

MERVE ORDU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

YÜKSEK LİSANS

**“KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FARKLI
T(9;22) KIRIKLARININ TESPİTİ VE TEDAVİ YANITI İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”**

MERVE ORDU

DANIŞMAN

PROF. DR. MÜGE SAYITOĞLU

GENETİK ANABİLİM DALI

GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Öncelikle tüm yüksek lisans sürecim boyunca tüm bilgi birikimi ile beni destekleyen, tecrübeleri ile yol gösteren, sabrını ve zamanını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof.Dr. Müge Sayitoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Değerli hocam Dr. Yücel Erbilgin'e tez çalışmam boyunca soru ve sorunlarıma içtenlikle çözümler ürettiği ve tezime olan katkıları için teşekkür ederim.

Canım arkadaşım Merve Sarıtaş, seninle aynı ekipte olmak ve tüm süreci birlikte paylaşmak çok güzeldi. Yorulduğum zamanlarda beni cesaretlendirmen, ilerleyemediğim zamanlarda bana olan desteğin, kısacası arkadaşlığın için çok teşekkür ederim. Birlikte çok şey başardık. Umarım hep bir arada oluruz.

Yine her sorunumda yanlarına koştüğüm ve engin bilgilerini benimle paylaşan sevgili ekip arkadaşlarım Tuğçe Sudutan, Didem Altındirek, Khusan Khodzaev, Emre Avcı ve Hilal Hekimoğlu'na teşekkür ederim. Sizin kadar yakın bir grupta çalışmak büyük zevkti. İyi ki sizleri tanıdım.

Hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve yüksek lisansın bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım; Hülya Aydınli, Betül Zorkaya ve Büneyan Tüzün, sizi tanıdığım için çok mutluyum. Tüm desteğiniz için size ayrı ayrı teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman bana inanan ve daima yanımda olduklarını bildiğim canım ailem; babam Erol Ordu, annem Şefika Çakır'a, canım ablam Şeyma Ortayol ve eşi Tarık Ortayol'a sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız ve zor olan bu süreci kolaylaştırdığınız için minnetarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37213

İçindekiler Tablosu

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hematopoez.....	2
2.2. Lösemiler ve Miyeloproliferatif Hastalıklar	2
2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML).....	3
2.2.2. KML'nin Klinik Özellikleri ve Evreleri.....	6
2.2.3. t(9;22) <i>BCR::ABL1</i> Philadelphia (Ph) kromozom.....	7
2.2.4. Kronik Miyeloid Lösemi'nin Moleküler Biyolojisi	9
2.2.4.1. <i>ABL1</i> Geni, Yapısı ve Fonksiyonu	9
2.2.4.2. <i>BCR</i> Geni, Yapısı ve Fonksiyonu.....	10
2.2.4.3. <i>BCR::ABL1</i> Füzyonun Etkilediği Sinyal Yolakları.....	11
2.2.5. Kronik Miyeloid Lösemi'de Tedavi ve İlişkili Direnç Mekanizmaları.....	16
2.2.5.1. KML'de Tedavi ve Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	16
2.2.5.2. TKI Direnç Mekanizmaları	22
2.2.5.2.1. <i>BCR::ABL1</i> Bağımlı Direnç Mekanizmaları.....	24
2.2.5.2.1.1. <i>BCR::ABL1</i> Kinaz Domain Mutasyonları	25
2.2.5.2.1.2. Artmış <i>BCR::ABL1</i> İfadesi.....	26
2.2.5.2.2. <i>BCR::ABL1</i> Bağımsız Direnç Mekanizmaları.....	27
2.2.5.2.2.1. İlaç Giriş-Çıkış Pompaları ve Bozulmuş Sinyal Yolakları.....	27
2.2.5.2.2.2. Kanser Kök Hücre, Mikroçevre ve Epigenetik.....	28
2.2.5.2.2.3. Klonal Evrim, Genomik İstabilite ve Eksik DNA Onarımı	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Gereç.....	32
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	34

3.1.2. Kullanılan Kitler	34
3.1.3. Kullanılan Elektronik Veri tabanları	34
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar	35
3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. RNA izolasyonu, Kalite ve Miktar Tayini	36
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	37
3.2.3. Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu	37
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	41
3.2.5. Kırık Tiplerinin Tanımlanması ve Sanger Dizileme	41
3.2.6. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. <i>GADH</i> Kontrol Geni Anlatımı	42
4.2. Tüm Kırık Tiplerinin Çalışma Grubundaki Dağılımı	42
4.2.1. İlk Geliş Örneklerinin Dağılımı	42
4.2.2. Direnç Anı Örneklerinin Dağılımı	45
4.2.3. İlk geliş ve Direnç Anı Örneklerinin Karşılaştırılması	49
4.3. Koekspresyonların Çalışma Grubundaki Dağılımı	50
4.4. Eşlenik Örneklerin Değerlendirilmesi	50
4.5. Farklı Füzyonları İfade Eden Örneklerin Değerlendirilmesi	52
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	62
HAM VERİLER	70
FORMLAR	71
ETİK KURUL KARARI	71
PATENT HAKKI İZNİ	75
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	76
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: KML biyolojisinin anlaşılmasındaki önemli aşamalar.....	5
Tablo 2: KML hastalarında sık görülen klinik bulgular	6
Tablo 3: 2012'ye kadar FDA tarafından onaylanmış olan BCR::ABL1 inhibitörleri ...	22
Tablo 4: CTF takipli hastalarının klinik özellikleri	32
Tablo 5: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	34
Tablo 6: Çalışmada kullanılan kitler ve kullanım amacı	34
Tablo 7: cDNA sentezi için kullanılan materyaller	35
Tablo 8: Polimer Zincir Reaksiyonunda kullanılan materyaller.....	35
Tablo 9: Kullanılan kimyasallar.....	35
Tablo 10: GAPDH geni kontrol PZR içeriği	38
Tablo 11: GAPDH geni PZR koşulları	38
Tablo 12: BCR::ABL1 kantitasyonu %100-%10 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) ve p190 (e1a2,e2a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyonları için PZR içeriği	38
Tablo 13: BCR::ABL1 kantitasyonu %10-%1 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonu için PZR içeriği.....	39
Tablo 14: BCR::ABL1 kantitasyonu <%1 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonu için PZR içeriği.....	39
Tablo 15: p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) ve p230 (e19a2, e19a3) füzyonları için PZR koşulları	40
Tablo 16: p190 (e1a2, e1a3) füzyonu için PZR koşulları.....	40
Tablo 17: p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonuna özgü primerler.....	40
Tablo 18: p190 (e1a2, e1a3) füzyonuna özgü primerler.....	40
Tablo 19: p230 (e19a2, e19a3) füzyonuna özgü primerler.....	40
Tablo 20: PZR sonrası beklenen ürün boyları	41
Tablo 21: İlk geliş örneklerinde belirlenen füzyonların cinsiyetlere göre dağılımı	45
Tablo 22: Direnç anı örneklerinde belirlenen kırık tiplerinin sayısı ve yüzdeleri	46
Tablo 23: Direnç anı örneklerinde iki grup arasında füzyon transkriptlerinin dağılımı	49
Tablo 24: Tüm örneklerin ilk geliş ve direnç anı örnekleri olarak karşılaştırılması.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hematopoez	2
Şekil 2: Lösemilerin sınıflandırılması	3
Şekil 3: BCR ve ABL1 genlerinin ekzonlarının yapısı ve kırık bölgeleri.....	8
Şekil 4: BCR::ABL1 füzyonları	9
Şekil 5: ABL1 ve BCR proteinlerinin domainlerinin şematik gösterimi ve p190, p210 ve p230 füzyonlarına ait protein domainleri.....	11
Şekil 6: BCR::ABL1 yapısı ve kronik miyeloid lösemi (KML) hücrelerinde aktive olan moleküler sinyal yolları	13
Şekil 7: BCR::ABL1 kinaz, RAC guanozin trifosfatazların (RAC GTPazlar) ve diğer sinyal molekülleri ile etkileşimi.....	14
Şekil 8: KML progresyonunda yer alan sinyal molekülleri ve değişimler.....	16
Şekil 9: BCR::ABL1 ve TKI'lerinin etki mekanizması	18
Şekil 10: Tip I ve Tip II inhibitörler.....	19
Şekil 11: Tedavi yanıtı, lösemik hücre sayısı ve BCR::ABL1 transkript seviyesi arasındaki ilişki	21
Şekil 12: BCR::ABL1 bağımlı ve BCR::ABL1 bağımsız direnç.....	24
Şekil 13: KML hastalarında tanımlanan ABL1 kinaz domain mutasyonları	26
Şekil 14: KML'de TKI direncinin moleküler mekanizmaları.....	31
Şekil 15: Çalışmaya dahil edilen örneklerin dağılımı	33
Şekil 16: GAPDH PZR'a ait temsili jel görüntüsü.....	42
Şekil 17: Atipik bant belirlenen örneklerle ait jel görüntüsü	43
Şekil 18: İlk geliş örneklerinde transkript tiplerinin dağılımı	43
Şekil 19: #94 nolu örnekte bulunan atipik füzyonun sanger görüntüsü	44
Şekil 20: #94 nolu örneğe atipik atipik füzyonun yapısı ve eklenen intronik dizi.....	44
Şekil 21: Herhangi bir füzyon olmadığı belirlenerek dışlanan bantlara ait jel görüntüleri	46
Şekil 22: e18a2 ifade eden örneğe ait jel ve sanger dizileme sonucu.	47
Şekil 23: e18a2 füzyonunun yapısı	47
Şekil 24: p190 (e1a2) ifade eden örneklerle ait jel görüntüsü.....	48
Şekil 25: p230 (e19a2) ifade eden örneklerle ait jel görüntüsü.....	48
Şekil 26: Eşlenik örneklerdeki füzyon tiplerinin aylara göre dağılımları ve ABL1 mutasyon durumları	51

Şekil 27: #13 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	52
Şekil 28: #18 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	53
Şekil 29: #19 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	53
Şekil 30: #28 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	54
Şekil 31: #38 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	54
Şekil 32: #78 nolu örneğe ait BCR::ABL1 anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.	55

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

KML:	Kronik Miyeloid Lösemi
BCR:	Breakpoint Cluster Region
ABL1:	V-Abl Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
Ph:	Philadelphia Kromozomu
CP:	Kronik faz
AP:	Akselere faz
BC:	Blastik kriz
M-BCR:	Majör Breakpoint Cluster Region
m-BCR:	Minör Breakpoint Cluster Region
μ -BCR:	Mikro Breakpoint Cluster Region
HSC:	Hematopoietik Stem Cell – Hematopoietik Kök Hücre
NK:	Natural Killer – Doğal Öldürücü hücre
LSC:	Leukemic Stem Cell – Lösemik Kök Hücre
CMPH:	Chronic Myeloproliferative Disease - Kronik Miyeloproliferatif Hastalık
FDA:	U.S. Food and Drug Administration - Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
TKI:	Tyrosine Kinase Inhibitory – Tirozin Kinaz İnhibitörü
ALL:	Akut Lenfoblastik Lösemi
KD:	Kinaz Domain
MMLV:	Moloney Murine Leukemia Virus ters transkriptaz
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR:	Ters Transkriptaz PZR

ÖZET

Ordu, M. (2022). KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FARKLI T(9;22) KIRIKLARININ TESPİTİ VE TEDAVİ YANITI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid hücrelerin anormal olarak çoğalmasıyla oluşan bir kök hücre hastalığıdır. Kronik miyeloid lösemide 9. ve 22. kromozomlar arasında görülen ve 22. kromozomun q11 bandı (*BCR* geni) ile 9. kromozomun q34 bandının (*ABL1* geni) katıldığı translokasyon sonucu Philadelphia kromozomu (Ph) oluşur. Ph pozitif hücre, klonunun çoğalmasına ve lökositöze neden olur. KML’de kromozomların farklı noktalarında kırıklar oluşabilmektedir ve bu değişik kırıkların füzyonları sonucunda farklı onkogenik ürünler ortaya çıkmaktadır. Farklı *BCR::ABL1* füzyonları sonucunda oluşan farklı RNA transkriptlerinin translasyonu, hastalığın biyolojik özelliklerini ve tedavi yanıtını etkileyebilecek farklı protein tirozin kinazların (PTKs) üretimi ile sonuçlanır. Bu çalışma ile farklı *BCR::ABL1* transkriptlerinin tanı, tedavi, hastalığın seyri ve nüks durumları üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya KML tanısı almış n=125 hastaya ait örneklem zamanları bulunan toplam 182 örnek dahil edilmiştir. Bu örneklerin 111 tanesi tanı sonrası Ph (+) olan takip, 72 tanesi ise direnç anı kan örnekleridir. Tüm örnekler p210 (e14a2, e13a2, e14a3, e13a3), p190 (e1a2, e1a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyonları açısından ters transkriptaz PZR yöntemiyle taranmıştır. İlk geliş örneklerinde e14a2 %48,6, e13a2 %35,1, e14a2/e13a2 birlikteliği %15,3, e13a2/atipik birlikteliği %0,9 olarak saptanmıştır. Direnç anı örneklerinde e14a2 %59,2, e13a2 %22,5, e14a2/e13a2 %8,4, e14a2/e1a2 %1,4 e13a2/e1a2 %1,4, e14a2/e19a2 %4,2, e14a2/e13a2/e1a2/e19a2 %1,4 ve e13a2/e18a2 %1,4 olarak belirlenmiştir. İlk geliş örnekleri, direnç anı örnekleri ile karşılaştırıldığında; direnç anı örneklerinde e13a2 ve e14a2/e13a2 sıklığının azaldığı, e14a2 füzyonunun sıklığının arttığı ve atipik nadir transkriptlerin varlığı görülmektedir. Buna göre, e14a2 füzyonunun ve atipik nadir transkriptlerin KML’de direnç ve düşük tedavi yanıtı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik miyeloid lösemi, Philadelphia kromozomu, *BCR::ABL1* füzyonları, Ters transkriptaz PZR, RNA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37213

ABSTRACT

Ordu, Merve. (2022). DETERMINATION OF DIFFERENT T(9;22) TRANSCRIPTS AND INVESTIGATION OF THEIR RELATIONSHIP WITH TREATMENT RESPONSE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master thesis. Istanbul.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a stem cell disease which develops with abnormal proliferation of myeloid cells. In CML, Philadelphia chromosome(Ph) is formed by translocation between q11 band of 22nd chromosome (BCR gene) and q34 band of 9th chromosome (ABL1 gene). Ph(+) cell induces clone proliferation and leucocytosis. In CML, fractures maybe occurred at different points of chromosomes and fusions of different fractures conclude different oncogenic products. Translation of each RNA transcripts from different *BCR::ABL1* fusions results in different protein tyrosine kinases(PTKs). These PTKs can potentially affect biological features of disease and response to therapy. This study aimed to determine effects of different transcripts on diagnosis, treatment, course of disease and recurrence. Our study involved 182 samples which included different time points samples of 125 patients with CML. 111 of blood/bone marrow samples were Ph(+) diagnose/follow up samples and 72 of 182 samples were collected during therapy resistance. All samples was evaluated by using RT-PCR in terms of p210(e14a2,e13a2,e14a3,e13a3), p190(e1a2,e1a3) and p230(e19a2,e19a3) fusions. In first admission samples, e14a2 %48,6, e13a2 %35,1, e14a2/e13a2 coexpression %15,3, and e13a2/atypical %0,9 were determined. In resistant samples, e14a2 %59,2, e13a2 %22,5, e14a2/e13a2 %8,4, e14a2/e1a2 %1,4 e13a2/e1a2 %1,4, e14a2/e19a2 %4,2, e14a2/e13a2/e1a2/e19a2 %1,4 ve e13a2/e18a2 %1,4 was detected. When primary samples compared with resistant samples; in resistant samples, the frequency of e13a2 and e14a2/e13a2 decreased, the frequency of e14a2 fusion increased, and the presence of atypical rare transcripts was observed. Accordingly, e14a2 fusion and atypical rare transcripts may be associated with resistance and low treatment response in CML.

Key words: Chronic Myeloid Leukemia, Philadelphia chromosome, *BCR::ABL1* fusions, Reverse transcriptase PCR, RNA

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37213

1. GİRİŞ VE AMAÇ

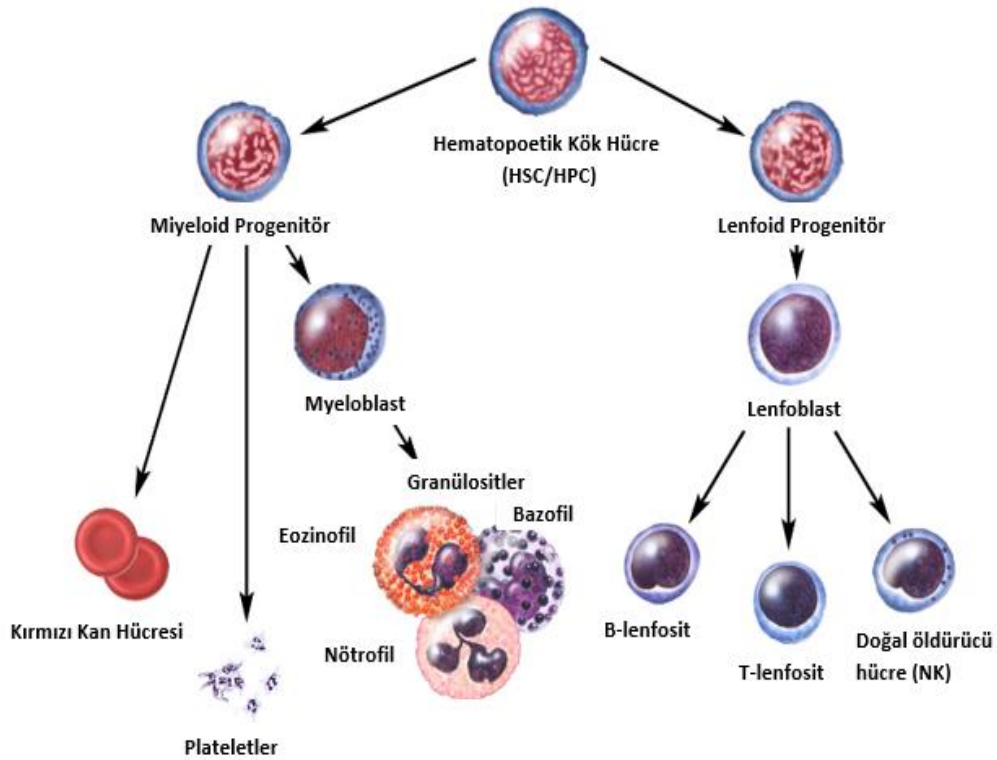
Kronik Miyeloid Lösemi (KML) olgunlaşmamış hematopoetik kök hücrelerin neoplastik dönüşümü ile oluşan klonal, miyoloproliferatif bir hastalıktır. KML’de 22. kromozomun q11 bandındaki *BCR* geni ile 9. kromozomun q34 *ABL1* geninin translokasyonu ile tirozin kinaz aktivitesine sahip *BCR::ABL1* füzyon geni oluşur. Bu füzyon sonucu oluşan kromozom Philadelphia kromozomu (Ph) olarak adlandırılmaktadır. KML, tipik olarak kronik faz (CP), orta dereceli hızlandırılmış faz (akselere faz=AP) ve blastik faz (blastik kriz=BC) olarak 3 evre şeklinde gözükür (1). KML vakalarının %99’u, erişkin akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarının %20-40’ı ve pediatrik ALL hastalarının %2-5’i Ph kromozomu pozitifdir (2). T(9;22) sonucunda oluşan füzyon genin ürünleri olan proteinler lökojeniktir ve KML veya Ph-pozitif ALL’ye neden olur (1). Değişik kırılma noktaları farklı onkogenik ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar. Farklı kırılma noktaları ile ortaya çıkan kimerik *BCR::ABL1* genleri, farklı hastalıklara özgüdür. *BCR::ABL1* füzyonu, farklı kırıklar olarak üç ana formda (P190, P210 ve P230) bulunur. KML hastalarının %95’inde *BCR* geni içerisinde kırılmalar sıklıkla 12-16. ekzonlar arasında olmaktadır. Bu bölge Major breakpoint cluster region (M-*BCR*) olarak bilinir (3). M-*BCR* bölgesi içerisinde yer alan 5 ekzon b1-b5 olarak numaralandırılır. Kırılmaların büyük çoğunluğu ekzon 13 (e13-b2) veya ekzon 14 (e14-b3) kimerik gene katılacak şekilde gerçekleşmektedir (4, 5). Bu kırıklar *ABL1* geni 2. ekzonu ile birleşerek, e14a2 veya e13a2 füzyonlarını meydana getirirler. Her iki durumda da 210 kDa ağırlığında bir füzyon proteini oluşur. KML ve AML hastalarının çok az kısmında görülen diğer *BCR* kırık noktası, minör *BCR* (m-*BCR*) bölgesinde 1’inci ekzondan hemen sonra oluşur. Oluşan hibrid transkript e1a2 içerir ve 190 kDa ağırlığında bir protein kodlar. Üçüncü kırık noktası mikro *BCR* (μ -*BCR*) olarak adlandırılır ve 19’uncu ekzondan (c3) sonra oluşur. Füzyon transkript e19a2 birleşiminden oluşur ve 230 kDa ağırlığındaki p230 *BCR::ABL1* proteinini kodlamaktadır (4).

