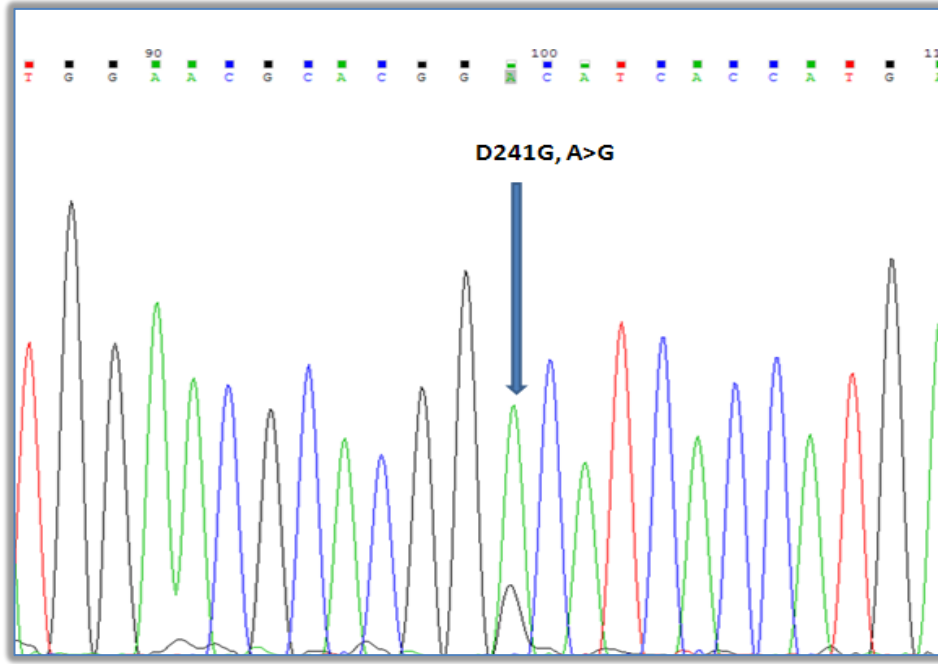
Çalışmaya dahil edilen 45 hastanın 11'inde mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar; 4 hastada E255K, 2 hastada D241G, 1 hastada K285N, 1 hastada A380T ve 1 hastada A366V mutasyonlarıdır.

Genel mutasyon frekansı % 24.44'tür. E255K mutasyonu frekansı %8.8'dir. D241G ve C369C mutasyonlarının frekansı % 4.4'tür. K285N, A380T ve A366V mutasyonlarının frekansı % 2.2'dir.

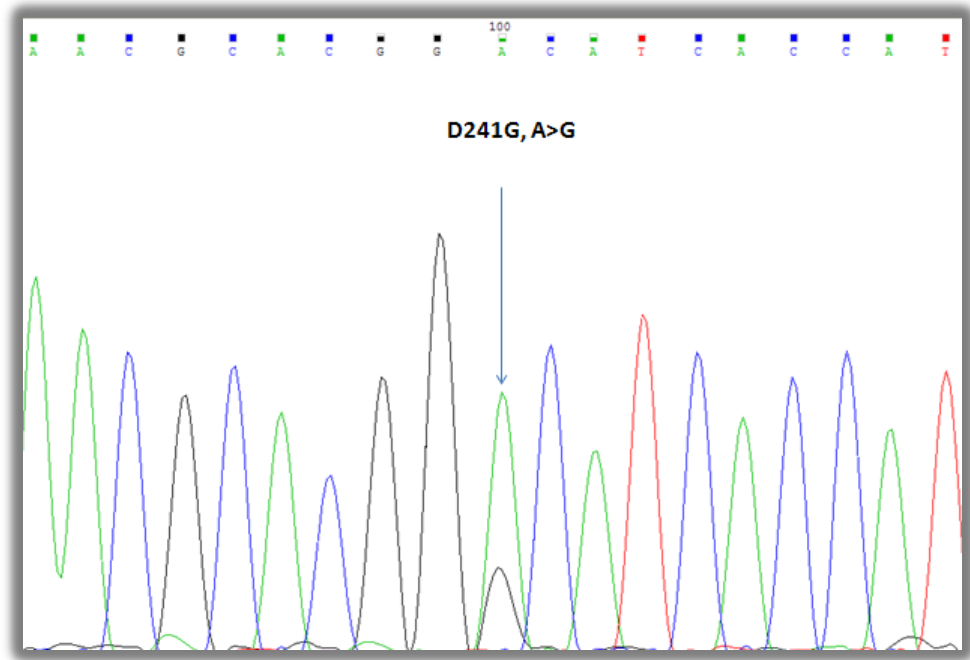
Tablo 21: Tespit edilen mutasyonlar ve özellikleri

KOD	MUTASYON	BAZ DEĞİŞİMİ	EKZON	Bcr/Abl tip	IS DEĞERİ
3	D241G (HETEROZİGOT)	GAC-->GGC (A>G)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%42.9
4	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%0.151
5	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%4.43
7	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%0.81
9	D241G (HETEROZİGOT)	GAC-->GGC (A>G)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%8.35
10	E255K (HOMOZİGOT)	GAG-->AAG (G>A)	EKZON 4 (P-loop)	p210	%38.4
28	K285N (HOMOZİGOT)	AAA-->AAT (A>T)	EKZON 5 (İMB.B.)	p210	%0.362
14	C369C (HETEROZİGOT)	TGC-->TGT (C>T)	EKZON 7 (C-loop)	p210	%0.0013
24	A380T (HETEROZİGOT)	GCT-->ACT (G>A)	EKZON 7 (A-loop)*	p210	%0.15
15	C369C (HETEROZİGOT)	TGC-->TGT (C>T)	EKZON 7 (C-loop)	p210	%0.02
40	A366V (HETEROZİGOT)	GCC-->GTC (C>T)	EKZON 7 (C-loop)	p210	%0.003