Farklı kırık noktalarının birleşmesiyle oluşan *BCR::ABL1* füzyonları alternatif tirozin kinaz anlatımlarına neden olmaktadır. Bu nedenle farklı füzyon kırıklarının KML tanı, prognoz ve tedavisinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple çalışmamızda, KML hastalarındaki *BCR::ABL1* füzyonlarının karakterize edilmesi ve hastalarda saptanan kırık tiplerinin hastalığın seyri ve tedavi yanıtı ile olan olası ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Kan hücrelerinin yaşam boyunca ve sürekli olarak hematopoetik kök hücrelerden (HSC) oluşmasına hematopoez denir. Kendini yenileyebilen hematopoetik kök hücreler tek bir hücreden farklılaşarak kan hücre serilerini oluştururlar. Kan hücrelerinin erişkin yaşamdaki tek kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler lenfoid ve myeloid seri hücrelerini oluşturmak için yönlendirilirler. Lenfoid hücrelerden, B-hücreleri, T-hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) oluşurken, miyeloid hücrelerden, granülositler (nötrofil, eozinofil, bazofil), monositler, makrofajlar, plateletler ve kırmızı kan hücreleri oluşmaktadır.



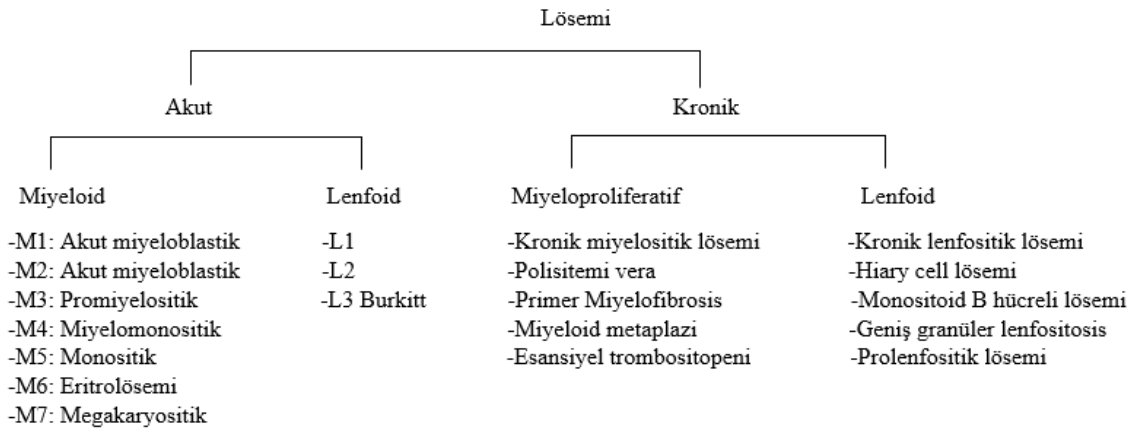
Şekil 1: Hematopoez (6).

2.2. Lösemiler ve Miyeloproliferatif Hastalıklar

HSC'lerden oluşan olgun progenitör hücreler farklılaşıp tüm kan hücrelerini oluşturma yeteğine sahiptir. Lösemiler anormal farklılaşma veya hücre döngüsünde duraksama ile karakterize bir proliferasyon bozukluğu olarak tanımlanabilir.

Olgunlaşmamış hücreler hızla bölünür, kemik iliği ve kanda birikir. Lösemilerde normal farklılaşma yolu, hücrelerin çoğalmaya devam ettiği bir farklılaşma aşamasında bloke edilir ve çoğu hücre terminal farklılaşmaya geçemez (7). Bunun sonucunda farklı lösemi tipleri oluşur (Şekil 2). Akut lösemilerde olgunlaşmamış blast hücreleri sağlıklı kan hücrelerinin yerini alır ve miyeloid ya da lenfoid seri hücrelerinden kökenlenebilirler. Kronik lösemiler ise farklılaşmanın bozulduğu hücre serisine göre miyeloid ya da lenfoid hücrelerden kaynaklanabilirler.

Kronik miyeloproliferatif hastalıklar (CMPD), periferik kanda olgunlaşmamış yada olgun ama artmış sayıda olan hücreler ve kemik iliğinde miyeloid hücre serisinden bir kaç hücre ya da bir hücrede proliferasyon ile karakterize olan klonal hematopoetik kök hücre bozukluklarıdır (8). CMPD'ler polisitemia vera (PV), esansiyel trombositopeni (ET), idiyopatik miyelofibrosis (IMF), KML ve kronik nötrofilik lösemi (KNL), hipereozinofilik sendrom ve kronik eozinofilik lösemi gibi nadir alt tipleri içerir (Şekil 2). Bu hastalıklar, atipik KML (aKML) ve kronik miyelomonositik lösemi (KMML) gibi miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalıklar (MDS / MPD'ler) ile örtüşmektedir (8).



Şekil 2: Lösemilerin sınıflandırılması (7)

2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

KML, kronik miyelositik lösemi ya da kronik granülositik lösemi, miyeloid öncül hücrelerin anormal klonal çoğalması ile kendini gösteren bir kök hücre hastalığı olarak tanımlanır (3). KML hastalarında yeterince olgunlaşmamış öncül hücreler artmış proliferatif kapasiteleri sayesinde kemik iliği ve kanda sayıca artarlar.

Aynı zamanda apoptoz ve hücre sinyal iletim yolları gibi homeostazda önemli hücresel aktivitelerdeki bozulmalar da kanserleşmeye katkıda bulunmaktadır. KML sadece miyeloid hücrelerde değil, aynı zamanda periferik kandaki eritroid hücrelerde ve trombositlerde artışa ve kemik iliğinde belirgin miyeloid hiperplaziye neden olur (9).

KML hastalarının %99'unda Ph kromozomu olarak adlandırılan 9.kromozom ve 22. kromozomda *BCR* ve *ABL1* genleri arasında gerçekleşen resiprokal translokasyon ile oluşan füzyon geni mevcuttur. KML'nin patogenezi oluşturarak, *BCR::ABL1* proteinin yapısal olarak aktif tirozin kinaz aktivitesidir. *BCR::ABL1* füzyonunun varlığı, artmış hücre büyümesi, apoptozun inhibisyonu, değişmiş hücre yapışması, büyüme faktörlerinden bağımsızlık, genomik denetim ve farklılaşmanın bozulması gibi hücresel sorunlara yol açar (10).

KML ilk olarak İskoçya'da John H. Bennett ve Almanya'da Rudolph Virchow tarafından tanımlanmıştır. 1890'larda kan boyama tekniklerinin uygulamaya koyulması, granülosit ve lenfositler arasında daha kesin bir morfolojik ayrıma ve dolayısıyla KML'nin daha iyi karakterizasyonuna imkan sağlamıştır (11).

Daha sonraki yüzyıllarda hastalığın evrimi ve klinik özellikleri tanımlanmıştır. Minot ve ark. yaşı prognostik faktör olarak tanımlamıştır ve günümüzde yaş, tedaviye rehberlik etmek için kullanılan Sokal ve Hasford skorlama sistemlerinde hala önemli bir prognostik faktördür. 1951'de Dameshek KML biyolojisinin anlaşılmasına, onun esansiyel trombositopeni, PV, idiyopatik miyeloid metaplazi ile birlikte miyeloproliferatif sendromların içinde olmasını önererek aydınlatıcı katkılar yapmıştır (11). 1960'ta Nowell ve Hungerford, kronik granülositik lösemili yedi hastanın lösemi hücrelerinde küçük bir anormal akrosentrik kromozomun varlığını rapor etmişlerdir (12). Bu kromozom Y kromozomuna benzediğini ancak hastaların ikisinin kadın olduğunu belirtmişlerdir. Lösemi olmayan hücreler incelendiğinde ise normal karyotipler gözlenmiştir. Bu gözlem başkaları tarafından hızla doğrulanmıştır (13). Bu, herhangi bir insan malignitesi biçimindeki ilk tutarlı sitogenetik anormallikti ve bu kromozom Ph kromozomu olarak adlandırılmıştır. 1973'te sitogenetik teknolojisi, özellikle kinakrin floresansının ve Giemsa bantlamanın tanıtılması önemli bir adım olmuştur. Chicago'da Janet Rowley kromozom 22'nin uzun kolunun kısaltıldığını (22q-) ve kromozom 9'un uzun kolu üzerinde ek materyalin varlığını gözlemlemiştir. Böylece Ph kromozomunun 9. ve 22. Kromozomları içeren dengeli bir translokasyon ile oluştuğu sonucuna varılmıştır (14).

BCR::ABL1 füzyon geninin tanımlanması için başlangıç noktası, farelerde lenfosarkomu indükleyebilen bir murin virüsünün Abelson tarafından izolasyonu (15), ve ardından *Abl* onkogen veya *v-abl* açıklaması olmuştur (16). Daha sonra Ph kromozomunun, kromozom 9'dan kromozom 22'ye translokasyon sonucu oluştuğu anlaşılmıştır (14). Witte ve arkadaşları ABL proteininin anormal boyutta olduğu ve büyük ölçüde artmış tirozin kinaz aktivesine sahip olduğunu göstermişlerdir ve bu durumun artmış enzimatik aktivite ile sonuçlanan yapısal anormallik olduğunu, KML patogenizinde önemli rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir (17). Daha sonra *BCR* ve *ABL1* dizilerinin bir füzyon transkripti oluşturmak üzere birleştiği gösterilmiştir (18).

KML'nin daha da açıklığa kavuşması için, *BCR::ABL1* füzyonunun tek başına KML fenotipini indükleyip indüklemediğini belirlemek oldukça önemliydi. 1990'da Daley ve arkadaşları retroviral aracılı gen transferini kullanarak *BCR::ABL1* genini murin hematopoietik kök hücrelerine entegre ettiler ve hayvanların çoğunda insanda görülen KML'ye benzer bir hastalığın oluştuğunu gözlemlediler (19).

Tablo 1: KML biyolojisinin anlaşılmasındaki önemli aşamalar (20).

1845	Lösemnin (muhtemelen KML) bir hastalık varlığı olarak tanınması
1846	Yaşayan bir hastada lösemnin ilk tanısı
1880ler	Kan hücrelerini boyamak için metodların geliştirilmesi
1951	Dameshek'in miyeloproliferatif bozukluklar kavramını tanıtmaları
1960	Philadelphia kromozomunun tanımlanması (-22q)
1973	(9;22) translokasyonunun resiprokal doğasının tanınması
1984	Kromozom 22 üzerindeki breakpoint cluster region (<i>BCR</i>) tanımlanması
1985	P210 <i>BCR::ABL1</i> ve <i>BCR::ABL1</i> füzyon geninin tanımlanması
1990	<i>BCR::ABL1</i> geninin farelerde KML benzeri bir hastalığı indükleyebileceğinin gösterilmesi
1996	<i>BCR::ABL1</i> kinaz aktivitesinin seçici engellenmesinin gösterilmesi
1998	<i>BCR::ABL1</i> kinaz aktivitesinin bloke edilmesinin KML'nin özelliklerini tersine çevirdiğinin gösterilmesi
2001	<i>ABL1</i> kinaz alanındaki rastgele olmayan mutasyonların belirlenmesi

KML, her yıl her 100.000 insanda 1-2 yeni vaka görülen düşük insidansa sahip bir hastalıktır. Ancak, son 10 yılda tedavisindeki önemli iyileşme nedeniyle prevalansı artmaktadır. Bu durum, KML'li hastaların yaş eşleştirilmiş sağlıklı popülasyondakiler ile karşılaştırılabilir sağ kalım oranlarına ulaşmasını sağlamıştır. KML, yetişkin lösemilerinin %15-20'sini oluşturur (21). Bu hastalık hafif bir erkek üstünlüğü ile her iki cinsiyeti de etkilemektedir. İyonize radyasyon maruziyeti ve ailesinde miyeloproliferatif bozukluk olduğu bilinen kişilerde artmış KML riski bulunmaktadır (11).

2.2.2. KML'nin Klinik Özellikleri ve Evreleri

KML, tüm yaş gruplarında var olabilir fakat en sık 40-50 yaş aralığında görülür ve nadiren çocuklar da etkilenir. Pek çok hasta, pluripotent HSC'lerdeki defektin varlığı ile tutarlı bir trombositosa sahiptir. Hastalığın tipik semptomları; yorgunluk, iştahsızlık ve kilo kaybıdır. Bununla birlikte hastaların yaklaşık %40'ı asemptomatiktir ve bu hastalarda teşhis yalnızca anormal kan sayımına dayanır (9) (Tablo 2).

Tablo 2: KML hastalarında sık görülen klinik bulgular (9)

Klinik Bulgular
Yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı Splenomegali Hepatomegali
Periferik Kan Bulguları
Yükselmiş beyaz hücre sayısı (genellikle 25,000/mm ³ 'ten daha fazla) Yükselmiş trombosit sayısı (vakaların %30-50'sinde) Bazofili Azalmış lökosit alkalın fosfataz aktivitesi Granülosit farklılaşmasının tüm aşamalarının periferik yaymada görülmesi
Kemik İliği Bulguları
Artmış hücre sayısı, azalmış yağ içeriği Miyeloid hücrelerin eritroid hücrelere oranının artması Artan sayıda megakaryosit Blastların ve promiyelositlerin tüm hücrelerin yüzde 10'undan azını oluşturması

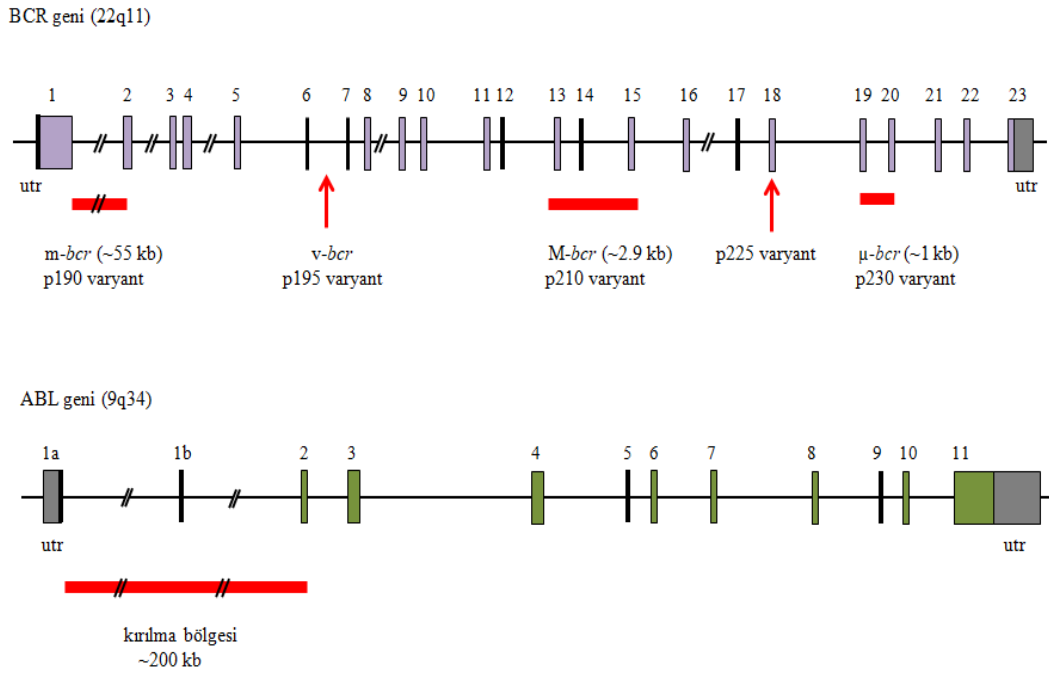
Hastalığın klinik seyrinde 3 evre bulunmaktadır. Hastalığın pek çoğunun tanınanını oluşturan kronik evre, hastalarda beyaz hücre sayısı artışıyla birlikte kemik iliğinde miyeloid proliferasyonun olduğu, genellikle komplikasyonların çok az görüldüğü ya da görülmediği evredir. Bu aşamada pek çok hasta lösemi hücrelerinin sayısını azaltan standart tedavilere yanıt verir. Kemik iliği ya da kan örneğindeki blast hücre sayısı %10'un altında olan hastalar kronik faz olarak sınıflandırılabilir. Hastalık tedavi edilmediğinde ya da tedaviye yanıt alınmadığında ilerler ve akselere faza geçer. Bu evrede hastaların periferik kan ya da kemik iliğinde blast hücre sayısı %10-20 olarak tanımlanır. Akselere faz KML hastalarının kan hücrelerinin yaklaşık %20'sini bazofiller oluştururken %30'unu promiyelositler ve blast hücreleri oluşturur. 3 evre olan blastik faz, diğer adıyla blastik krizde ise kan ya da kemik iliği hücrelerinde blast hücrelerinin sayısı %20'den fazladır ve blast hücreleri diğer organ ve dokularda görülür (10). KML bu evrede akut lösemilere benzer davranır. İlerlemiş hastalıkta lösemik hücreler terminal farklılaşmaya girme yeteneklerini kaybettikleri için olgun granülosit oluşumunun yerine ilkel hücreler yayılmaya başlar. Bununla birlikte *BCR::ABL1* dışındaki genlerdeki mutasyonlar blastik kriz oluşumunu takiben yaygın olarak görülür (10). Tüm hastalarda adım adım bu ilerleyiş görülmez ve blastik kriz kronik fazın dışında birden gelişebilir ya da tanıda var olabilir. Tedaviye yanıt ya da tam sağ kalım ilerlemiş KML fazında nispeten zayıftır (11).

2.2.3. t(9;22) *BCR::ABL1* Philadelphia (Ph) kromozom

t(9;22)(q34;q11), 22. Kromozomun q11 bandunda bulunan *BCR* (Breakpoint Cluster Region) geni ve 9. kromozomun q34 bandında bulunan *ABL1* (V-Abl Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1) geni arasındaki resiprokal translokasyon sonucu oluşur. Böylece defektif ve diğer iki kromozomdan daha kısa Ph kromozomunu üretilir. Ph kromozomu, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) (çoğunlukla B hücreli ALL, nadiren T hücreli ALL), Akut Miyeloid Lösemi (AML), Kronik Nötrofilik Lösemi (KNL), ve karışık fenotip akut lösemi (MPAL) dahil olmak üzere diğer bazı lösemilerle birlikte KML'nin ayırt edici özelliğidir (22).

Bu translokasyon sonucu oluşan *BCR::ABL1* füzyonu onkojeniktir. Ancak onkojenik etkileri hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

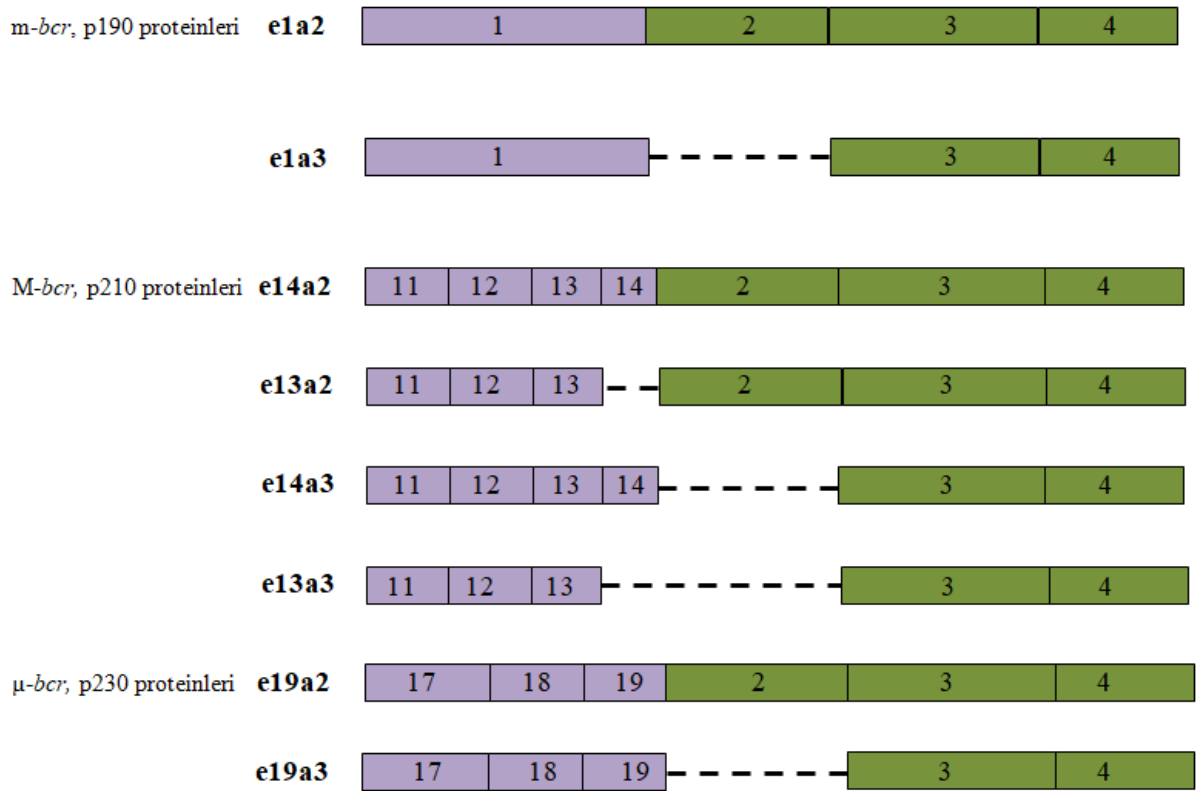
BCR::*ABL1* füzyonu, tirozin kinaz alanından anormal şekilde artan sinyallemeye neden olur, bu da lösemik hücrelerin çoğalmasına ve hayatta kalmasına yol açar (17). *ABL1* geni yaklaşık 200 kilobazlık bir kırılma bölgesi içerirken, *BCR* geni, M-BCR, m-BCR ve μ -BCR olarak adlandırılan 3 kırılma bölgesi içerir. *BCR* ve *ABL1* genlerindeki bu çoklu kırılma bölgeleri farklı transkriptlerin oluşmasına yol açar. Böylece 185 kDa'dan 230 kDa'a kadar farklı büyüklüklerde proteinler oluşabilir (Şekil 3).