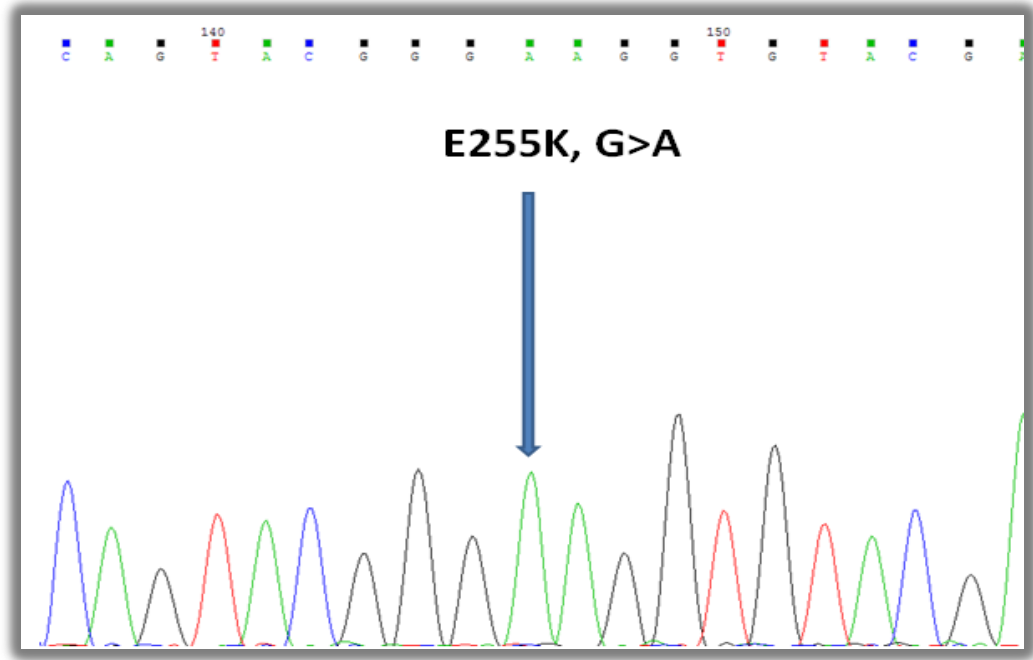
(İMB.B.; İmatinib Bağlanma Bölgesi, Yıldız (*) ile işaretlenmiş bölge İmatinib bağlanma bölgesini temsil etmektedir. IS değeri; mutasyon tespit edildiği zaman BCR/ABL transkript seviyesini belirtmektedir.)



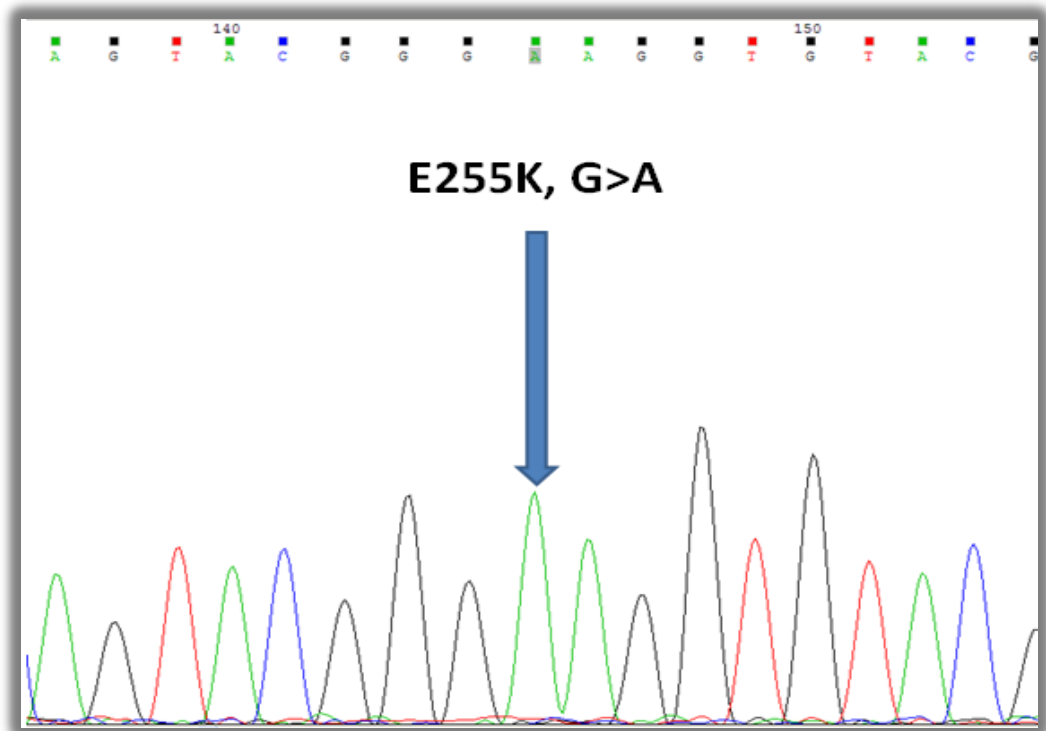
Şekil 20: 3 nolu hastada A>G dönüşümü ile D241G mutasyonu.



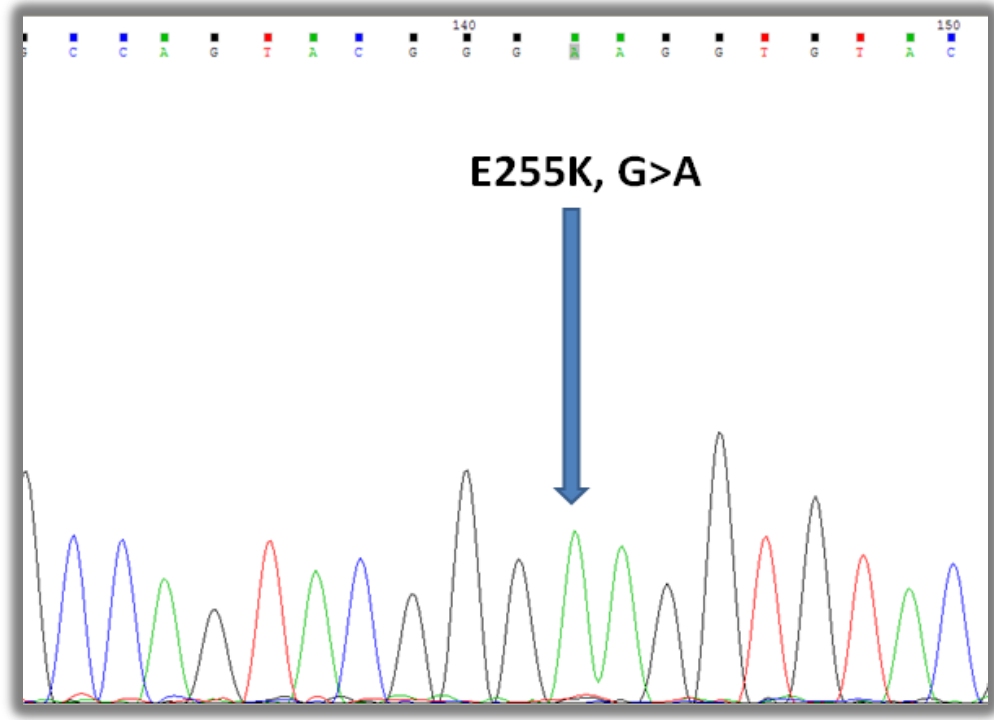
Şekil 21: 9 nolu hastada A>G dönüşümü ile heterozigot D241G mutasyonu



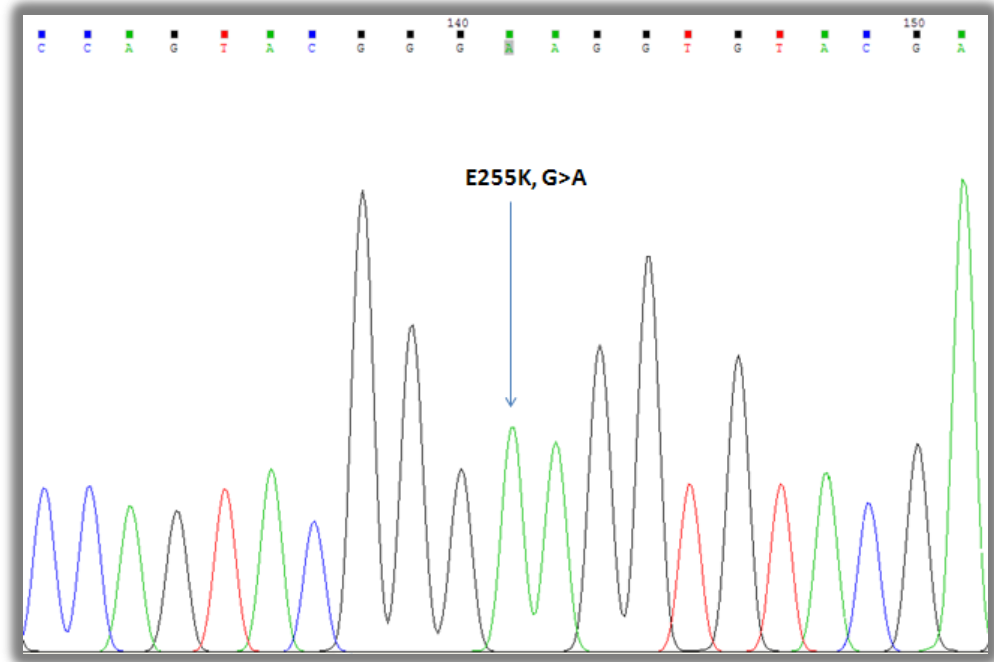
Şekil 22: 4 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu



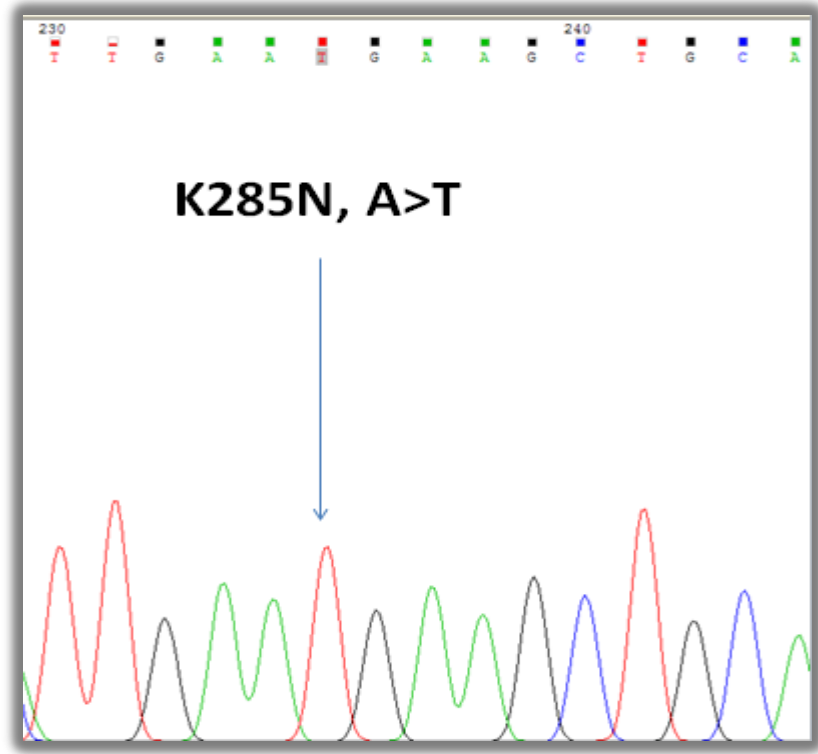
Şekil 23: 5 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu



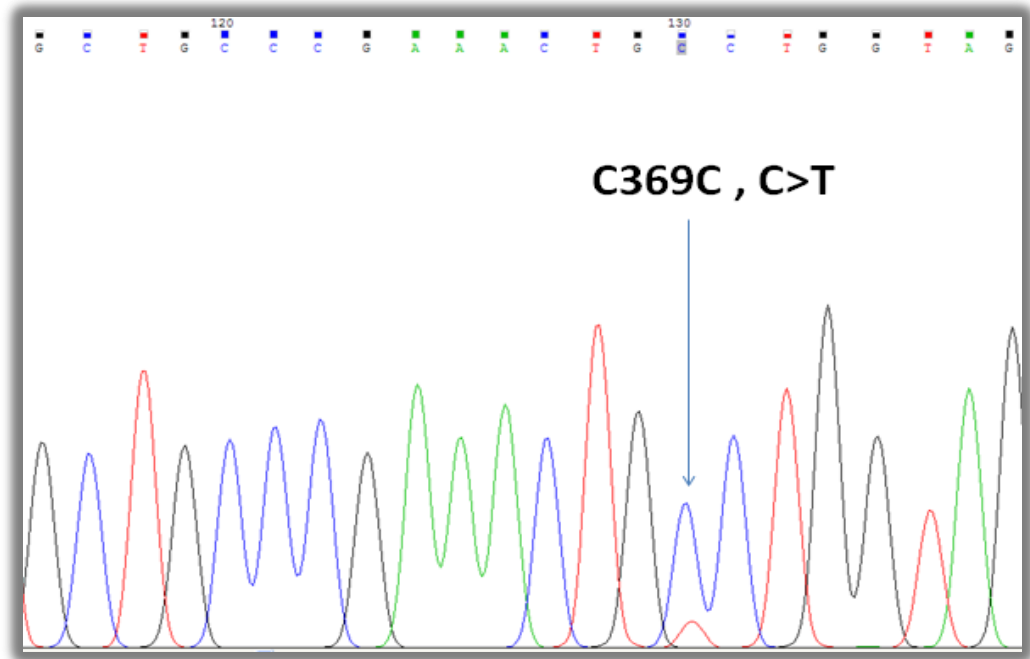
Şekil 24: 7 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu



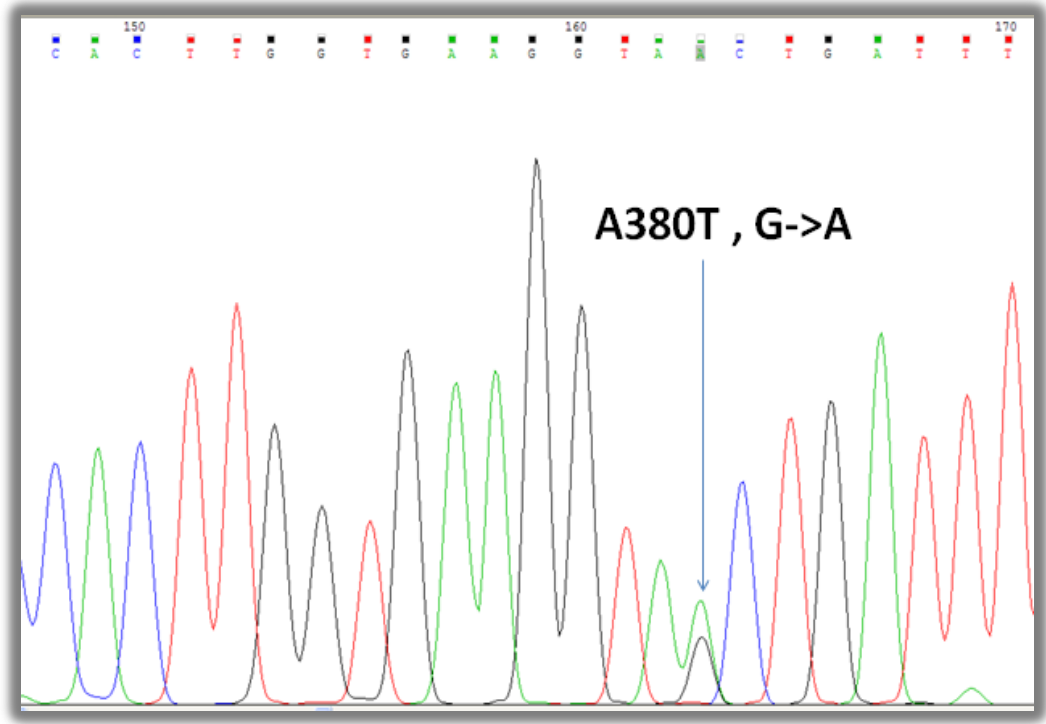
Şekil 25: 10 nolu hastada G>A dönüşümü ile homozigot E255K mutasyonu



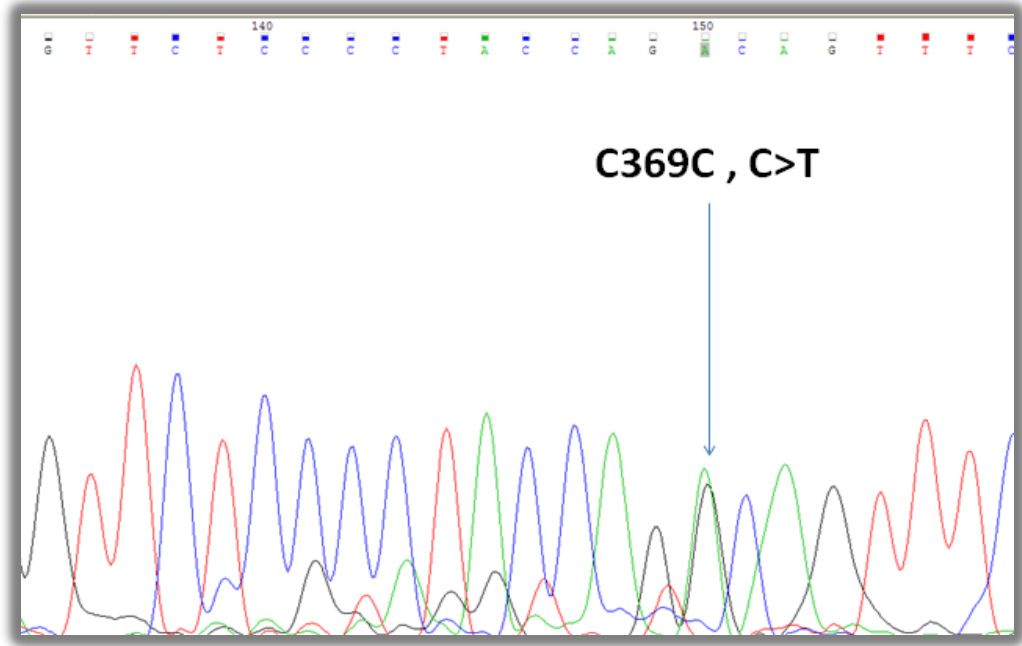
Şekil 26: 28 nolu hastada A>T dönüşümü ile homozigot K285N mutasyonu