Şekil 3: *BCR* ve *ABL1* genlerinin ekzonlarının yapısı ve kırık bölgeleri (23).

Ph kromozomu pozitif KML hastalarının %95'inde kırılmanın meydana geldiği bölge olan M-BCR bölgesinin e12-e16 olarak adlandırılan 5 ekzonu (b1-b5) vardır. Kırılmaların büyük çoğunluğu 13. ekzon (e13-b2) veya 14. ekzon (e14-b3)'da kimerik gene katılacak şekilde bu ekzonlardan sonraki intronlarda gerçekleşmektedir (5). Bu kırılmalar, *ABL1* geni 2. ekzonu ile birleşerek, b3a2 (e14a2) veya b2a2 (e13a2) kimerik alttipleri meydana getirirler. b3a2 alt tipi 14. ekzonu içerdiği için b2a2'den 75 bp daha uzundur. Her iki durumda da 210 kDa ağırlığında bir füzyon proteini oluşur. KML ve AML hastalarının çok az kısmında görülen diğer *BCR* kırık noktası m-BCR bölgesinde 1. ekzondan hemen sonra oluşur. Buradan kırılan parçanın, *ABL1* geni ekzon 2 ile füzyonu sonucu e1a2 transkripti oluşur ve 190 kDa ağırlığında bir proteini kodlar (4).

Diğer kırılma bölgesi ise mikro *BCR* (μ -*BCR*) olarak adlandırılır ve 19. ekzondan (c3) sonra oluşur. Hibrid transkript e19a2 birleşiminden oluşur ve 230 kDa ağırlığındaki p230 *BCR::ABL1* proteinini kodlamaktadır (4). Tüm bu kırıklara ek olarak *BCR* ekzonları ile *ABL1* geni ekzon3 (a3) arasında füzyon oluşumu sonucunda daha nadir alternatif kırık tipleri de görülebilir (Şekil 4).



Şekil 4: *BCR::ABL1* füzyonları (23)

2.2.4. Kronik Miyeloid Lösemi'nin Moleküler Biyolojisi

2.2.4.1. *ABL1* Geni, Yapısı ve Fonksiyonu

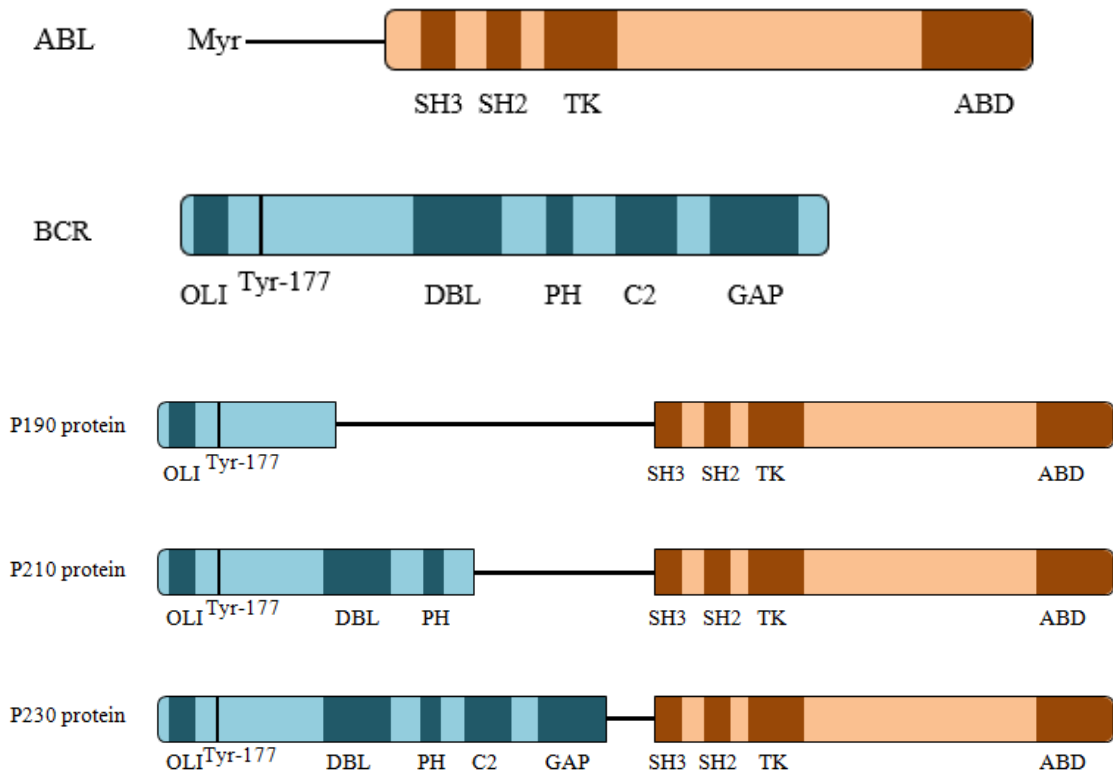
ABL1 geni 9q34.12'de lokalize ve 12 ekzonu olan bir gendir. Hematopetik gelişim boyunca mevcut olan ve miyeloid hücrelerin olgunlaşması sırasında azalan seviyeleri ile her yerde ifade edilen bir gendir. *ABL1* proteini 145 kDa ağırlığında, çoğunlukla nükleer lokalizasyona sahiptir. Fakat hematopoetik hücrelerde genelde sitoplazmada bulunur. Ayrıca sıkı bir şekilde düzenlenen reseptör olmayan tirozin kinazdır. *ABL1* sitoplazmada, çoğunlukla aktine bağlı ve hücre iskeleti modülasyonu ve sinyali ile ilişkili fonksiyonlarda bulunur. Nükleer *ABL1* hücre döngüsü kontrolünde yer alır. *ABL1*'in N-terminali *ABL1* kinaz aktivitesini negatif olarak regüle eder (24).

ABL1 proteini uzun bir lipid zinciri, miristat (Myr), kendini engelleme kapasitesi sağlayan Src homolojisinin SH2 ve SH3 domainleri, prolinden zengin bölgelerle ve fosforile tirozinlerle etkileşimlere izin veren bir tirozin kinaz domaini (KD) ve son olarak β -aktin ve DNA'ya bağlanan bir aktin bağlanma bölgesi (ABD) içerir. *ABL1*, epidermal büyüme faktörü reseptörü, trombosit türevli büyüme faktörü beta reseptörü ve kas spesifik tirozin kinaz reseptörü gibi reseptörleri fosforile ederek (25) yapışma, polarite, hücre göçü ve hücrel çıkıntılar gibi hücre iskeleti dinamiklerinde, ayrıca proliferasyon, hücre sağkalımı, membran transportu ve otofaji gibi hücrel süreçlerde görev alır (26).

2.2.4.2. BCR Geni, Yapısı ve Fonksiyonu

BCR geni 22q11.23'de lokalize ve 23 ekzona sahip bir gendir. Her ikisinin de çeşitli temel biyolojik süreçlerde yer aldığı çoklu fonksiyonel alanlara sahip iki ana proteini kodlayan karmaşık bir lokustur. Bu biyolojik süreçler; G-protein sinyal yolağı, hücre iskeleti organizasyonu, büyüme ve gelişmedir (24). *BCR*-tirozin kinaz domaininin kesin rolü belirsizdir fakat lökomogenezde işlevsel rol oynayabileceği düşünülmektedir (27, 28).

BCR geninin translasyonu sonucu üretilen protein 160 kDa ağırlığındadır ve serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. *BCR* proteini, bir oligomerizasyon alanı (OLI) içerir (4). Bu alandaki mutasyonlar, *BCR::ABL1* proteininin tirozin kinaz aktivitesinde bir azalmaya neden olur ve *BCR* ile *BCR::ABL1* proteinlerinin etkileşimini engeller. Ayrıca protein DBL'ye [guanozin trifosfattan (GTP) guanosin difosfat değişim faktörü (GDP)] bir homoloji domainine, bir plekstrin homoloji alanına (PH), kalsiyum bağımlı fosfolipidlerin bağlanması için bir C2 domainine ve son olarak Rac proteinlerine bağlanmak için GTPaz (GTPaz aktive edici protein) domainine (GDP ve fosfat iyonunda GTPaz hidrolizi) sahiptir (29) (Şekil 5). *BCR* geninin 1.ekzonu tüm füzyonlara katılır ve buradan kodlanan, dimerizasyon ve otofosforilasyonu kolaylaştıran oligomerizasyon alanı (OLI, coiled-coil domain), fosforile olduğunda adaptör protein GRB-2 için bir yerleştirme bölgesi olarak çalışan Tirozin-177 ve bir tirozin kinaz domaini, ekzon1'de tutarlı bir şekilde korunmuştur (28). *BCR::ABL1* füzyonlarına katılan *BCR* ve *ABL1* protein domainleri transkript tipine göre farklılık göstermektedir. p190, p210 ve p230 füzyon proteinlerinin domain yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: ABL1 ve BCR proteinlerinin domainlerinin şematik gösterimi ve p190, p210 ve p230 füzyonlarına ait protein domainleri (24).

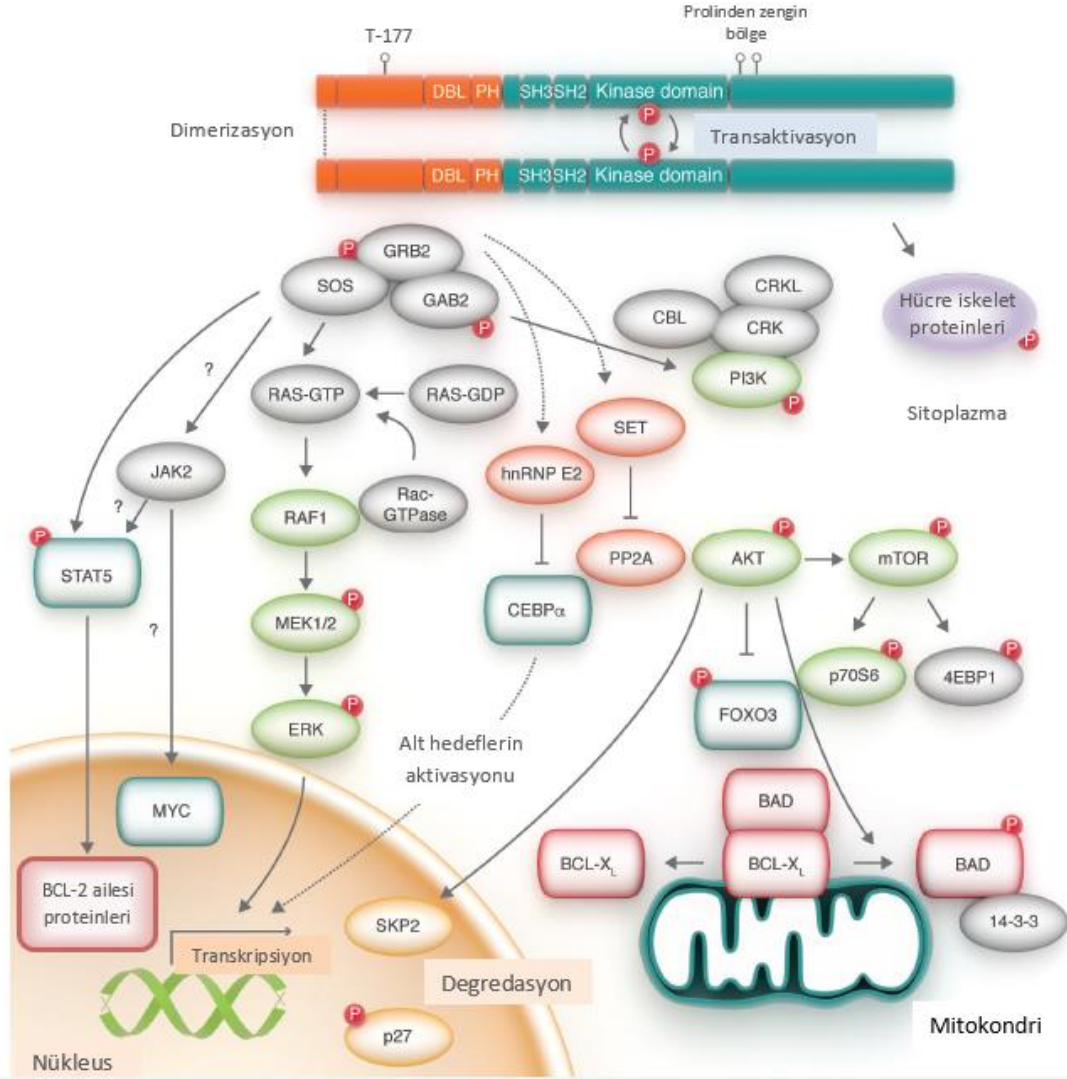
2.2.4.3. BCR::ABL1 Füzyonun Etkilediği Sinyal Yolakları

BCR::ABL1 proteini, hücre sinyal yolaklarının anormal aktivasyonuna ve lösemiye destekleyen hücrel bir ortam oluşmasına yol açar. Bu atipik yol aktivasyonu, büyüme faktörü bağımlılığı, apoptoz, proliferasyon ve hücre yapışmasındaki değişikliklerle ilişkilidir.

Tüm BCR::ABL1 füzyon proteinleri, hiperaktif bir ABL1 kinaz domaini oluşmasına ve çeşitli hedeflerde anormal fosforilasyona sebep olur (10). Aktivasyon, ABL1'in N-terminal regülör bölgesinin kaybı ile otoinhibisyonun eksikliğinden ve füzyon proteininin homodimerizasyonu ve otofosforilasyonundan kaynaklanır (30). Tirozin kalıntıları üzerindeki hücrel proteinlerin fosforilasyonu, birçok büyüme faktörü reseptörü tarafından kullanılan hücre içi sinyal iletiminin önemli bir mekanizmasıdır. Tirozin kinazların aktivitesi, tirozin fosfatazların aktivitesi ile dengelenir. Yapısal olarak aktif bir tirozin kinazı eksprese eden hücrelerde, bu sıkı düzenleme zayıflar ve kronik büyüme faktörü stimülasyonuna benzeyen bir duruma yol açar (31).

Bunun sonucunda hücre içinde pek çok sinyal iletim yolu etkinleşir. *BCR::ABL1* kinaz aktivitesi *PI3K*, *AKT*, *MTOR*, *RAS*, *EGFR*, *MAP-kinaz*, *JNK/SAPK*, *JAK1-3*, *SRC*-ailesi kinazları *LYN*, *HCK*, ve *FGR*, *PTPN11*, NF-kB, fosfolipaz C ve bu yolakların pek çoğunun ortak bir alt efektörü olan *STAT5*' i içeren çoklu yolakların direkt ve indirekt aktivasyonuna yol açar (24).

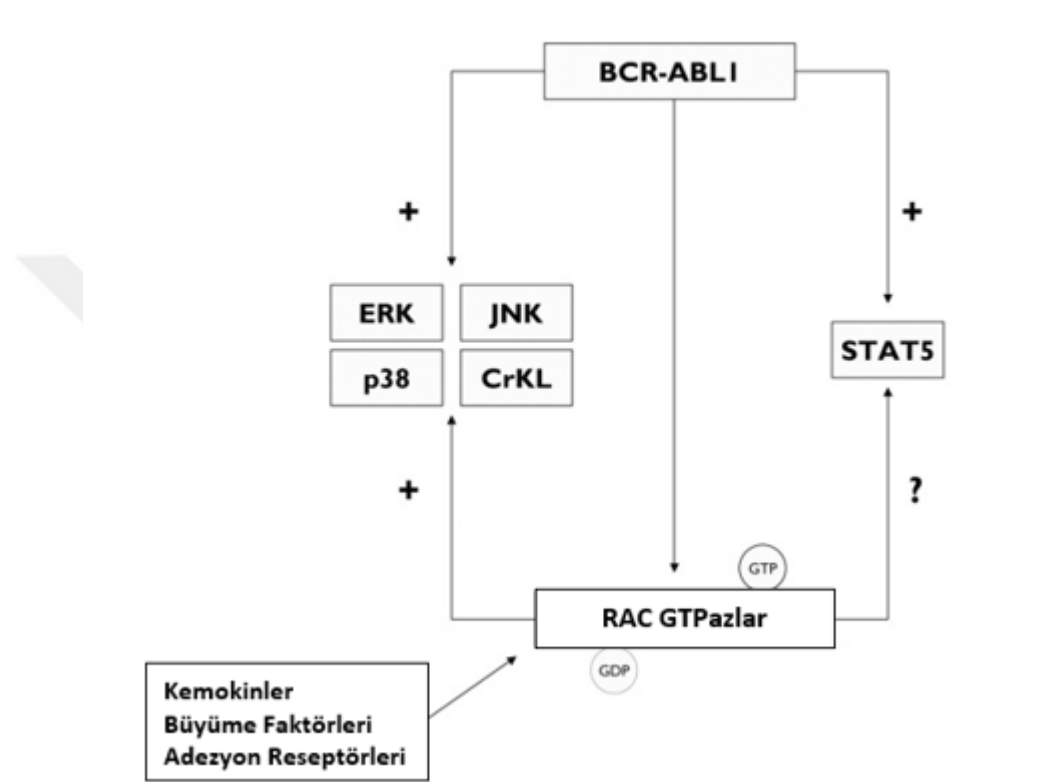
MYC, *RAS*, fosfatidil inositol 3' kinaz (*PI3K*), *JAK/STAT* ve hücre iskeleti proteinleri, *BCR::ABL1* tarafından aktive edilen yollar veya önemli aşağı akış araçları olarak tanımlanmıştır (32). *BCR-Tyr-177*'nin fosforilasyonu *BCR::ABL1* aracılı lökomogenez için esastır (33). *BCR*'ın fosforile olmuş *Tyr-177* kalıntısı, *GRB2* ile ilişkili bağlayıcı protein 2'yi (*GAB2*) ve ayrıca *SOS*'u (*RAS*'in bir guanin-nükleotid değiştiricisi) bağlayan büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (*GRB2*) için bir yerleştirme yeri olarak hizmet eder. Bu da *RAS-MAPK* aktivasyonu ve *BCL-2* gen transkripsiyonu ile sonuçlanır. *BCR::ABL1* aracılığıyla fosforilasyon üzerine, *GAB2*, *AKT*'yi aktive eden fosfatidilinositol 3- kinazı çağırır. *AKT* aktivasyonu, *MYC* geninin transkripsiyonunun artmasıyla sonuçlanır. Bunun sonucunda *MYC* proteini stabilize halde kalır. *BCR::ABL1* ayrıca hem direkt hem de indirekt olarak *HCK* ve *LYN SRC* kinazları ve *JAK2*'nin aktivasyonu aracılığıyla *STAT5*'i aktive eder. Sonuç olarak *BCL-X* genin transkripsiyonu gerçekleşir. Tüm bunların aksine, *BCR::ABL1* bilinmeyen bir mekanizma aracılığıyla interferon konsensus dizisi bağlayıcı proteinin (*ICSBP*) transkripsiyonunu iptal eder. Böylece *BCL-X* ve *BCL-2* gen transkripsiyonunun *ICSBP*-aracılı inhibisyonu serbest bırakılır ve miyeloid progenitörlerde artmış sağ kalım gözlemlenir (34). *CRKL* ve *CBL*, *BCR::ABL1*'in doğrudan substratlarıdır. Tüm bunlara ek olarak *BCR::ABL1* ile sinyal proteinleri arasında etkileşimde olan çok fazla molekülün olduğu ve oldukça karmaşık bir yapıda olduğu unutulmamalıdır (Şekil 6).



Şekil 6: *BCR::ABL1* yapısı ve kronik miyeloid lösemi (KML) hücrelerinde aktive olan moleküler sinyal yolları (32).

BCR::ABL1 ayrıca, *SRC* ailesi kinazları (SFKlar) *FGR*, *LYN* ve *HCK*'yi fosforile eder. Fosforile olmuş *HCK*, hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesine yol açan ve siklin-D1'i upregüle eden *STAT5* kuvvetlendirir (35). Ayrıca, transkripsiyon faktörü ICSBP tarafından baskılanan antipoptotik protein *BCL-X*, *STAT5* tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilir (36). Guanozin trifosfatazların (GTPazlar) *RAC* alt ailesi, *RAC1*, *RAC2* ve *RAC3*'ü kapsar ve birçok hücre fonksiyonunu modüle eder. *RAC* GTPazlar primer KML hücrelerinde aktive edilir ve *BCR::ABL1* tarafından aktivasyonları düzenlenir (37).

KML progenitörlerinde *RAC* GTPazları hücre yanıtlarını koordine etmek için sinyal kemokinlerini, büyüme faktörlerini ve yapışma reseptörlerini entegre eder. Aynı zamanda *RAC* GTPazlar *STAT5* fosforilasyonuna da aracılık edebilir (34).



Şekil 7: *BCR::ABL1* kinaz, *RAC* guanozin trifosfatazların (*RAC* GTPazlar) ve diğer sinyal molekülleri ile etkileşimi (34).

JUNB, miyeloid hücrelerde tümör supresör olarak fonksiyon gösteren transkripsiyon faktörleri aktivatör protein 1 ailesinin bir komponentidir. *RAS*, downstream hedef *JUN*'u antagonize eder, böylece hücre proliferasyonunu ve sağ kalımı engeller (38).

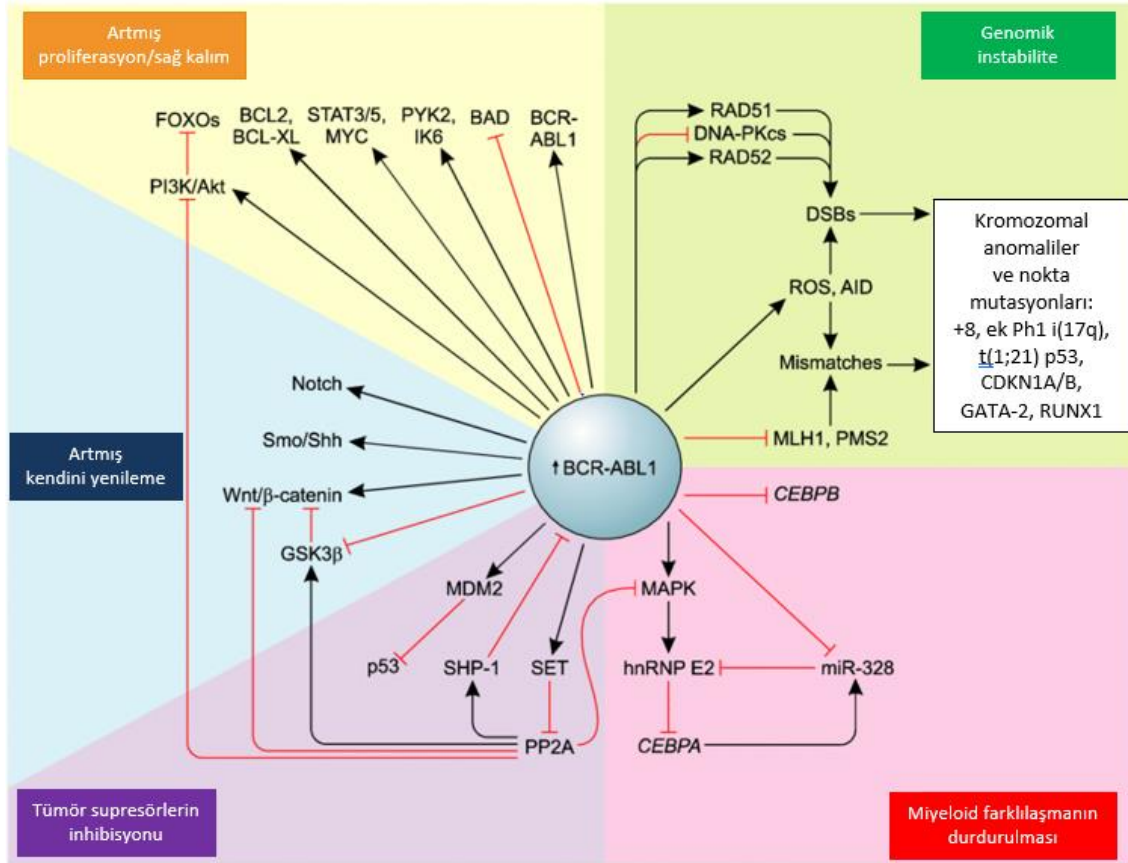
Tyr-177'nin fenilalanine mutasyonu (Tyr177Phe), *GRB2* bağlanmasını ortadan kaldırır ve *BCR::ABL1* kaynaklı *RAS* aktivasyonunu azaltır (39). *BCR::ABL1*'in, *GAB2*^{-/-} farelerden elde edilen primer miyeloid hücreleri dönüştürmede başarısız olduğu gözlenmiştir (40).

İlginç olarak, MEK-ERK aktivasyonunun ise kronik fazda sitokin bağımlı olduğu fakat blastik faz KML’de yapısal olarak aktif hale gelip CD34+ progenitörlerinde kolaylıkla saptandığı bildirilmiştir (41). Ancak, *BCR::ABL1* aracılı lökomogenezde *STAT5*’in rolü tartışmalıdır. *BCR::ABL1*’in kemik iliği içine retroviral transdüksiyonu *STAT5a*^{-/-}*STAT5b*^{-/-} farelerde KML benzeri bir MPD indüklediği görülmüştür (42). Primer KML örneklerinde siRNA ile *STAT5*’in inaktivasyonu Ph⁺ koloni oluşumunu bozduğu belirtilmiştir (43).

ICSBP, granülosit farklılaşmasının negatif düzenleyicisidir. ICSBP^{-/-} ve ICSBP^{+/-} fareler bir KML benzeri MPD olarak ortaya çıkan düzensiz hematopoez sergilediği belirtilmiştir (44). ICSBP’nin zorunlu ekspresyonu, in vivoda *BCR::ABL1* ile indüklenmiş KML benzeri hastalığı baskıladığı gözlemlenmiştir (45).

Miyeloid soyda özellikle *JUNB* eksik transgenik fareler blastik faza ilerlemeyi de içeren insan KML’sine oldukça benzeyen bir MPD geliştirmişlerdir. Dahası, hastalanmış farelerden alınan sadece *JUNB*-eksikliği olan uzun süreli kendini yenileyen HSC’ler transplantasyondan sonra alıcı farelerde KML benzeri hastalık indüklediği gözlenmiştir (46).

Tüm bu *BCR::ABL1*’in kontrol ettiği hücre içi moleküler mekanizmalar KML hastalığının ilerlemesine yol açan potansiyel sinyal yollarıdır. KML hücreleri bu sinyal moleküllerinin kontrolündeki farklılıklar aracılığıyla hastalığın ilerlemesini sağlayabilir. Artan *BCR::ABL1* miktarı, hayatta kalma yollarının arttırılması, artan genomik kararsızlık, miyeloid farklılaşmanın durdurulması, kendi kendini yenileme yeteneğinin kazanılması ve geniş hücre düzenleyici fonksiyonlara sahip tümör baskılayıcıların inhibisyonu yollarıyla KML progresyonunu kontrol eder (47). Şekil 8’de KML hücrelerinin sinyal yolları aracılığıyla hücre içi dinamikleri genel olarak nasıl yönettiği gösterilmiştir.



Şekil 8: KML progresyonunda yer alan sinyal molekülleri ve değişimler (47).

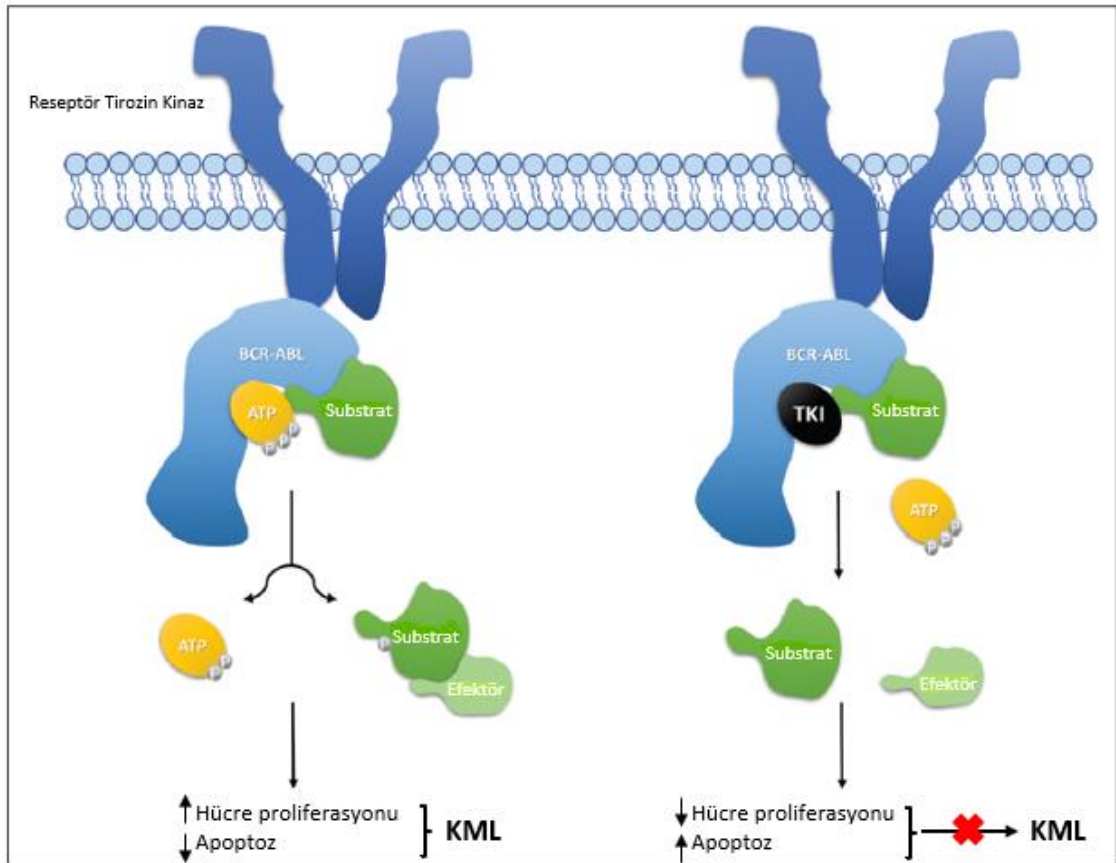
2.2.5. Kronik Miyeloid Lösemi’de Tedavi ve İlişkili Direnç Mekanizmaları

2.2.5.1. KML’de Tedavi ve Tirozin Kinaz İnhibitörleri

1960’larda KML, busulfan ve hidroksiüre kullanılarak kemoterapi ile tedavi edilmekteydi. 1970’lerde ise KML tedavisinde iki farklı terapötik strateji ortaya çıkmıştır. Bunlar; allojenik kök hücre nakli ve interferon-alfa kullanımıdır (48). 2001 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKI) imatinib (Gleevec®) (49) kullanılarak yeni bir tedavi onaylanmıştır. TKI’ler, ilk kez hedefe yönelik tedaviyi mümkün kılarak KML’de büyük bir ilerlemeyi temsil etmektedir (29).

Kinazlar ATP’den fosfat gruplarını spesifik protein veya lipid substratlarına aktararak hücre sinyalleme sisteminin düzenlenmesini sağlarlar. Tirozin kinazların aktif bölgeleri, substratın katalitik bölgeye erişimini kontrol eden aktivasyon döngüsü (A-döngüsü), adenosin trifosfat (ATP)-bağlama halkası ve ATP’ye bağlı bir magnezyum iyonunu koordine eden yüksek oranda korunmuş aspartat fenilalanin-glisin (DFG) motifini içeren, anahtar yapısal motiflerin konumu açısından farklı olan 2 konformasyonda bulunur (50).

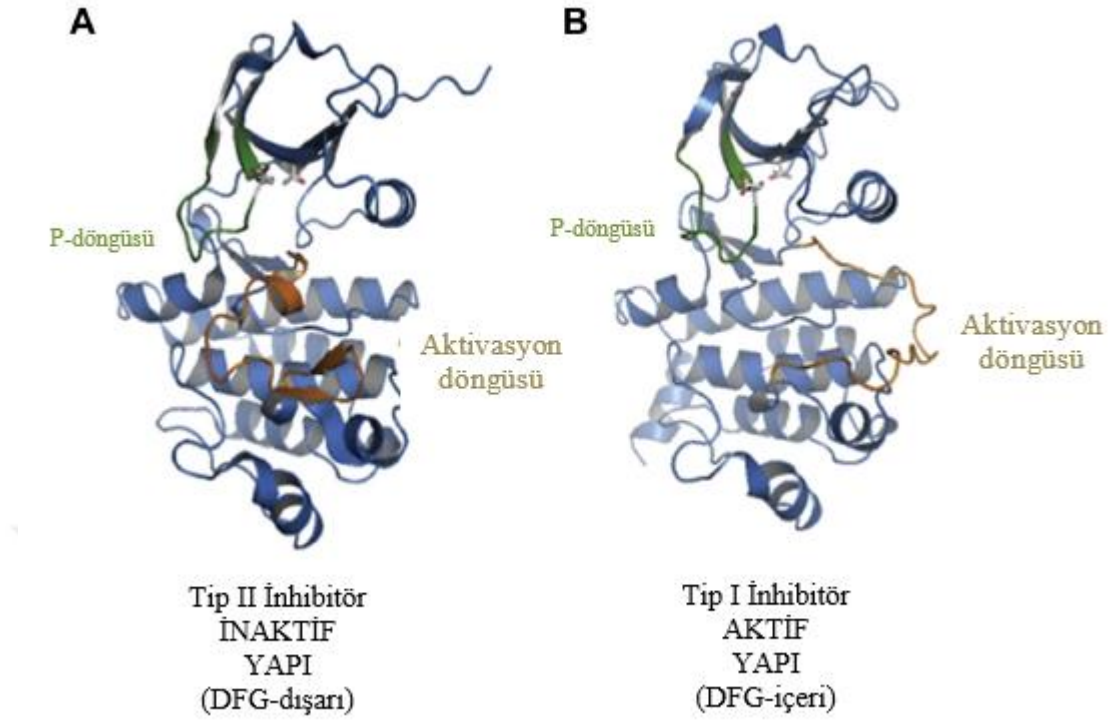
Genel olarak bakıldığında kinaz inhibitörleri, kinaz aktivitesini önlemek için ATP bağlanma bölgesini ya da fosforile proteinin bağlandığı bölgeyi inhibe eder (Şekil 9). Aktif veya inaktif kinaz konformasyon tanımlarına bağlı olarak ise, TKI'ler sırasıyla tip I veya tip II inhibitörler olarak adlandırılır (51). İnaktif konformasyonda aktivasyon döngüsü kapalı yapıdadır ve DFG dışı doğru yönlendirilmedi (DFG-dışarı). Tersine, aktif konformasyonda A-döngüsü açık yapıdadır ve DFG motifi katalitik bölgeye karşı yönlendirilmiştir (DFG-içeri) (Şekil 10) (50). Tip I TKI'ler proteinin tirozin kinaz domaini üzerindeki ATP bağlanma bölgesine bağlanır ve BCR::ABL1 proteininin aktif ve inaktif yapısını hedefler. Tip II inhibitörler ise aktivasyon döngüsü fosforile edilmediğinde uygun ATP bağlanma bölgesindeki bitişik bölgeye bağlanır ve inaktif yapısını hedefler (52). Tüm aktif bölge inhibitörleri ATP ile rekabet halindeyken, tip II inhibitörler, bir inaktif enzim yapısının stabilizörleri olarak düşünülür. Tip I inhibitörleri ise bağlanma için ATP ile daha doğrudan rekabet eder. Bu genel yapısal farklılıkların pratik sonuçları vardır. Belirli bir TKI'ye direnç kazandıran mutasyonların tipi ve sayısı hakkında bilgi verirler. Genel olarak, tip II inhibitörler daha katı bağlanma gereksinimleri sergiler, mutasyona savunmasızlığı daha fazladır, ancak artan seçicilik avantajına sahiptir (53). Tip I inhibitörleri daha rastgele olma eğilimindedir, ancak mutasyonel kaçışa daha az eğilimlidir (50). Onaylanmış *BCR::ABL1* TKI'lerinden, imatinib, nilotinib ve ponatinib tip II inhibitördür, dasatinib tip I inhibitördür ve bosutinib her ikisinin de özelliklerini gösterir (50).



Şekil 9: *BCR::ABL1* ve TKI'lerinin etki mekanizması (54).

Birinci nesil *BCR::ABL1* inhibitörü olan imatinib, ATP'nin bağlanmasını önler ve böylece proteini inaktif formunda bloke eder, otofosforilasyonunu önler ve dolayısıyla substratlarının fosforilasyonunu önler (29). KML'de birinci basamak tedavi yöntemi olarak kullanılır (55). *BCR::ABL1* otofosforilasyonunun yanı sıra *BCR::ABL*-pozitif hücre hatlarının çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (56). İmatinib ile tedavi edilen hastaların %76'sında aynı zamanda tam sitogenetik yanıt olarak da adlandırılan Ph kromozomunun kaybı söz konusudur (29).

Çok hedefli bir ikinci nesil kinaz inhibitörü olarak dasatinib, KML ve Ph (+) ALL'nin imatinib dirençli veya imatinib intoleran formlarının tedavisi için onaylanmıştır (57).



Şekil 10: Tip I ve Tip II inhibitörler (50).

Dasatinib, ATP bağlanma bölgelerine rekabetçi inhibisyonu yoluyla (60), *BCR::ABL1* füzyon proteini, Src ailesi kinazlar, *c-KIT*, *EPHA2*, *PDGFRA* ve ephrin-A reseptörü dahil olmak üzere birçok tirozin kinazı inhibe eder (55). Klinik olarak, dasatinib, imatinibe dirençli KML veya *BCR::ABL*-pozitif ALL hastalarında hem hematolojik hem de sitogenetik yanıtları indükleyebilir (50). Yeni tanı konmuş kronik faz KML hastalarında birinci basamak tedavi olarak imatinib yerine dasatinib kullanımının üstünlüğü de gösterilmiştir (58).

Başka bir ikinci nesil inhibitör olan nilotinib, *BCR::ABL1* kinazını imatinibden daha güçlü ve özgül olarak hedefleyen, rasyonel olarak tasarlanmış bir tirozin kinaz inhibitörüdür (50). Nilotinib, ATP bağlanma bölgesi üzerinde P-döngüsünün katlanması ile, *ABL1* tirozin kinazın aktif olmayan konfigürasyonuna bağlanır, ardından aktivasyon döngüsü, substrat bağlanma bölgesini bloke ederek ATP-fosfat bağlama bölgesini bozar ve enzimin katalitik aktivitesini inhibe eder (55). Nilotinib'in KML'de *BCR::ABL1* mutasyonlarının ortaya çıkışını azalttığı bulunmuştur (59).

Ayrıca, Src ailesi kinaz, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü reseptör kinazları üzerinde de minimal etkiler bildirilmiştir (60).