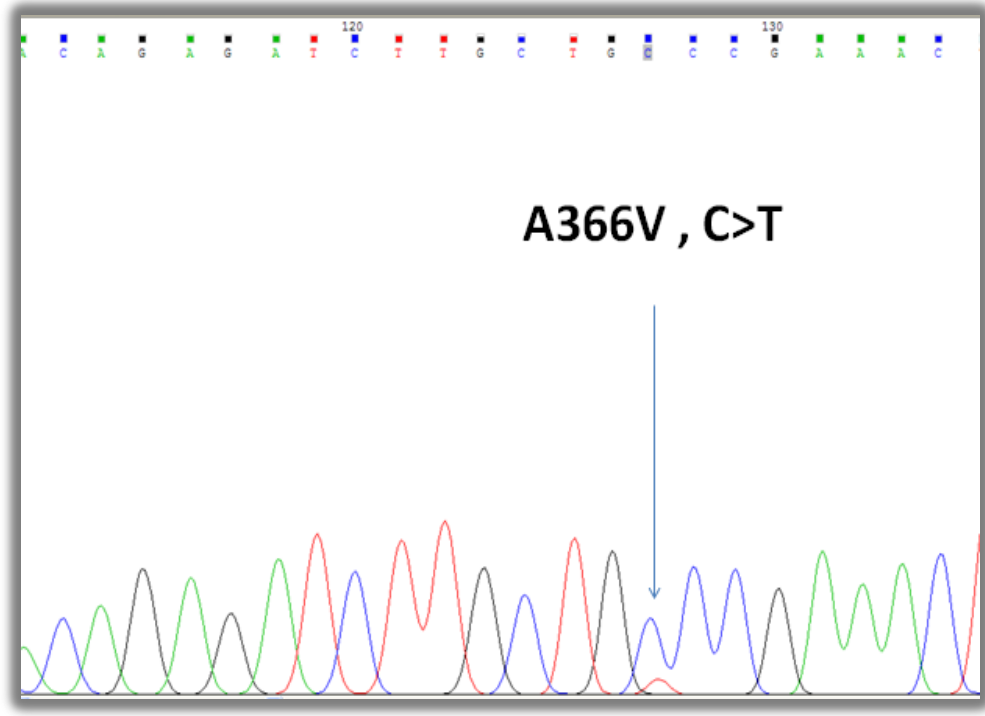
Şekil 27: 14 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot C369C mutasyonu



Şekil 28: 24 nolu hastada G>A dönüşümü ile heterozigot A380T mutasyonu



Şekil 29: 15 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot C369C mutasyonu



Şekil 30: 40 nolu hastada C>T dönüşümü ile heterozigot A366V mutasyonu.

7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20-30'unu meydana getiren Kronik Miyeloid Lösemi (KML), t(9;22) (q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu ile karakterize olan bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. (Deininger ve ark., 2000; Corbin ve ark., 2003). Ph kromozomu KML hastalarının % 95'inde bulunur ve KML için ayırt edici bir belirteç olarak kabul edilir (Deininger ve ark., 2000; Wongboonma ve ark., 2012). Bu resiprokal kromozomal translokasyon, aberant tirozin kinaz aktivisine yol açar (Quintas-Cardama ve Cortes, 2009). KML patogenezinin bakıldığında BCR-ABL-pozitif hücreler; artmış proliferasyona (mitojenik aktivite), apoptoz inhibisyonuna ve değişmiş adezyon özelliklerine sahiptir ve hücrelerin aşırı çoğalması ile hastalıkta malign fenotip görülür (Deininger ve ark., 2000). KML'nin 3 fazı vardır: kronik, akselere ve blast krizi. Hastalık, ek genetik anomalilerin birikmesi ile ilerler (Corbin ve ark., 2003).

Hastalığın tedavisi için dünya genelinde ilk basamak tedavisi olarak İmatinib Mesilat (Gleevec, Glivec, STI-571) kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalara göre hastaların yaklaşık %20'sinde BCR-ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları sebebiyle İmatinib tedavisinde başarısızlık meydana gelmiştir (Vaidya ve ark., 2015). Özellikle akselere faz ve blast kriz fazında görülen mutasyonlar, kinaz domain yapısını değiştirerek ilacın bağlanma afinitesine zarar verir (Wang ve ark., 2014). BCR-ABL kinaz bölgesindeki nokta mutasyonları, direnç gelişen hastalarda %30 - %90 oranında görülür (Cortes ve ark., 2007). Mutasyonların 90'dan fazla tipi vardır (Wongboonma ve ark., 2012). Mutasyonların ABL kinaz domaindeki lokasyonlarına göre başta İmatinib'e ve ikinci nesil TKİ'lerine (Nilotinib, Dasatinib gibi) direnç gelişir. Hastalarda iki şekilde direnç gözlenir; ilki primer direnç; tedaviye yanıtızsızlık halidir. İkincisi ise sekonder dirençtir, başlangıçta tedaviye yanıt gösterildiği halde zamanla tedavi yanıtında azalma olmasıdır (Litzow, 2006; Wei ve ark., 2006). Çeşitli direnç mutasyonları TKİ terapilerinden önce bulunabilir ve tedavi sonucunu etkileyebilir (Wongboonma ve ark., 2012).