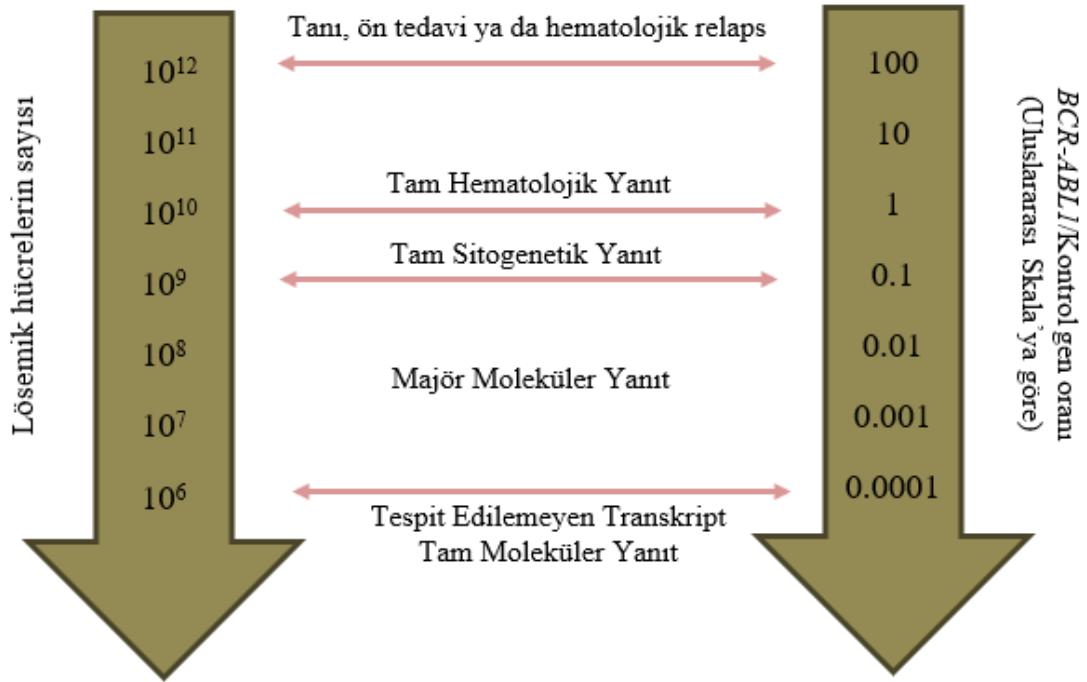
Ponatinib (AP24534), *BCR::ABL1* mutasyonları olan KML hücrelerine karşı güçlü aktiviteye sahip, yeni bir üçüncü nesil TKI'dir (61). Aynı zamanda, onaylanmış *BCR::ABL1* inhibitörleri imatinib, nilotinib ve dasatinib'e direnç sağlayan *FLT3*'e (62) karşı oldukça etkilidir. Ponatinib'in diğer mutasyonlara karşı etki mekanizmasının, bireysel mutasyonların ilacın genel bağlanma afinitesi üzerinde daha az etkiye sahip olması için çoklu temas noktaları oluşturma yeteneği olduğu düşünülmektedir. Ponatinib'in daha önce FGFR (fibroblast büyüme faktör reseptörü) 'lere ve Src-ailesi kinazlarına karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmişti (63). Ayrıca, ponatinibin Hedgehog yolağına karşı inhibitör etkisi, apoptozu indükler ve *BCR::ABL*-pozitif lösemide proliferasyonu azaltır (55).

c-KIT ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörüne karşı minimum inhibitör aktiviteye sahip ve bir Src/Abl kinaz inhibitörü olan bosutinib, nanomolar konsantrasyonlarda *BCR::ABL1* aracılı sinyali inhibe eder (64). Üçüncü nesil TKI'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bosutinibin geniş bir kinaz yelpazesine karşı (EGFR, SRC ve ABL1 ailesi kinazları ve GCK-IV gibi) aktif olduğunu göstermektedir. Bosutinib, ikinci basamak tedavide güvenli bir ilaç olarak kabul edilebilir (55).

Kronik faz KML için standard tedavi TKI'lerin kullanımıdır ve TKI'ler hastalığın kontrol altında tutulmasını sağlar. Yeni tanıda ya da ileri evre KML hastaları rutin olarak ilaç yanıtı açısından (kan sayımı, *BCR::ABL1* miktar tayini gibi), 3, 6, 9 ay olarak değerlendirilmektedir. *BCR::ABL1* miktarı, Q-RT PCR ile takip edilebilir ve gerektiğinde FISH, sitogenetik analiz gibi yöntemlerle desteklenebilir. Tüm bu verilerin ışığında hastalık seyri ve tedavi planması yapılmaktadır. Başlangıç tedavisinde kullanılan imatinib gibi TKI'leri işe yaramamaya başladığında doz arttırımı, diğer birinci nesil TKI'lerin kullanımı ya da ikinci ve üçüncü nesil TKI'lerin kullanımı söz konusudur. Tablo 3'te *BCR::ABL1* inhibitörleri, klinik komplikasyonları ve yan etkileri gibi bilgiler verilmiştir.

Hastalar tedavi yanıtı açısından temelde hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt olarak üç şekilde değerlendirilebilir. Tam hematolojik yanıt; kan değerlerinin ve dalak boyutunun normale dönmesi, lökosit sayısının 10.000/μl'nin altında olması olarak tanımlanabilir. Tam sitogenetik yanıt, sitogenetik teknikler ile yapılan analizler sonrası (karyotip, FISH vs.) *BCR::ABL1* füzyonuna rastlanmamasıdır.

Majör moleküler yanıt (MMY, MY 3.0 veya daha derin yanıt), *BCR::ABL1/ABL1* oranının uluslararası ölçeğe göre $\leq 0,1$ olması olarak tanımlanır. Tam moleküler yanıt ise, ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu sonucu *BCR::ABL1* transkriptinin tamamen yok olmasıdır (3). Bu yanıt türlerinin her biri KML tedavisinde bir kilometre taşını oluşturmaktadır. Lösemik hücre sayısı ve *BCR::ABL1* transkript seviyesi ile tedavi yanıtını arasındaki ilişki Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11: Tedavi yanıtı, lösemik hücre sayısı ve *BCR::ABL1* transkript seviyesi arasındaki ilişki (Baccarani ve ark., 2006)

Tablo 3: 2012’ye kadar FDA tarafından onaylanmış olan *BCR::ABL1* inhibitörleri(55).

İsim	İmatinib	Dasatinib	Nilotinib	Bosutinib	Ponatinib
Alternatif isim	Gleeve STI571 PDGFR	BMS-354825	AMN107 Tasigna	SKI-606	AP2453
Hedef	<i>BCR::ABL1</i> c-KIT	<i>BCR-ABL1</i> Src Ailesi	<i>BCR::ABL1</i> PDGFR	<i>BCR::ABL1</i> Src ailesi	<i>BCR::ABL1</i> FTL3 Src ailesi RET
Klinik komplikasyon	İnferon tedavisi başarısızlığında n sonra KF, AF ve BF KML’ de / Yeni tanı KF	İmatinib intoleransı ya da direncinden sonra KF, AF ve BF KML’ de / Yeni tanı KF	İmatinib intoleransı ya da direncinden sonra KF ya da AF KML’ de / Yeni tanı KF	Önceki KF’ a intolerans ya da dirençten sonra KF, AF ya da KF KML’ de	Önceki TKI KF’ a intolerans ya da dirençten sonra KF, AF ya da KF KML’ de
Yan etkileri	Bulantı, cilt döküntüleri, kusma, hepatotoksisite, diyare, miyalji, kas krampları	Miyelosüpresyon, trombositopeni, i, yapısal şikayetler, elektrolit anomalileri, lökotriki, dönüşümlü akciğer enfeksiyonları, ir pulmoner hipertansiyon	Nazofarenjit, ödem, bulantı, pleural efüzyon, yorgunluk, döküntü, diyare, kusma, abdominal ağrı ve anoreksi, vasküler ve kardiyak hastalıklar, akut pankreatit	Sınırlı diyare, döküntü, kusma, anemi, trombositopeni, nötropeni	Miyelosüpresyon, döküntü, yorgunluk, doz ilişkili pankreatit

2.2.5.2. TKI Direnç Mekanizmaları

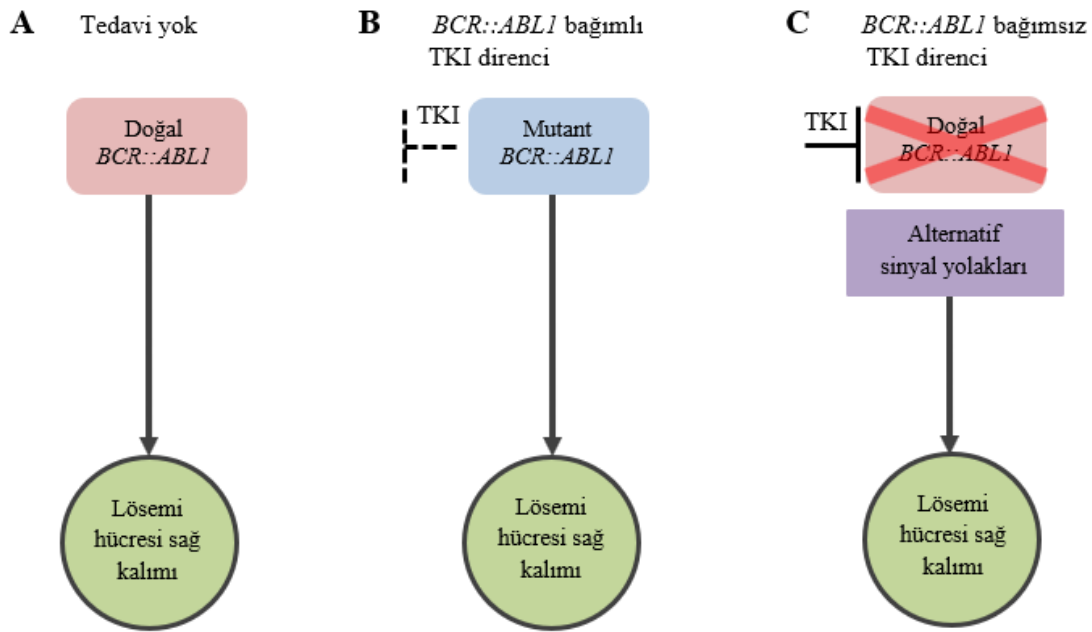
İmatinib KML tedavisinde altın standart olmasına rağmen, hastaların %35-40’ı ilaca direnç geliştirir (65). IRIS çalışmalarında, hastaların %17’si 5 yıllık takipte imatinibe direnç göstermiştir. İlerlemiş fazdaki hastaların pek çoğu hızla tedaviye dirençli hale gelmiştir. Direnç anındaki hasta örnekleri incelendiğinde *BCR::ABL1* kinaz aktivitesinin sıklıkla restore edildiği gözlenmiştir. Bu da imatinibin artık hedefini engelleyemediğini göstermektedir (66).

Periferik kan sayımlarının normalleşmesi, splenomegalinin düzelmesi ve KML ile ilişkili semptomların ortadan kalkması olarak tanımlanan tam hematolojik yanıtın veya tam sitogenetik yanıtın tehsis edilen süre içinde elde edilememesi ya da elde edilen yanıtın kaybolması, TKI direnci olarak tanımlanabilir. Bu yanıtların kaybı ya da herhangi bir zaman noktasında kronik faz KML'den, akselere ya da blastik faza ilerleme TKI direncinin oluştuğunu göstermektedir (50). Bu durum olumsuz klinik durumlarla ilgilidir.

Birincil direnç, TKI tedavisinin başlangıcında tam hematolojik yanıt, tam sitogenetik yanıt ve major moleküler yanıtın zamana bağlı son noktalarına ulaşılamaması anlamına gelirken, ikincil (edinilmiş) direnç, yanıt kaybı olarak tanımlanır (67). Mekanik olarak TKI direnci, *BCR::ABL1*'e bağımlı veya *BCR::ABL1*'den bağımsız olarak sınıflandırılır (Şekil 12). *BCR::ABL1*'e bağımlı direnç, ilaç bağlanmasını veya hücresel/biyolojik süreçleri bozan, TKI varlığına müdahale eden ve hedefte optimal olmayan ilaç konsantrasyonlarına neden olan kinaz domain nokta mutasyonları gibi *BCR::ABL1* kinaz inhibisyonunu bozan mekanizmalara dayanır. Bunlar; *BCR::ABL1*'nin mutasyonlarını, amplifikasyonunu ve artan ifadesi olarak tanımlanabilir. Aksine *BCR::ABL1*-bağımsız dirence, *BCR::ABL1*'in etkili TKI inhibisyonu durumunda alternatif sağkalım yollarının çalıştırılması, bozulmuş sinyal yolları aracılığıyla ortaya çıkar. *BCR::ABL1* bağımsız mekanizmalar arasında ilaç akışı aracılı ABC taşıyıcıları, direnci kolaylaştıran mikro ortam ve kromozomal anormallikler için yetersiz BER (baz eksizyon onarımı) dahil edilebilir (55). Açıkça görülen klinik direnç her iki mekanizma yoluyla da gözlenir, ancak kazanılmış direncin *BCR::ABL1*'e bağımlı olması daha olasıdır ve birincil direnç *BCR::ABL1*'den bağımsız olma eğilimindedir.

TKI'lerin direncinin genellikle patlama krizi aşamasında ortaya çıktığı bildirilmektedir (55). Genomik kararsızlığın bir sonucu olarak, ek genetik mutasyonlar ortaya çıkar. Böylece direnç gelişir, TKI'ler etkinliğini kaybeder, ardından KML hücreleri daha malign bir karakter kazanır, hastalık hızlanmış faza ve ardından patlama krizine ilerler. Klinik çalışmalarda, ek kromozomal anormalliklerin sıklığı kronik faz KML'de yaklaşık %7'dir ve standart sitogenetik analizle değerlendirilen hastalığın ileri evrelerinde %40-70'e yükselir.

Blastik faz KML’de en yaygın görülen ek kromozomal anomaliler +8 (ek değişikliği olan vakaların %34’ü), +Ph (%30), i(17q) (%20), +19 (%13), -Y (erkeklerin %8’i), +21 (%7), +17 (%5) ve monozomi 7 (%5)’dir (108) ve bunlar genellikle kötü prognozla ilişkilidir (68). Bazı çalışmalar ayrıca, TKI’ye dirençli klonları barındıran hastaların, patlama fazına ilerlemeye yol açan ek genomik anormallikler biriktirmeye daha yatkın olduğunu göstermiştir (55). Sitogenetik açıdan bakıldığında, kronik faz KML vakalarının büyük çoğunluğunda t(9;22) tek anomalidir.



Şekil 12: *BCR::ABL1* bağımlı ve *BCR::ABL1* bağımsız direnç. (A) Tirozin kinaz inhibitörü (TKI) inhibisyonu yokluğunda doğal *BCR::ABL1* sinyali, KML’de lösemogenez için gerekli ve yeterlidir. (B) *BCR::ABL1*’deki kinaz alanı mutasyonları, TKI’lerin bağlanmasını değiştirebilir ve *BCR::ABL1* sinyalinin yeniden yapılandırılmasına yol açabilir. (C) TKI’ler ile etkili *BCR::ABL1* inhibisyonu ayarında, alternatif hayatta kalma yollarının aktivasyonu nedeniyle lösemi hücreleri sağ kalmaya devam eder (50).

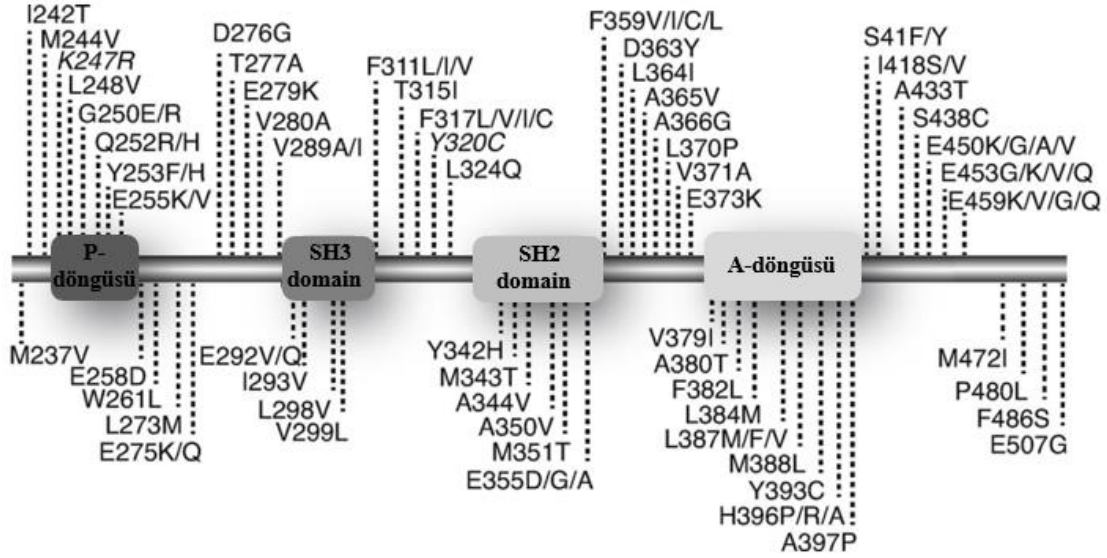
2.2.5.2.1. *BCR::ABL1* Bağımlı Direnç Mekanizmaları

BCR::ABL1 bağımlı dirençleri açıklamada *BCR::ABL1* kinaz aktivitesi ve *BCR::ABL1* kinaz alanındaki mutasyonları yeniden aktive eden mekanizmalar oldukça önemlidir. Kinaz domain mutasyonları ve TKI direnci arasındaki ilişki biyokimyasal mekanizma seviyesinde iyi karakterize edilmiştir.

KD mutasyonları, sterik engelleme yoluyla veya belirli bir TKI tarafından tanınmayan bir kinaz konformasyonunu stabilize ederek, inhibisyon için gerekli TKI konsantrasyonlarını klinik olarak ulaşılabilir aralığın üzerine çıkararak TKI bağlanmasını bozar (69-71). Artmış *BCR::ABL1* ekspresyonu, gen amplifikasyonu veya transkripsiyonel seviyedeki upregülasyon gibi mekanizmalar da TKI direnci oluşumunda rol oynar.

2.2.5.2.1.1. *BCR::ABL1* Kinaz Domain Mutasyonları

BCR::ABL1'deki mutasyonlar yaygındır ve kullanılan saptama metodunun duyarlılığına ve KML'nin evresine bağlı olarak imatinib dirençli hastaların %40-%90'ında meydana gelir (72). Imatinib tedavisindeki etkinliğin düşüşünü açıklayan yüzden fazla mutasyon tanımlanmıştır (Şekil13). Bu mutasyonlar kronik faz KML'nin akselere faz KML'ye ve blastik faz KML'ye ilerlemesini teşvik edebilir. Bilinen tüm mutasyonların %14'ünü temsil eden, *ABL1* geninin 944. pozisyonundaki timinin sitozinle yer değişmesine karşılık gelen ve 315. amino asitin, treoninin izolösine değişimi ile sonuçlanan T315I'dir. Bu değişim, imatinib ve tirozin kinaz alanı arasındaki hidrojen bağı için gerekli olan bir oksijen molekülünün kaybıyla sonuçlanır ve ayrıca sterik engel oluşturarak bağlanmayı önler ve tedavi etkinliğini büyük ölçüde azaltır (73). En yaygın yedi mutasyon; P-ilmek ATP bağlanma bölgesinde yer alan G250A/E, Y253F/H ve E255D/K/R/V, imatinib bağlanma bölgesinde yer alan T315I, katalitik ilmekte yer alan M351T, F359C/L/V/R ve aktivasyon ilmeği A'da yer alan H396P'dir (74). P-ilmekteki mutasyonlar tüm mutasyonların %38 ila %46'sını temsil eder ve imatinibin *BCR::ABL1*'ye bağlanmasını önleyen konformasyonel bir değişimle sonuçlanır (75). İlmek-A'da meydana gelen mutasyonlar, *BCR::ABL1*'nin aktif konformasyona ulaşmasını engeller, böylece imatinibin bağlanması engellenir (74).



Şekil 13: KML hastalarında tanımlanan *ABL1* kinaz domeni mutasyonları (76)

2.2.5.2.1.2. Artmış *BCR::ABL1* İfadesi

BCR::ABL1 ifadesi, aşırı ekspresyon, PH kromozomu duplikasyonu, gen amplifikasyonu ve onkogen transkripsiyonunun regülasyonu yoluyla artabilir. KML hastalarında artmış *BCR::ABL1* ifadesi gösterilmiştir fakat bunun kazanılmış dirençle ilişkisi KD mutasyonları vakalarından daha az kesindir. Yüksek *BCR::ABL1* onkoprotein seviyeleri, genellikle KD mutasyonları yoluyla açık direnç gelişiminden önce gelen daha ileri evre hastalık ile ilişkilidir (77). Bu nedenle, daha yüksek *BCR::ABL1* seviyeleri, TKI'lerin varlığına rağmen yeterli kinaz aktivitesinin devam etmesine sebep olabilir, bir KD mutasyonu elde edilene kadar lösemi hücresinin hayatta kalmasını ve direnci sağlar (50). Ek olarak, *BCR::ABL1* aşırı ekspresyonu, artan B-katenin aktivitesi ve lösemik kök hücrelerin kendi kendini yenilemesi ile sonuçlanan glikojen sentaz B geninin anormal birleşimine yol açar (78). Bu mekanizma, blastik fazda lösemik kök hücreleri gibi davranan ve olgunlaşmamış blast hücrelerinin hızlı genişlemesine katkıda bulunan granülosit-makrofaj progenitörlerinin kendi kendini yenileme kapasitesinin artmasıyla sonuçlanır (79).