En sık görülen mutasyon, T315İ mutasyonudur, dirençli hastaların %15-25'inde T315İ mutasyonu mevcudiyeti nedeni ile İmatinib ve diğer tirozin kinaz

inhibitörlerine tam bir duyarsızlık oluşur (Litzow, 2006; Bartholomeusz ve ark., 2007; Quintás-Cardama ve ark., 2008). Bu çalışmada T315İ mutasyonu tespit edilmemiştir, bu yüzden T315İ mutasyon frekansı literatür ile uyumlu değildir.

İmatinib'e duyarlı başlıca kinaz domain mutasyonları; T315İ, Y253H/F, M351T, G250E, E255K/V, F359V ve H396R olarak belirtilmiştir (Apperley, 2007). İmatinib doz artırılması, ikinci nesil TKİ'leri (Nilotinib, Dasatinib) ve allojenik kök hücre transplantasyonu İmatinib dirençli olgular için tedavi seçenekleridir. İkinci nesil TKİ seçiminde, BCR-ABL kinaz domaini mutasyonları ve hastada eşlik eden diğer hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır (Soverinive ark., 2011).

Çalışmaya dahil edilen 45 hastanın 11'inde mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar; 4 hastada E255K, 2 hastada D241G, 2 hastada C369C, 1 hastada K285N, 1 hastada A380T ve 1 hastada A366V mutasyonudur.

Bu çalışmada genel KD mutasyon frekansı % 24.44 olarak tespit edilmiştir. Literatür ile kıyaslandığında; Kang ve ark. 2006'da yaptıkları çalışmada KD mutasyon frekansını dizi analizi yöntemi ile %30 olarak tespit etmiştir. Wongboonma ve ark., 2012'de yaptıkları çalışmada KD mutasyon frekansını %33 olarak bulmuştur. Iqbal ve ark. 2013'de yaptıkları çalışmada genel mutasyon frekansını %32 olarak tespit etmiştir. Bu çalışmada genel KD mutasyon frekansının, literatüre yakın olmakla beraber daha düşük olduğu gözlenmiştir.

E255K mutasyonu frekansı %8.8 olarak tespit edildi. OncQuest ve GIMEMA çalışmalarında E255K mutasyon frekansı sırası ile %6.9 ve %16.5 olarak bulunmuştur. Bulduğumuz sonuç literatür ile uyumludur. E255K mutasyonu, 4. ekzonda ve P-loop'da yer alır, İmatinib'e ve Nilotinib'e dirençlidir. ELN verilerine göre E255K mutasyonu mevcudiyetinde Dasatinib tedavisi önerilmektedir.

E255K mutasyonu tespit edilen 2 nolu hasta, genel tedavi sürecinde İmatinib (4yıl), Dasatinib (2yıl) kullanmıştır. MMR ve CCR kaybı görüldüğünden ve E255K mutasyonunun Dasatinib'e de az duyarlı olduğu bilindiğinden, en son aşamada Bosutinib'e geçiş yapılmıştır.

E255K mutasyonu tespit edilen 7 nolu hasta, 1 yıldır 400 mg İmatinib tedavisi almaktadır. Hasta kronik fazdadır. BCR/ABL transkript seviyesi ve hastanın diğer

klirik verileri göz önüne alınarak tedaviye yanıtıslık durumunda Dasatinib'e veya daha uygun bir başka tedavi seçeneğine geçiş yapılması önerilmektedir.

E255K mutasyonu tespit edilen 4 nolu hasta, 4 yıldır 400 mg İmatinib tedavisi almaktadır. Hastada MMR kaybı mevcuttur. BCR/ABL transkript seviyesi ve hastanın diğerklinik verileri göz önüne alınarak tedaviye yanıtıslık durumunda Dasatinib'e veya daha uygun bir başka tedavi seçeneğine geçiş yapılması önerilmektedir.

E255K mutasyonu tespit edilen 10 numaralı hasta, 7 yıl İmatinib, 4 yıl Nilotinib (200mgx2) ve 1 yıl da Dasatinib tedavisi görmüştür. MMR elde edilememiştir ve hasta AML'ye transforme olmuştur. 2014 yılında hastaya mutasyon analizi yapılmış ancak mutasyon tespit edilememiştir. 2015 yılında yaptığımız bu çalışmada hastada E255K mutasyonu tespit edilmiştir. Buna göre, hastada sekonder direnç geliştiğı düşünölmektedir.

D241G ve C369C mutasyonlarının frekansı % 4.4'tür. D241G mutasyonu 4. ekzonda (P-loop) yer almaktadır. C369C mutasyonu 7. Ekzonda (C-loop) yer almaktadır.

K285N, A380T ve A366V mutasyonlarının frekansı % 2.2 olarak tespit edilmiştir. 28 nolu hastada tespit edilen K285N mutasyonu 5. ekzonda (İmatinib Bağlanma Bölgesinde) yer almaktadır. MMR elde edilemeyen bu hasta 4 yıldır İmatinib (400 mg) tedavisi almaktadır. BCR/ABL transkript seviyesi ve hastanın diğerklinik verileri göz önüne alınarak daha uygun bir başka tedavi seçeneğine geçiş yapılması önerilmektedir. 40 nolu hastada tespit edilen A366V mutasyonu ekzon 7'de (C-loop) yer almaktadır. 24 nolu hastada tespit edilen A380T mutasyonu ise ekzon 7'de (A-loop) yer almaktadır. A-loop, İmatinib bağlanma bölgesi olduğı için, halen İmatinib (400 mg) tedavisi alan bu hastada BCR/ABL transkript seviyesi ve hastanın diğerklinik verileri göz önüne alınarak daha uygun bir başka tedavi seçeneğine geçiş yapılması önerilmektedir.

45 hastanın 11'inde tespit edilen mutasyonların İmatinib tedavisine suboptimal yanıt, yanıt kaybı ve direncin sebeplerinden biri olarak düşünölmektedir. Özellikle 4 hastada tespit edilen E255K mutasyonu İmatinib ve Nilotinib tedavisine dirençle karakterize olan bir mutasyondur.

Hastaların yaşı, cinsiyeti ile tespit edilen mutasyon arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Dirençle karakterize olan mutasyonların tespit edildiği hastalar en az 1, en çok 11 yıldır KML tanısı almış, tedavi görmekte olan hastalardır ve hepsinde başlangıç tedavisi olarak İmatinib kullanılmıştır. 8 hastada MMR elde edilemeyince 2. Nesil TKI olan Dasatinib veya Nilotinib'e geçilmiştir ve ilaç değişimi olmasına rağmen bu hastalarda hala MMR elde edilememiştir. Bu durumun başlıca sebebinin E255K gibi BCR-ABL geni p-loop kısmında bulunan tedaviye dirençle karakterize mutasyonlar olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden bu mutasyonların tespit edildiği hastalarda, diğer kliniksel veriler ile beraber değerlendirme yapıp mutasyon mevcudiyetine göre ya 3. Nesil TKI tedavisine geçiş ya da hastalığın daha net sonuç veren tedavi yöntemi olan somatik kök hücre tranplantasyonunun uygulanması tavsiye edilmektedir. 3 hastada hala İmatinib tedavisi devam etmektedir, bu hastalarda BCR/ABL transkript seviyesi ve hastanın diğer klinik verileri göz önüne alınarak tedaviye yanıtızsızlık durumunda en uygun TKI'ye geçiş yapılması önerilmektedir.

MMR üzerine etkisi düşünüldüğünde, BCR-ABL geni Kinaz bölgesi mutasyonlarını tespit ederek ilaç seçimi yapmanın çok yararlı olduğu düşünülmektedir. Bu sayede hem genel sağ kalım oranı artabilir hem de daha iyi prognoz sağlanabilir. Özellikle hastaların olumlu yanıt vermeyecekleri ilaçlar ile uzun zaman gereksiz tedavilerinin önüne geçilmiş olabilir. Tedavi maliyetleri de bu sayede en aza indirgenmiş olabilir.

Bu çalışmada mutasyon tespiti için dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Hastalarda KD'de mevcut bütün aminoasit değişimleri incelenmek istendiği için dizi analizi yöntemi seçilmiştir. Farklı mutasyon analiz yöntemleri kullanılarak BCR-ABL geni Kinaz bölgesi mutasyonlarını tespit edilebilir. ASO PCR bu bağlamda tavsiye edilecek yöntemlerden biridir. Mutasyon tespit etme hassasiyeti çok başarılıdır ve çok düşük maliyetli olması avantajlıdır. Dizi analizine kıyasla daha az zaman alıcı ve daha basit bir yöntemdir. Rutin olarak hastanelerde, BCR-ABL geni Kinaz bölgesindeki tedaviye dirençle karakterize olan belli başlı mutasyonları tespit etmek için kullanılabilir, her mutasyon için ayrı primer kullanılarak çalışmalar kolaylıkla sürdürülebilir. Dizi analizi yöntemi ile yapılan bu çalışma, ileride yapılacak ASO PCR çalışmaları için temel teşkil etmektedir.

BCR-ABL geni Kinaz bölgesi mutasyonlarının tespiti konusunda daha geniş hasta popölasyonu ile ve birden fazla mutasyon tespit etme yöntemi kullanılarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma ve benzer çalışmaların birikimli sonucu ile hastanelerde KML hastalarının tanı ve tedavi takibini kolaylaştıracak nitelikte olan mutasyon analizi uygulamasının hayata geçirilmesi, hem hekimler hem de hastalar için çok yararlı olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Ai J and Tiu RV., Practical management of patients with chronic myeloid leukemia who develop tyrosine kinase inhibitor-resistant BCR-ABL1 mutations. *Ther Adv Hematol* 2014, Vol. 5(4) 107–120

Apperley, J.F., Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The Lancet Oncology* 2007;8, 1018–1029.

Baccarani M., Castagnetti F., Gugliotta G., Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol* (2015) 94(Suppl 2):S141–S147

Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84

Baccarani M, Pane F, Saglio G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica*.2008; 93(2)

Bartholomeusz A.G., Talpaz M., Kapuria V., Kong L.Y., Wang S., Estrov Z., Priebe W., Wu J. and Donato N.J. Activation of a novel Bcr/Abl destruction pathway by WP1130 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*.2007;109:3470-3478

Bennour A, Tabka , Youssef Y, Kmeira Z, Khelif A, Saad A, Sennana H. A novel t(3;12)(q21;p13) translocation in a patient with accelerated chronic myeloid leukemia after imatinib and nilotinib therapy. *Cancer Biol Med*. 2013 Mar;10(1):47-51

Bernt KM., Hunger SP. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology*. March 2014, Volume 4, Article 54

Chen R., Chen B. The role of dasatinib in the management of chronic myeloid leukemia. *Drug Design, Development and Therapy* 2015;9:773–779

Corbin, A.S., La Rosee P., Stoffregen, E.P., Druker, B.J., Deininger, M.W., (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*. 101:4611–4614.

Cortes JE, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Breeden M, Reeves N, Wierda WG, Jones D. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4005-11

Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas DA, Wierda W, Ferrajoli A, Jeha S, Kantarjian HM. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3794-800.

Deininger, M., Goldman, J. and Melo J. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96; 3343- 3356

Deininger, M., Vierra, S. 2000. Bcr-Abl tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of CML. *Cancer Research*, 60; 2049- 2055

Druker BJ., O'Brien SG, Cortes J., Radich J. Chronic Myelogenous Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:111-35

Freireich EJ, Wiernik PH, Steensma DP. The leukemias: a half-century of discovery. *J Clin Oncol*. 2014 Nov 1;32(31):3463-9.

Goldman JM., 2010. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol.*;47(4):302-11

Goldman JM., Melo JV. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451-64.

Greuber EK1, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2013 Aug;13(8):559-71.

Holyoake TL, Helgason GV. Do we need more drugs for chronic myeloid leukemia? *Immunol Rev*. 2015 Jan;263(1):106-23.