2.2.5.2.2. *BCR::ABL1* Bağımsız Direnç Mekanizmaları

KML hücreleri *BCR::ABL1* ifadesinden bağımsız, farklı hücre dinamiği değişimleriyle TKI'lere karşı direnç oluşturabilmektedir. *BCR::ABL1* bağımsız dirençte, sürekli TKI uygulanması ile *BCR::ABL1* baskılanmasına rağmen görülen direnç söz konusudur. Burada alternatif hayatta kalma yollarının aktivasyonu görülmektedir. Böylece hücre, TKI ile sağlanan *BCR::ABL1* inhibisyonunu ortadan kaldırana kadar lösemik hücrelerin hayatta kalmasını sağlayabilir. Kavramsal olarak, KML hücresinin hayatta kalması, hücre mekanizmaları veya kemik iliği nişi tarafından sağlanan hücre-dışı mikroçevresel faktörler aracılığıyla sağlanabilir (50). *BCR::ABL1* bağımsız direnci, aktif hastalıkta açık direnç gösterebilsede, aynı zamanda minimal rezidüel hastalığa (MRD) katkıda bulunur ve TKI tedavisine rağmen lösemi kök hücre (LSC) kalıcılığını kısmen açıklar (50). *BCR::ABL1* bağımsız dirençte bozulmuş çoklu sinyal yolları görülmektedir. Ayrıca hücre içine ilaç alımında, genomik karalıkta ve DNA onarım mekanizmalarında aksamalar da söz konusudur.

2.2.5.2.2.1. İlaç Giriş-Çıkış Pompaları ve Bozulmuş Sinyal Yolları

Potansiyel olarak *BCR::ABL1* sinyalizasyonunun yeniden düzenlenmesine yol açan bir başka mekanizma, hücre içi TKI konsantrasyonlarını düşüren ilaç taşıyıcılarıdır. Spesifik TKI'ye bağlı olarak, imatinib ve nilotinib için *MDR1 (ABCB1)* ve asciminib için *BCRP (ABCG2)* olmak üzere farklı ABC ailesi taşıyıcıları söz konusudur. Bu mekanizma tamamen açık kazanılmış direnci yönetmek için etkili değilken, bir alternatif *BCR::ABL1* bağımsız yolak kurana ya da bir somatik mutasyon aracılığıyla yeniden aktif *BCR::ABL1* elde edene kadar, hücrelerin canlılığını sürdürmek için yeterli *BCR::ABL1* kinaz aktivitesini korumasını sağlayabilir (80). Organik katyon taşıyıcı-1 (*OCT-1*), hücre içi ilaç varlığını etkilediği gösterilen imatinib için hücrel bir akış pompasıdır ve düşük *OCT-1* aktivitesi, imatinib direnci verir. Yüksek *OCT-1* aktivitesi, imatinib ile tedavi edilen hastalarda iyileştirilmiş MMR oranları, olaysız sağkalım ve genel sağkalım için öngörü sağlar (50).

BCR::ABL1, birçok hücrel sinyal yolu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. PI3K/AKT, JAK/STAT, Ras/MAPK, Src gibi *BCR::ABL1* yollarındaki sinyal moleküllerinin aktivasyonu, direnç ve KML ilerlemesinde rol oynar. *BCR::ABL1*'nin sinyalleşme ağında kritik bir görevi gören Gab2, KML'nin sürücüsüdür.

BCR::ABL1 proteininin oluşumundan sonra, *GARB2* aracılığıyla substrat aktivitesi ve fonksiyonu artırılır (81). MAPK (ERK1 ve ERK2, MAPK1/2), transkripsiyon faktörleri, apoptoz ile ilgili proteinler veya sitokinler gibi çoklu hedef genler için kritik düzenleyicidir (82). MAPK1/2, apoptozu inhibe eden ve proliferasyonu destekleyen sinyal uyarılarını iletir (83). Anormal aktif MAPK 1/2, çoklu malignitelerde artan onkojenite ve ilaç direnci ile bağlantılıdır (84).

Yapılan çalışmalarda, *STAT3* aktivasyonunun hücre içi ve dışsal mekanizmalar aracılığıyla lösemik hücrelere sağkalım ipuçları verdiği ve bu hücrelerin hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda *STAT3*'ün *BCR::ABL1* bağımsız aktivasyonu, TKI'ye dirençli hücre hatları ve TKI direnci olan hastalara ait örneklerde görülmüştür (50).

KML hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için PI3K sinyali gereklidir (85). PI3K/AKT aktivasyonunun ikincil mutasyonlar aracılığıyla açık direnç ortaya çıkana kadar KML hücrelerinde sağkalımı kolaylaştırdığı gösterilmiştir (86). Ayrıca PI3K sinyalinin alt sinyal yollarında görevli transkripsiyon faktörleri FOXO1 seviyesinin KD mutasyonu olmayan ve nükseden hastalarda arttığı gösterilmiştir (50).

2.2.5.2.2.2. Kanser Kök Hücresi, Mikroçevre ve Epigenetik

Mevcut ilaç tedavilerinden etkilenmeyerek direnç oluşumunu sağlayan bir diğer faktör lösemik kök hücreler (LSC) dir. LSC'ler, kendi kendini yenileme, hareketsiz hale gelme ve hematopoietik nişler olarak adlandırılan belirli mikro-ortamlarda hayatta kalma yeteneği kazanan bir grup miyeloid progenitörden türetilir (87). LSC'lerin hayatta kalmaları için *BCR::ABL1*'e bağımlı olmadığı bildirilmiştir. Bunun yerine hayatta kalma ve proliferasyona aracılık eden sitokinlere bağımlı hale gelirler (88). Bu da LSC'lerin TKI duyarsızlığını açıklamaya yardımcı olur (89). TKI tedavisi ile LSC'ler tamamen öldüremez, bu yüzden tedavi kesildiğinde, LSC'ler hastalığın nüks etmesine yol açabilen hücre havuzunu oluştururlar. LSC'ler kısmen TKI'lere seçici olarak dirençlidirler. Böylece tedaviye farklı yanıtlar ile heterojenite oluştururlar (90).

Mikroçevresel faktörler de TKI direncini artırmada rol oynar. Stromal türevli sitokinler, birincil KML hücrelerinde *STAT3* fosforilasyonunu destekler. *STAT3*'ün *BCR::ABL1*'den bağımsız aktivasyonu, TKI'ye dirençli birincil KML hücrelerinde görülür. Kemik iliğinden türetilen plasental büyüme faktörü seviyeleri, KML'de artar ve hücre proliferasyonunu destekler.

Kemik iliği stromasından salınan fibroblast büyüme faktörü 2, MAPK sinyalinin aktivasyonu yoluyla imatinib direncini de yönlendirir. Ayrıca hipoksinin de teropatik olarak klinik etkiyi azalttığı, hastalık ilerlemesinde önemli rolü olduğu ve sitotoksik ilaçların etkinliğini azaltarak dirence katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle, KML hücrelerinin, TKI tedavisi karşısında hayatta kalmalarını sağlayabilecek bazı mikro-çevresel kaynaklı faktörlere karşı aşırı duyarlı olduğu görülmektedir (66).

Epigenetik olayların KML progresyonu ve TKI tedavisine direnç ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Blastik fazlı hastalarda kronik faza göre transkripsiyon faktörü AP-2 alfa (TFAP2A) ve erken B hücre faktörü 2 (EBP2) metilasyonu daha yüksek bulunmuştur. KML hastalarının %69'unda otofaji ile ilgili 16-like 1 (ATG16L1) metillendiği görülmüştür. Ayrıca 12 veya 18 ayda bir majör moleküler yanıt (MMR) elde etme olasılığı, metillenmiş vakalarda daha düşüktür. SIRT1 deasetilazın bir yandan KML hücrelerinde TKI direncine yol açan genetik mutasyonların kazanılmasını desteklediği, diğer yandan KML-LSC'lerini canlı tutmak için kritik olduğu gösterilmiştir (90). Polcomb baskılayıcı kompleks 1 (PRC1)'in BCR::ABL tirozin kinaz aşağı hedeflerinden biri olan protoonkogen *BMI1*'in ileri evre KML hastalarında yüksek seviyede ifade olduğu ve daha kötü sonuçla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (90).

KML direncinde rol oynayan bir diğer epigenetik yol, hedef mRNA'larda 3'-UTR'ye bağlanarak gen ekspresyonunu etkileyen, 19-22 nükleotitten oluşan küçük, kodlamayan RNA'ların bir ailesi olan miRNA'lardır. Aberrant miRNA'lar, kanserlerde küresel bir baskılanma sergiler, bu da miRNA'ların genel düzeyde tümör baskılayıcılar olduğunu düşündürür (90). Bunların aydınlatılması, KML tedavisinde yeni yolların bulunmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca KML'de direnç epigenetik düzenleyiciler olan *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1* ve *SETBP1*'deki mutasyonların varlığıyla da ilişkilidir. Bu mutasyonların varlığı kötü prognozla ve blastik faza ilerleme ile ilişkilidir. Fakat bunların direnci nasıl yönettiği belirsizdir. Ek olarak, epigenetik düzenleyicilerin TKI tedavisi karşısında LSC'lerin kalıcılığına katkı sağladıkları bildirilmiştir (66).

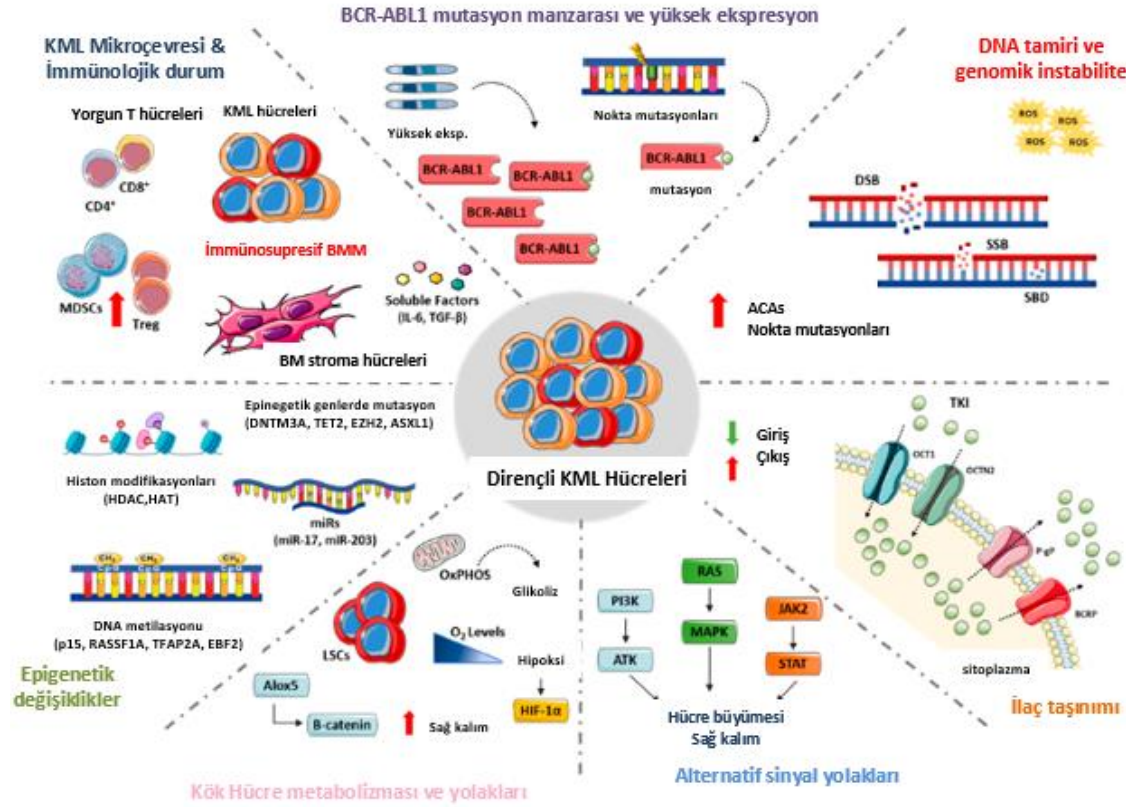
2.2.5.2.2.3. Klonal Evrim, Genomik İnstabilite ve Eksik DNA Onarımı

Klonal evrim, direncin başka bir mekanizmasıdır ve kronik fazdan sonraki ilerleme olarak tanımlanır.

Uzun süredir ekstra Ph kromozomu, trizomi 9, trizomi 19, *RAS*, *P53* ve *MYC*'nin kodlanan dizilerinde nokta mutasyonları ya da Ph⁺ hücre karyotiplerinde *p16* ve *RB* yeniden düzenlenmeleri gibi rastgele olmayan kromozomal anomalilerin kazanımı ile ilişkilendirilmiştir (91). Klonal evrim, KML'de hastalık ilerlemesinin bir belirteci olabilir ve oldukça proliferatif KML hücrelerinin genomik kararsızlığını yansıttığı düşünülmektedir (92). Hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilen telomer kısalması ve yüksek düzeyde ifade edilen *BCR::ABL1* genomik instabiliteyi indükler. Bu instabilite *ABL1* kinaz domanin nokta mutasyonlarına ve çeşitli diğer moleküler ve kromozomal genetik anomalilerin birikime katkıda bulunur. *GATA* bağlayıcı protein 2'deki (*GATA-2*) mutasyonların aktivasyonunun ve *RUNX1*, polimiksin direnç proteini 16 (*PMRD16*)'nın kısmi delesyonunun ayrıca *RUNX1/PMRD16* ifadesinin de dahil olduğu, KML ilerlemesi ile ilişkili genetik anormallikler, KML blastik fazında ortaya çıkar. Ayrıca hastalık transformasyonunu ve ilaç direncini etkileyebilirler (91).

ABL1 kinazdaki nokta mutasyonları ROS (reaktif oksijen türevleri) veya düzensiz DNA onarım mekanizmalarının neden olduğu gelişmiş oksidatif DNA hasarından kaynaklanır. DNA'da oksidatif bazlar BER (base-excision repair) yolu ile onarılır. Bu yüzden BER aktivitesi nokta mutasyonlarının birikmesinin önlenmesi için oldukça kritiktir. Kronik faz KML'de yanlış eşleşme onarımının inhibe edildiği bilinmektedir. Bu nedenle, eksik DNA onarımı DNA yanlış eşleşmelerini üretebilir. NHEJ (non-homologous end joining), memeli hücrelerinde çift zincir kırıklarını (DSB) onarmak için kullanılan ana yollardan biridir. Bu yol, nadiren nükleotidlerin eklenmesine veya kaybolmasına neden olur. Bununla birlikte, NHEJ'e ek olarak, onarım bölgesinde yüksek sıklıkta büyük delesyonlar, kromozomal translokasyonlar ve kısa mikrohomoloji bölgeleri tarafından karakterize edilen, ALTNHEJ (alternative non-homologous end joining) olarak adlandırılan başka bir NHEJ versiyonunun yüksek oranda hataya açık olduğu keşfedilmiştir. *BCR::ABL1* kinazın reaktif oksijen türlerinin üretimini indükleyebileceği ve bunun da gelişmiş DNA onarım süreçleri ile DSB'lerinin de dahil olduğu DNA hasarına yol açabileceği bildirilmektedir. Aynı zamanda ALTNHEJ onarım yolu, *BCR::ABL1* inhibitörlerine direnç oluşturmaya yardımcı olan gen mutasyonu olasılığını artırır (55).

Genel olarak bakıldığında KML hücre içi pek çok değişim ile kontrol edilmektedir. *BCR::ABL1* füzyonunun oluşumu ile başlayan süreç, hücre içi dengenin bozulması ve hücre içi kontrol mekanizmalarında oluşturulan farklılaşmalarla devam ettirilmektedir. Hücrelerde gerçekleşen tüm bu değişimler, KML progresyonu ve uygulanan TKI'lere direnç geliştirilmesine katkı sağlar. Şekil 14'te TKI'lere direnç geliştirmeyi sağlayan yolların şematize edilmiş hali verilmiştir.



Şekil 14: KML'de TKI direncinin moleküler mekanizmaları (93)

Bu tez çalışması kapsamında KML hastalarında görülen farklı *BCR::ABL1* füzyon tiplerinin karakterize edilmesi, hastalığın seyri ve tedavi yanıtı üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerekli izinler alınarak yapılmıştır. Çalışmada kronik miyeloid lösemi hastalarında t(9;22) *BCR::ABL1* füzyonunda belirlenen kırık tipleri taranmıştır ve hastalık süreciyle ilişkisinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

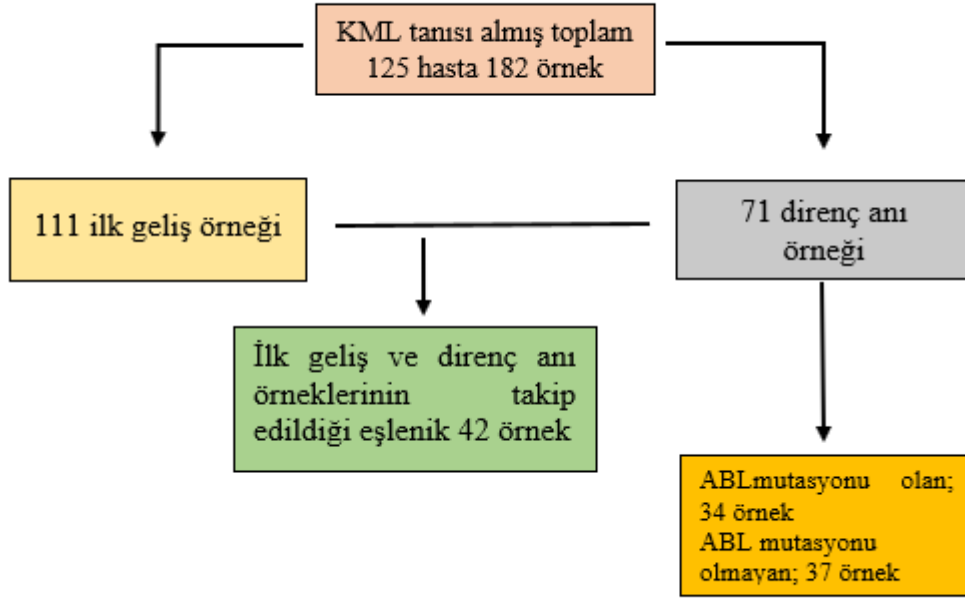
3.1. Gereç

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (n=99) ve Prof. Dr. Cemil Taşcıoğlu Şehir Hastanesi (n=25) ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi'nden (n=1) Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne daha önce, KML tanısı ile *BCR::ABL1* kantitatif tayini ve *ABL1* mutasyonu için gönderilen toplam 125 hasta, 182 örnek ile gerçekleştirilen retrospektif bir çalışmadır. Tüm örnekler spesifik primerler ile RT-PZR yöntemi kullanılarak p210 e13a2, e14a2, e13a3, e14a3, p190 e1a2, e1a3, p230 e19a2, e19a3 füzyonları açısından taranmıştır. Yüzsekseniki örneğin 111'i hastaların laboratuvarımıza ilk verdikleri örnekler (tanı, tedavi), geriye kalan 71 örnek ise direnç anı (*ABL* mutasyonu pozitif ve negatif) örnekleridir. Bu örneklerin tümü KML tanısı almış hastalara ait olan, t(9;22) pozitif ve *BCR::ABL1* miktarı en az $>0,1$ olan örneklerdir. Tablo 4'te CTF takipli hastaların klinik özellikleri verilmiştir. Şekil 15'te çalışma grubundaki örneklerin dağılımını gösterilmiştir.

Tablo 4: CTF takipli hastalarının klinik özellikleri

Özellikler	CTF Hastaları (n=99)
Tanı zamanı yaş	44,84 ± 14,5
Cinsiyet	
Kadın	65 (%65,6)
Erkek	34 (%34,4)
Takip süresi	115,1 ± 55,8 ay
Güncel kullanılan TKI	
İmatinib	41 (%41,4)
Dasatinib	17 (%17,2)
Nilotinib	9 (%9,1)
Bosutinib	0
Ponatinib	1 (%1)
Sokal risk skoru	
Belirlenemeyen	31 (%31,3)
Düşük	36 (%36,4)
Orta	24 (%24,2)
Yüksek	8 (%8,1)
Tanı anında KML evresi	
Kronik faz	96 (%96,9)

Akselere faz	2 (%2,1)
Blastik faz	1 (%2)



Şekil 15: Çalışmaya dahil edilen örneklerin dağılımı

Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafınca onaylanmış (2020/1085) ve kan/kemik iliği örnekleri alınan tüm hastalara, çalışmanın içeriğinin detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır.

Pozitif kontrol olarak K562, KCL-22 ve AR-230 hücre hatları ve kullanılmıştır. K562 hücre hattı 53 yaşında blastik krizdeki bir kadın KML hastasından elde edilmiştir. K562, immünoglobulin, Epstein-Barr virüsü (EBV) genomunun B belirteçlerinden ve ilişkili nükleer antijenden ve EBV reseptörlerinden yoksundur (94). K562 hücre hattı *BCR::ABL1* e14a2 (b3a2) füzyon genini taşır. KCL-22 hücre hattı 32 yaşında blastik krizdeki bir kadın KML hastasının plevral efüzyon hücrelerinden elde edilmiştir. Bu hücre hattı, IgG'nin Fc kısmı için reseptörlere sahiptir, ancak lenfoid hücre özelliklerinden ve Epstein-Barr virüsü ile ilişkili nükleer antijenden yoksundur. KCL-22 hücre hattı t(9;22) pozitifdir ve *BCR::ABL1* e13a2 (b2a2) füzyon genini taşır (95). AR-230 hücre hattı 50 yaşındaki kadın KML hastasının kemik iliği hücrelerinden elde edilmiştir(4). Hücre hattı AR230, CD13, CD33 ve CD35 için pozitif ve CD11b için zayıf pozitif, CD34 için negatiftir. *BCR::ABL1* pozitif iki farklı transkript ifade eder. Transkriptlerden biri *BCR*

ekzon c3/*ABL1* ekzon 2 transkriptiyken, diğeri c2 *BCR::ABL1* kimerik kopyasıdır (96). p190 e1a2 pozitif kontrol olarak Ustek ve ark. klonladığı plazmid kullanılmıştır (97).

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 5: Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Otomatik Pipetler	Ependorf, Raini
Çeker ocak	Kermanlar
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C)	Arçelik, Sanyo, Bosch
Jel görüntüleme sistemi	UVP
PZR cihazları	Techne, Biorad
Vorteks	Kermanlar
Spektrofotometre	Nanodrop
Soğutmalı Santrifüj	Ependorf
Otoklav	Kermanlar
Steril kabin	Thermo Scientific
Light Cycler	Roche 480

3.1.2. Kullanılan Kitler

Tablo 6: Çalışmada kullanılan kitler ve kullanım amacı

Kit	Kullanım Amacı	Firma
First-Strand cDNA Synthesis kit	cDNA Sentezi	Invitrogen, ABD

3.1.3. Kullanılan Elektronik Veri tabanları

Kullanıcıya referans sekans ve genom bilgilerini sağlayan veri tabanlarıdır. Kullanılan elektronik veri tabanları listelenmiştir. NCBI primerlerin blastı, ENSEMBL genlerin dizi bilgilerine erişmek için kullanılmıştır.

- NCBI (National Center for Biotechnology) (Sürüm 245)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- ENSEMBL (Ensembl Sürüm 106 (Apr 2022))

<http://www.ensembl.org>

3.1.5. Kullanılan Materyaller

Tablo 7: cDNA sentezi için kullanılan materyaller

Kullanılan Materyaller	Firma
Random primer (50 ng/μl)	Invitrogen, ABD
10 mM dNTP miks	Thermo Scientific, ABD
0,1 M DTT	Invitrogen, ABD
5x First Strand Buffer	Invitrogen, ABD
RNaz inhibitör (20U/μl)	Thermo Scientific, ABD
Revers transkriptaz (200U/μl)	Invitrogen, ABD

Tablo 8: Polimer Zincir Reaksiyonunda kullanılan materyaller

Kullanılan Materyaller	Firma
10x Taq Buffer with KCL	Thermo Scientific, ABD
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific, ABD
10mM dNTP miks	Thermo Scientific, ABD
Primerler	Thermo Scientific, ABD
Taq Polimeraz (5U/μl)	Thermo Scientific, ABD

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 9: Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Marka
Kloroform	Carloerba Reagents, Fransa
Absolute Etanol	Merck, Almanya
Trizol	MRC, ABD
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
6x Loading Dye	Thermo Scientific, ABD
Tris Baz	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Glasiyal Asetik Asit	Sigma, Almanya

3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

50x TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA)

100 ml EDTA (0,5M),

242 g Tris baz,

57,1 g Glasiyal asetik asit,

1 lt distile su ile tamamlanarak 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.2. Yöntem

Hücre hatları ve KML hastalarına ait kan ve kemik iliği örneklerinden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Ardından t(9;22) *BCR::ABL1* p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3), p190 (e1a2, e1a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyonlarına ait kırık tiplerini karakterize etmek için polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. Daha nadir görülen ve atipik kırıkların validasyonu için Sanger dizileme yapıldı.

3.2.1. RNA izolasyonu, Kalite ve Miktar Tayini

Daha önce hastalardan alınan kan veya kemik ilikleri örneklerinden elde edilen beyaz kan hücreleri (WBC) trizole alındı.

- -80'den alınan trizol örnekleri buz üzerinde çözünmeye bırakıldı.
- Çözünen örnekler ısıtıcı blokta 37° C'de 1400 rpmde 10 dakika çalkalandı.
- Örnekler 200 µl kloroform eklendi.
- Tüm örnekler yaklaşık tamamen homojen olana kadar vortekslendi.
- Soğutmalı santrifüjde 8° C'de 10600 rpmde 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda 3 ayrı faz görülmüştür ve en üst faz temiz ependorfa alındı.
- Örnekler 200 µl kloroform eklenip iyice vortekslendi.
- Yeniden soğutmalı santrifüjde 8° C'de 10600 rpmde 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası 2 faz görülmüştür ve üst faz temiz ependorfa alındı.
- Önceden hazırlanıp +4° C'de bekletilen %100 etanolden 500 µl eklenip tüpler güzelce alt üst edildi.
- -20° C'de 30 dakika bekletildi.
- Soğutmalı santrifüjde 8° C'de 10600 rpmde 10 dakika santrifüj edildi.

- Pelete dokunmadan süpernatant atıldı ve pelete +4° C'den alınan %75 etanolden 1 ml eklendi.
- Ependorflar güzelce çalkalandı ve Soğutmalı santrifüjde 8° C'de 8400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tüpler 37° C'de 3-4 dakika bekletildi.
- Pelet RNase free su ile pelet miktarına göre çözündürüldü.

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları DNA'nın belirli dalga boylarında soğurulması (OD) esasına dayanarak Nanodrop kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümlerde 260 nm/280 nm oranının 1,8 ile 2 arasında olmasına dikkat edildi.

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyonları ve ölçümleri yapılan RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi aşağıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi;

- Son konsantrasyonu 1000 ng olacak şekilde seyreltilen RNA örneklerinden 10 µl alınarak, 10mM 1 µl dNTP mix ve 50 ng/µl 1 µl Random hekzamer ile karışım haline getirildi.
- Thermal cycler'da 65°C'de 5 dakika bekletildi.
- 4 µl 5x First strand buffer, 2 µl 0,1 M DTT ve 1 µl 40u/µl RNaz İnhibitör karışım haline getirilerek örneklerin üzerine eklendi.
- Karışım 25°C'de 10 dakika bekletildikten sonra, üzerine 1 µl 200U/ µl M-MLV RT eklendi ve 37°C'de 50 dk ve 70°C'de 15 dakika inkübe edildi. cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.2.3. Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen cDNA'larda t(9;22) *BCR::ABL1* p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3), p190 (e1a2, e1a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyonlarını tanımlamak için RT-PZR yapıldı. Pozitif kontrol olarak p210 e14a2 pozitif K562, p210 e13a2 pozitif KCL-22, p230 e19a2 pozitif AR-230 hücre hatları kullanıldı. P190 e1a2 kırığı için kırık bölgesini içeren bir vektör aracılığıyla klonlanan plazmid kullanıldı. Referans gen olarak *GAPDH* kullanıldı.

Tablo 10: *GAPDH* geni kontrol PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10x	2,5 µl
dNTP karışımı	2,5 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1 µl
Primerler	10 pmol	0,5 µl
Taq polimeraz	500 ünite	0,25 µl
dH ₂ O		18,25 µl
cDNA	1000 ng	1 µl
TOPLAM		25 µl

PZR reaksiyonu için hazırlan karışım 24 µl olacak şekilde PZR tüplerine dağıtıldı. Üzerine 1 µl cDNA örnekleri eklendi ve PZR cihazına koyuldu.

Tablo 11: *GAPDH* geni PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	94°C	3 dakika
Denatürasyon	94°C	40 saniye
Primer bağlanması	62°C	45 saniye
Zincir uzaması	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	10 dakika

Referans gen PZR çalışan cDNA örnekleri ile p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3), p190 (e1a2, e1a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyon tipleri için konvansiyonel PZR yöntemi uygulanarak füzyonların karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 12: *BCR::ABL1* kantitasyonu %100-%10 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) ve p190 (e1a2,e2a3), p230 (e19a2, e19a3) füzyonları için PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10x	2,5 µl
dNTP karışımı	2,5 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1 µl

Primerler	10 pmol	0,5 µl
Taq polimeraz	500 ünite	0,25 µl
dH ₂ O		17,25 µl
cDNA	250 ng	2 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 13: *BCR::ABL1* kantitasyonu %10-%1 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonu için PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10x	2,5 µl
dNTP karışımı	2,5 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl
Primerler	10 pmol	0,5 µl
Taq polimeraz	500 ünite	0,25 µl
dH ₂ O		16,75 µl
cDNA	250 ng	2 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 14: *BCR::ABL1* kantitasyonu <%1 olan p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonu için PZR içeriği

	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10x	2,5 µl
dNTP karışımı	2,5 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl
Primerler	10 pmol	0,5 µl
Taq polimeraz	500 ünite	0,25 µl
dH ₂ O		13,75 µl
cDNA	250 ng	5 µl
TOPLAM		25 µl

Tablo 15: p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) ve p230 (e19a2, e19a3) füzyonları için PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	94°C	3 dakika
Denatürasyon	94°C	40 saniye
Primer bağlanması	61°C	45 saniye
Zincir uzaması	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	10 dakika

Tablo 16: p190 (e1a2, e1a3) füzyonu için PZR koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	94°C	3 dakika
Denatürasyon	94°C	40 saniye
Primer bağlanması	60°C	45 saniye
Zincir uzaması	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	10 dakika

Tablo 17: p210 (e13a2, e14a2, e13a3, e14a3) füzyonuna özgü primerler

BCR ekzon 13	İleri 5'-AGCATTCCGCTGACCATCAA-3'
ABL1 ekzon 3	Geri 5'-GGTACCAGGAGTGTTTCTCCA-3'

Tablo 18: p190 (e1a2, e1a3) füzyonuna özgü primerler

BCR ekzon 1	İleri 5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3'
ABL1 ekzon 3b	Geri 5'-GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'

Tablo 19: p230 (e19a2, e19a3) füzyonuna özgü primerler

BCR ekzon 18	İleri 5'-TTCGGAGTCAAGATTGCTGTG -3'
ABL1 ekzon 3	Geri 5'-GGTACCAGGAGTGTTTCTCCA-3'

Tablo 20: PZR sonrası beklenen ürün boyları

Ürün	Ürün Boyları
e14a2	409 bp
e13a2	334 bp
e14a3	235 bp
e13a3	160 bp
e1a2	521 bp
e1a3	347 bp
e19a2	475 bp
e19a3	301 bp

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

%2'lik agaroz jel elde etmek için 1,4 g tartılan agaroz, 70 ml 1x TAE içine koyulup mikrodalga fırında ısıtıldı. Çeker ocakta 3,5 µl etidyum bromür eklendi. Elde edilen sıvı agaroz jel tepsisine döküldü ve taraklar yerleştirildi. Ardından katılaşması için bekledi. Katılaştıran jel 1x TAE koyulmuş olan yürütme tankına yerleştirildi. PZR ürünleri 6x yükleme tamponu kullanılarak %2'lik agaroz jele yüklendi ve 75-85 volt elektrik akımında 25-30 dakika yürütüldü. 100 bp marker kullanılarak ürün boyları belirlendi. Yürütülen örnekleri içeren jel UV ışık altında görüntüledi.

3.2.5. Kırık Tiplerinin Tanımlanması ve Sanger Dizileme

Görüntülenen örnekler pozitif kontroller ve marker yardımıyla tanımlandı. Pozitif kontrollerden farklı olan bantlar atipik kırıklar olarak değerlendirildi ve tanımlanması için çift yönlü Sanger dizilemeye gönderildi. Sanger dizileme için hizmet alımı yapıldı ve sonuçlar CLC Workbench programı ile analiz edildi.

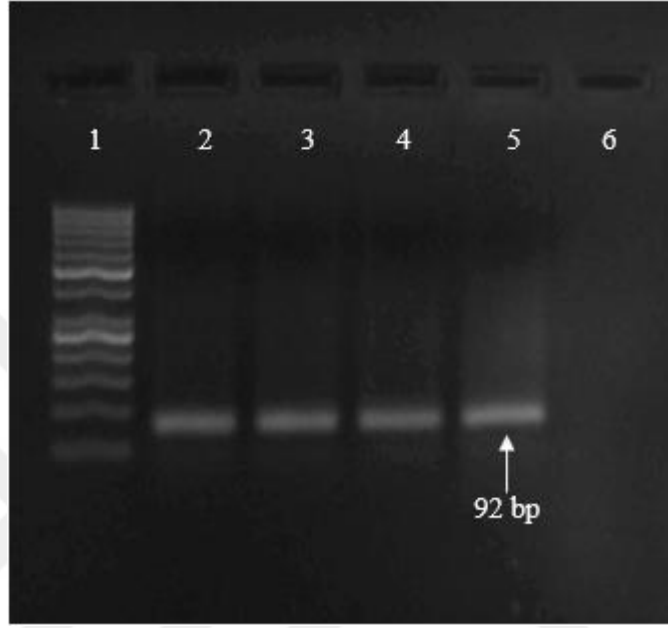
3.2.6. İstatistiksel Analiz

Tüm füzyon tiplerinin karşılaştırmalı analizi için t-testi kullanılarak Graphpad Prism 8 kullanılarak yapılmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *GADH* Kontrol Geni Anlatımı

cDNA örneklerinin kontrolü için *GAPDH* geni kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen 182 örneğin tümüne kontrol *GAPDH* PZR yapıldı. Temsili jel görüntüsü Şekil 16'da verildi.

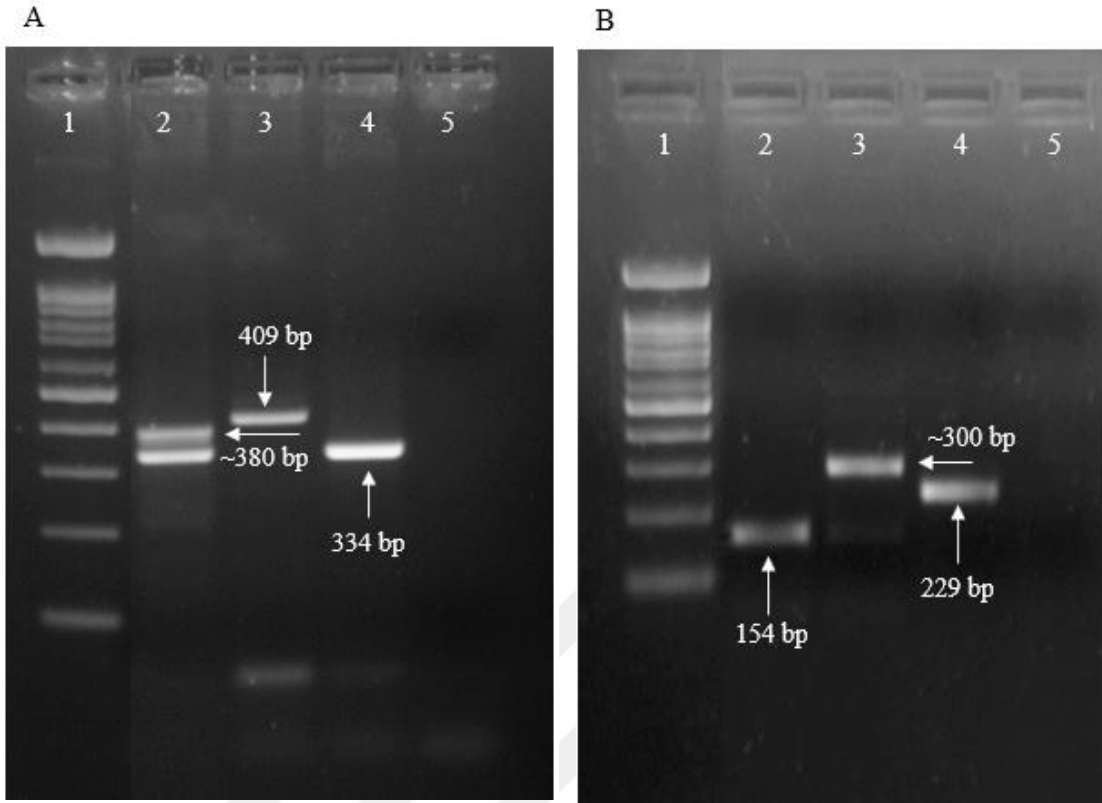


Şekil 16: *GAPDH* PZR'a ait temsili jel görüntüsü. (Sıra1; 50 bp marker 2, 3, 4, 5; *GAPDH* pozitif örnekler, 6; negatif kontrol)

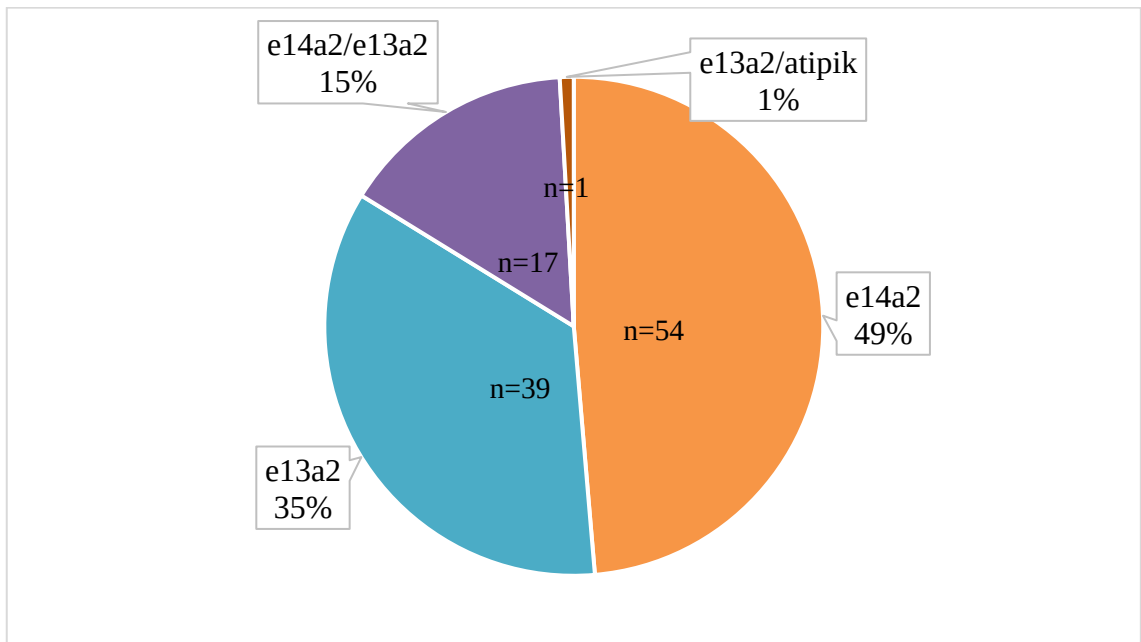
4.2. Tüm Kırık Tiplerinin Çalışma Grubundaki Dağılımı

4.2.1. İlk Geliş Örneklerinin Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 111 hastanın 73'ü erkek, 38'si kadındır (E:K/73:38). Bu hastaların laboratuvarımıza gelen ve rutin tanıda pozitif olarak raporlanan ilk örnekleri p210 (e14a2, e13a2, e14a3, e13a3) p190 (e1a2, e1a3), p230 (e19a2,e19a3) füzyonları açısından incelendi. KML hastalarının 54'ünde (%48,6) e14a2 füzyonu, 39'unda (%35,1) e13a2 füzyonu saptandı. Ayrıca 17 hastada (%15,3) e14a2/e13a2 füzyonun birlikte ekspresyonu görülürken, iki hastada (#68 ve #94 nolu örnekler) e13a2 füzyonu ile birlikte atipik bant görüldü. Bu hastalara ait jel görüntüleri Şekil 17'de verildi. Şekil 17'de verilen sıra 2'de görülen #68 nolu örneğe ait atipik bant Sanger dizileme sonrasında herhangi bir *BCR::ABL1* füzyonu olmadığı anlaşıldığından değerlendirmeye alınmadı. Ayrıca bu gruptaki örneklerin hiçbirinde p190 ve p230 füzyonları saptanmadı. Tüm hastalardaki transkriptlerin dağılımı Şekil 18'de gösterildi.