Jabbour E, Branford S, Saglio G, Jones D, Cortes JE, Kantarjian HM. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011 Aug;117(15):3535.

Jabbour E., Hochhaus A., Cortes J., Rose´e P La., Kantarjian HM. Choosing the best treatment strategy for chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib: weighing the efficacy and safety of individual drugs with BCR-ABL mutations and patient history. *Leukemia* (2010) 24, 6–12

Johansson B.,Fioretos T.,Mitelman F. Cytogenetic and Molecular Genetic Evolution of Chronic Myeloid Leukemia. *Acta Haematol* 2002;107:76–94

Jones D1, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, Quigley N, Rothberg P, Sabath D, Viswanatha D, Weck K, Zehnder J. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2009 Jan;11(1):4-11.

Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med*. 145(12): 913-23, 2006.

Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas D, Shan J, Rios MB, Cortes J. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome

resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood. 2003 Jan 15;101(2):473-5.

Klug, W. S., M. R. Cummings, et al. (2006). Concepts of Genetics.

Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. Cancer Res 61(6): 2343-2355, 2001.

La Rosée P., Deininger MW. Resistance to imatinib: mutations and beyond. Semin Hematol. 2010 Oct;47(4):335-43

Litzow, M. 2006. Imatinib Resistance, Obstacles and Opportunities. Arch Pathol Lab Med, 130; 669- 679

Melo, V. J. and Deininger W.N.M. 2004. Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation. Hematol Oncol Clin N Am.,18;545-568

O'Brien S., Berman E., Borghaei H., DeAngelo D.J., Marcel P. and et al. Chronic Myelogenous Leukemia. J Natl Compr Canc Netw 2009;7:984-1023

Pavlu J1, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? Blood. 2011 Jan 20;117(3):755-63

Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Cortes J.E. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. 2009. Cancer Control. Vol. 16, No. 2

Rana A., Shah SH., Rehman N., Ali S., Ali GM., Bhatti S., Farooqi AA. Chronic myeloid leukemia: Attributes of break point cluster region-abelson (BCR-ABL) Journal of Cancer Research and Experimental Oncology Vol. 3(6), pp. 62-66, September 2011

Roche-Lestienne, C., Soenen-Cornu, V., Grardel-Duflos, N., lai, J.L., Philippe, N., Facon, T., Fenaux, P., Preudhomme, C., (2002). Several types of mutations of the abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can preexist to the onset of treatment. Blood. 100:1014-8.

Sevindik E., ABACI T. Nested PCR ve Kullanım Alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 6 (2): 22-26, 2013

Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., Sawyers, C.L., 2002. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2, 117–125.

Shet AS., Jahagirdar BN., Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. Leukemia (2002) 16, 1402–1411

Soverini S., Hochhaus A., Nicolini F.E., Gruber F., Lange T., et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011 118: 1208-1215

Soysal T., Eşkazan AE. Kronik Miyeloid Lösemi, Klinik Bulgular Tanı Tedavi. Türk Hematoloji Derneği HematoLog 2012: 2.1

Srivastava S., Dutt S. Imatinib mesylate resistance and mutations: An Indian experience. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. Jul-Sep 2013; Vol 34, Issue 3

Syed NN, Usman M, Adil S, Khurshid M. Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2008 Jul-Sep;1(3):166-70.

Tuğlu MM., Melli M., İmatinib: Etki Mekanizması ve Direnç Geliştirme Mekanizmaları. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2012, 65 (2)

Vaidya S, Vundinti BR, Shanmukhaiah C, Chakrabarti P, Ghosh K. Evolution of BCR/ABL Gene Mutation in CML Is Time Dependent and Dependent on the Pressure Exerted by Tyrosine Kinase Inhibitor. PLoS One. 2015 Jan 28;10(1):e0114828

Vardiman JW., Harris NL., Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood-2002-04-1199.

Walz, C., and Sattler, M. 2006. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57; 145- 164

Wang Z., Liu Z., Wu X, Chu S, Wang J, Yuan H., Roth M., Yuan YC, Bhatia R, Chen WY.(2014). Correction: ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance. *PLoS Genet* 10(6): e1004414

Wongboonma W, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU (2012) BCR-ABL kinase domain mutations in tyrosine kinase inhibitors-naïve and –exposed Southeast Asian chronic myeloid leukemia patients. *Exp Mol Pathol* 92: 259– 265



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI: İmatinib Tedavisine Direnç Gösteren Kronik Miyeloid Lösemi Hastalarında BCR-ABL Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Belirlenmesi ve Klinikle İlişkisi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Doç.Dr. Mustafa AKKİPRİK
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Betül KOÇKAN
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 26.01.2015-1

Sayın Doç.Dr. Mustafa AKKİPRİK

156 protokol nolu "İmatinib Tedavisine Direnç Gösteren Kronik Miyeloid Lösemi Hastalarında BCR-ABL Geni Kinaz Bölgesi Mutasyonlarının Belirlenmesi ve Klinikle İlişkisi" isimli projeniz Enstitümüzün Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

F. Arıcıoğlu

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Prof. Dr. İnci ALİCAN

Serap

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Aysel

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

Tolga

Doç. Dr. Tolga GÜVEN

Nefise

Doç. Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç. Dr. Hakkı ARIKAN

Doç. Dr. Dilşad SAVE

Doç. Dr. Zübeyir SARI

Yrd. Doç. Dr. Betül OKUYAN

Yrd. Doç. Dr. Ümit UĞURLU



Marmara Üniversitesi Göztepe
Kampüsü Sağlık Bilimleri
Enstitüsü 34688 Kadıköy /
İSTANBUL

0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23

saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
http://saglik.marmara.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için:

ÖZGEÇMİŞ

Adı	BETÜL	Soyadı	KOÇKAN
Doğum Yeri	FATİH / İSTANBUL	Doğum Tarihi	11.04.1991
Uyruğu	T.C.	Tel	05384709892
E-mail	betulkockan@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2015
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2013
Lise	FATİH KIZ LİSESİ	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	ORTA	ORTA

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
66.25								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MICROSOFT OFFICE	İYİ

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)