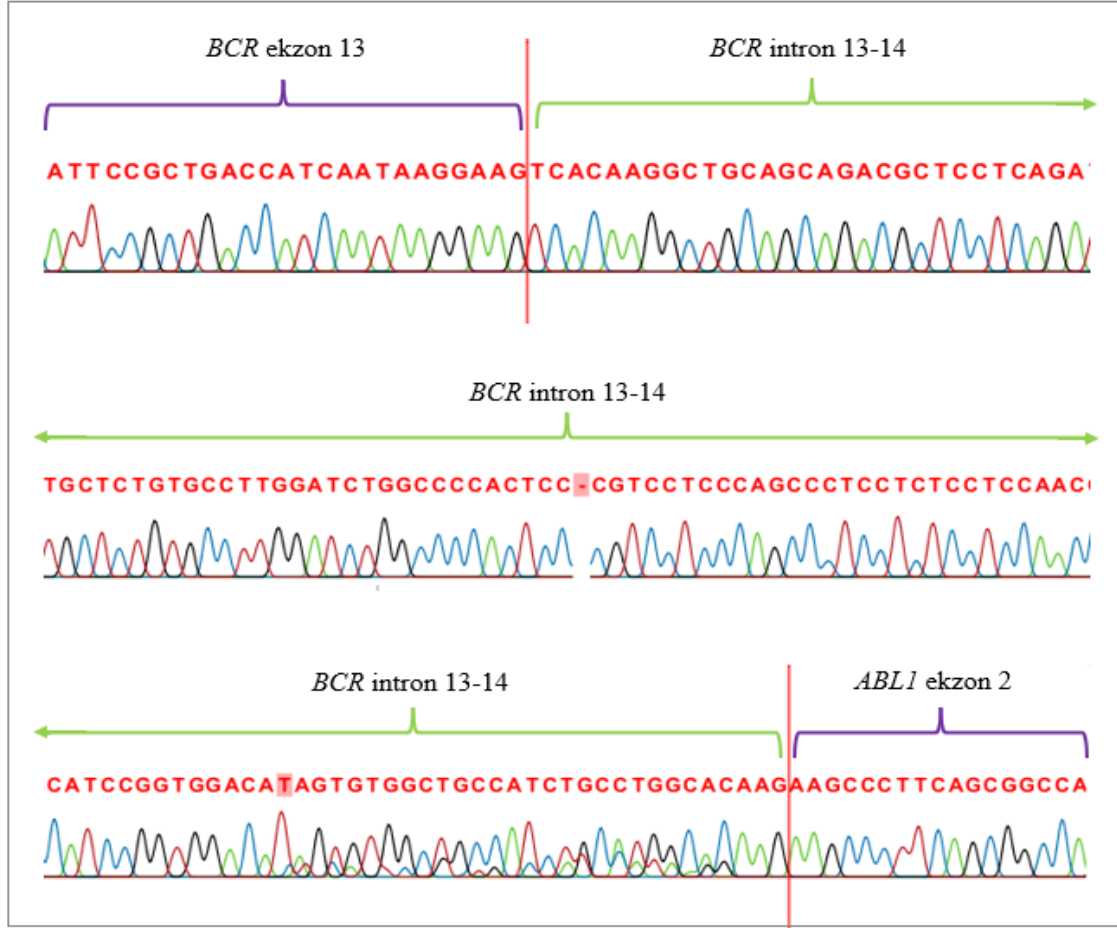


Şekil 17: Atipik bant belirlenen örneklere ait jel görüntüsü. A) Sıra1; 100 bp marker, 2; #68 nolu örneğe ait e13a2 334 bp ve atipik bant, 3; K562 e14a2 409 bp, 4; KCL-22 e13a2 334bp, 5; negatif kontrol. (2.sırada görülen atipik bant anlamlı olmadığı için çıkarılmıştır) B) Sıra1; 100 bp marker, 2; KCL-22 e13a2 154 bp, 3; #94 nolu örneğe ait e13a2 ve atipik bant, 4; K562 e14a2 229bp, 5; negatif kontrol.

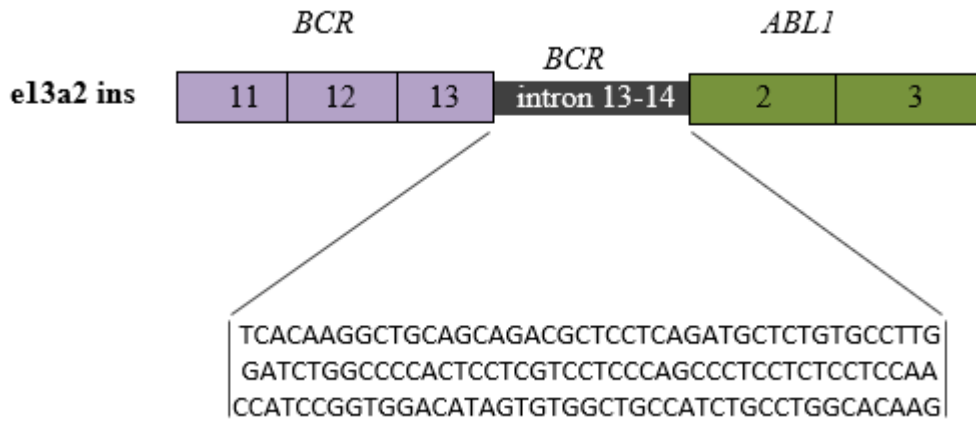


Şekil 18: İlk geliş örneklerinde transkript tiplerinin dağılımı

İlk geliş örneklerinden #94 nolu örnekte tanımlanan atipik füzyonun Sanger dizileme analizinde *BCR* ekzon 13'e *BCR* 13-14 intronik dizilerinden 130 bp eklenme olup sonrasında *ABL1* geni ekzon 2 ile birleştiği anlaşıldı. Şekil 19 'da bu örneğe ait Sanger dizileme sonuçları ve Şekil 20'de bu füzyonun yapısı verildi.



Şekil 19: #94 nolu örnekte bulunan atipik füzyonun sanger görüntüsü



Şekil 20: #94 nolu örneğe atipik füzyonun yapısı ve eklenen intronik dizi

Transkript tiplerinin cinsiyet üzerindeki dağılımı incelendiğinde; tüm kohortta kadınlarda 21 (%18,9) örnek e14a2, 13 örnek (%11,7) e13a2, 3 örnek (%2,7) e14a2/e13a2 transkriptlerini ifade ederken, erkeklerde bu oran, 33 (%29,7) örnek e14a2, 26 (%23,4) örnek e13a2, 14 (%12,6) örnek e14a2/e13a2 olarak görüldü. Her iki cinsiyet kendi içinde değerlendirildiğinde, kadınlarda; %55,3 e14a2, %34,2 e13a2, %7,9 e14a2/e13a2, erkeklerde %45,2 e14a2, %35,6 e13a2 %19,2 e14a2/e13a2 olarak bulundu. e13a2/atipik bant sonucu ise kadın hastada tanımlandı. Tablo 21’de transkript tiplerinin cinsiyet üzerindeki dağılımı verildi.

Tablo 21: İlk geliş örneklerinde belirlenen füzyonların cinsiyetlere göre dağılımı

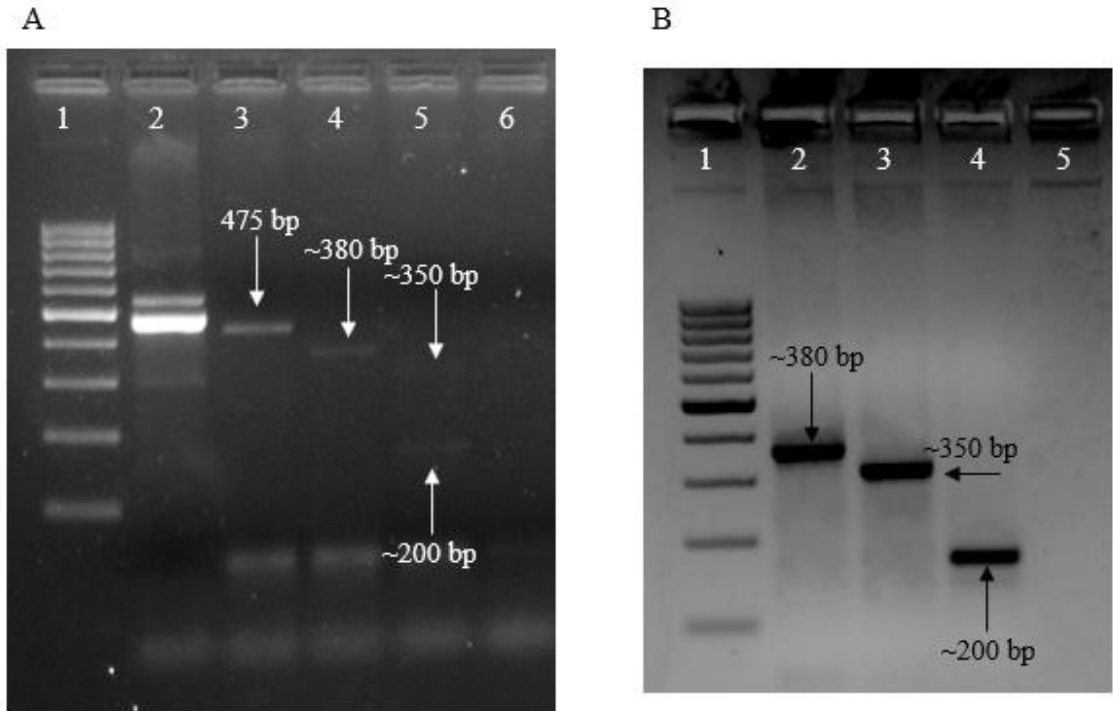
	e14a2	e13a2	e14a2/ e13a2	e13a2/ atipik	e14a3	e13a3	e1a2	e1a3	e19a2	e19a3
Kadın n=38	21 (%55,3)	13 (%34,2)	3 (%7,9)	1 (%2,6)	0	0	0	0	0	0
Erkek n=73	33 (%45,2)	26 (%35,6)	14 (%19,2)	0	0	0	0	0	0	0
p değeri	0,326	0,96	0,166							
Toplam n=111	54 (%48,6)	39 (%35,1)	17 (%15,3)	1 (%0,9)	0	0	0	0	0	0

4.2.2. Direnç Anı Örneklerinin Dağılımı

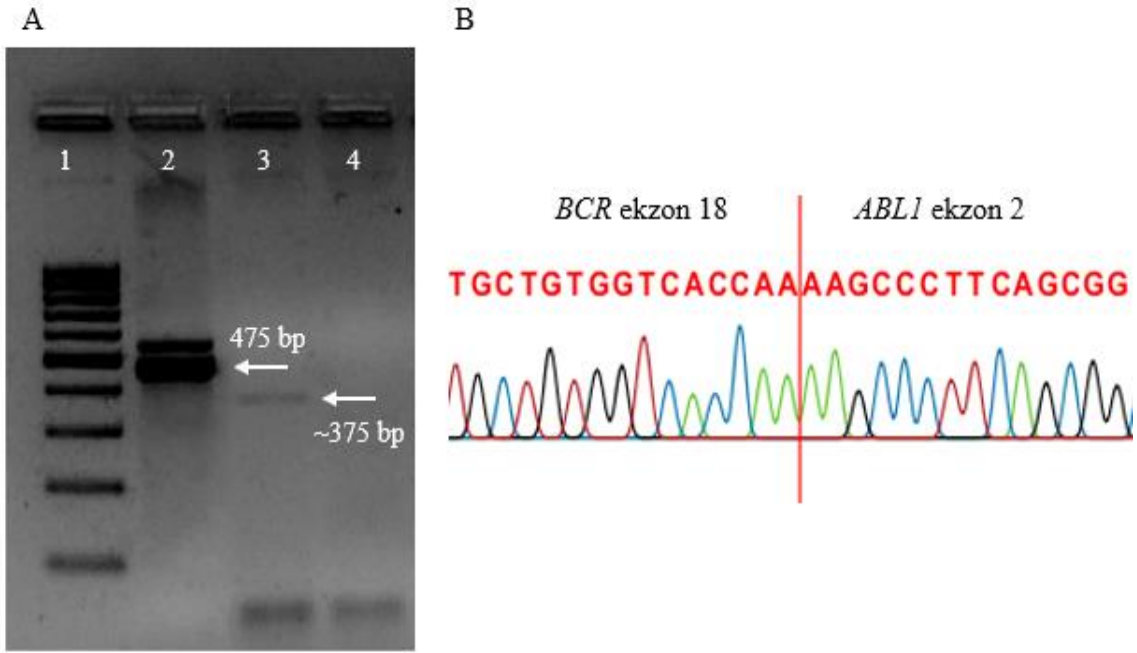
Toplam 58 hastaya ait 71 örnek belirlenen füzyonlar açısından tarandı. 71 örneğin 42’sin (%59,2) e14a2 ifade ederken, 16’sının (%22,5) e13a2, 6’sının (%8,4) e14a2/e13a2 ifade ettiği belirlendi. Bunlara ek olarak birer örnekte (%1,4) e14a2/e1a2, e13a2/e1a2, e14a2/e13a2/e1a2/e19a2 ve e13a2/e18a2 füzyonlarının birlikte ifadesi olan toplam dört örnek görüldü. Üç örnekte (%4,2) e14a2/e19a2 füzyonu saptandı. Bu verilere ait bilgiler Tablo 22’de verildi. Başlangıçta p230 primerleri ile yapılan PZR sonucunda üç örnekte atipik bantlar bulundu. Bu bantlar Sanger dizilemeye yollandı. Analiz edilen diziler ile iki örneğe ait atipik bantların anlamsız olduğu belirlendi. Bu örneklerle ait bant görüntüleri Şekil 21’de verildi. #19 nolu örnekteki bandın ise e18a2 füzyonu olduğu anlaşıldı. Bu füzyona ait bant görümlü ve Sanger dizileme sonucu Şekil 22’de, bu füzyonun yapısı Şekil 23’te verildi. P190 (e1a2) füzyonunu içeren örneklerle ait bant görüntüsü Şekil 24’de ve p230 (e19a2) füzyonunu içeren örneklerle ait jel görüntüsü Şekil 25’de verildi. Bir örneğin e19a2 füzyonunun bandı Şekil 21’de verildi.

Tablo 22: Direnç anı örneklerinde belirlenen kırık tiplerinin sayısı ve yüzdeleri

Transkript tipi	Örnek sayısı (%)
e14a2	42 (%59,2)
e13a2	16 (%22,5)
e14a2/e13a2	6 (%8,4)
e14a2/e1a2	1 (%1,4)
e13a2/e1a2	1 (%1,4)
e14a2/e19a2	3 (%4,2)
e14a2/e13a2/e1a2/e19a2	1 (%1,4)
e13a2/e18a2	1 (%1,4)

**Şekil 21:** Herhangi bir füzyon olmadığı belirlenerek dışlanan bantlara ait jel görüntüleri
A) Sıra 1; 100 bp marker, 2; AR-230 e19a2 475 bp, 3; e19a2 pozitif 475 bp, 4, 5; sanger dizileme sonrası dışlanan bantlar, 6; negatif kontrol.

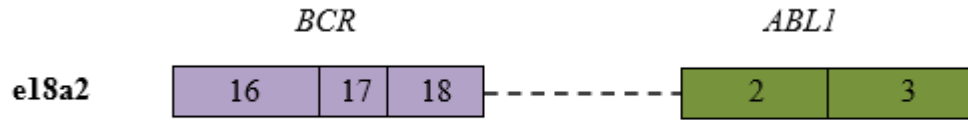
B) Sıra 1; 100 bp marker, 2, 3, 4; dizileme sonrası dışlanan bantların tek bantları, 5; negatif kontrol



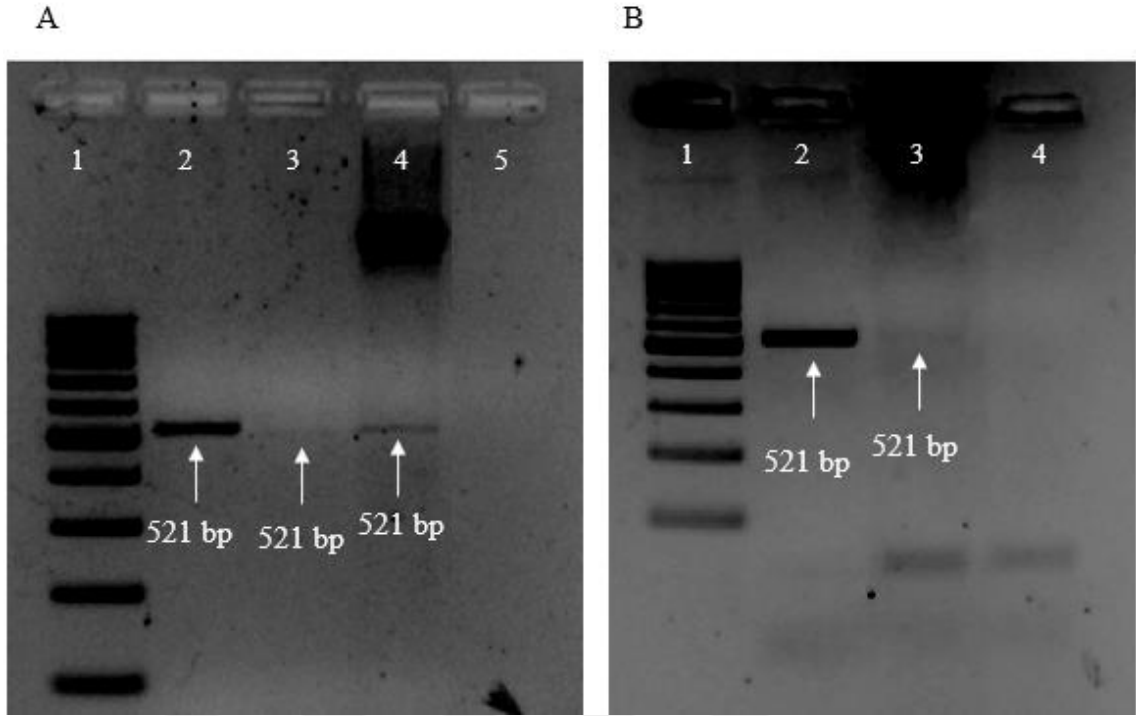
Şekil 22: e18a2 ifade eden örneğe ait jel ve sanger dizileme sonucu.

A) e18a2 füzyonunu ifade eden #19 nolu örneğe ait jel görüntüsü. Sıra1; 100 bp marker, 2; AR230 e19a2 475bp, 3; atipik bant, ~ 375 bp, 4; negatif kontrol. (Bu görüntüde bahsedilen örneğin sadece e18a2 olduğu belirlenen bandı görülmemektedir.

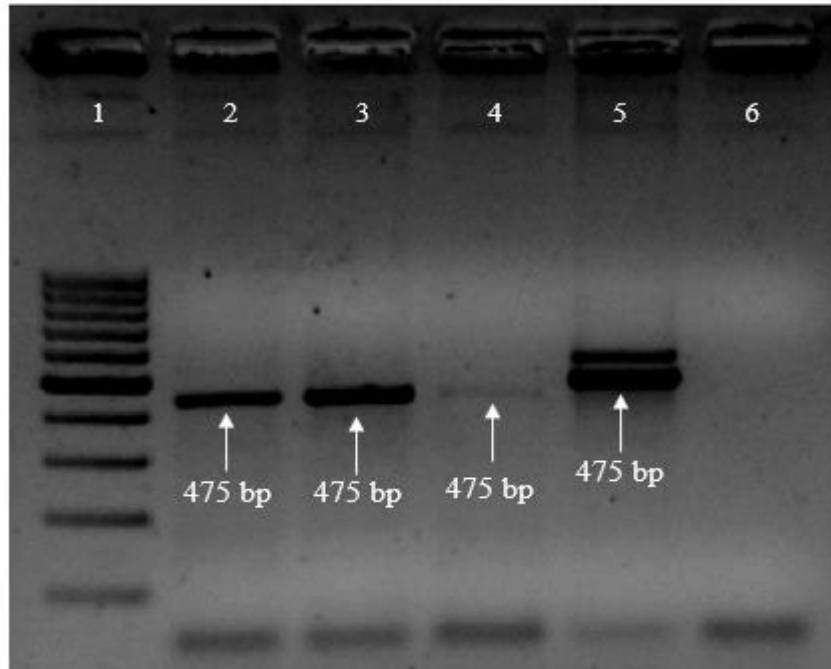
B) Sanger dizileme sonucu



Şekil 23: e18a2 füzyonunun yapısı



Şekil 24: p190 (e1a2) ifade eden örneklere ait jel görüntüsü. A) Sıra 1; 100 bp marker, 2; p190 e1a2 pozitif kontrol 521 bp, 3, 4; e1a2 pozitif örnekler 521 bp, 5; negatif kontrol. B) Sıra 1: 100bp marker, 2; p190 e1a2 pozitif kontrol 521 bp, 3; e1a2 pozitif örnek 521 bp, 4; negatif kontrol. (Bu görüntüde bahsedilen örneklerin sadece e1a2 pozitif bantları görülmektedir.)



Şekil 25: p230 (e19a2) ifade eden örneklere ait jel görüntüsü. Sıra1, 1; 100 bp marker, 2, 3, 4; p230 e19a2 pozitif örnekler 475 bp, 5; AR-230 e19a2 pozitif kontrol 475 bp, 6; negatif kontrol. Bu görüntüde bahsedilen örneklerin sadece e19a2 pozitif bantları görülmektedir.)

Direnç anı örneklerinde, transkript tipleri *ABL1*'de mutasyonu olan ve olmayan örnekler arasında değerlendirildi. 71 örneğin 34'ü, TKI tedavisine direnç ile ilişkili olduğu bilinen bir *ABL1* mutasyonuna sahipken, geri kalan 37 hastada ise *ABL1* mutasyonu yoktur. *ABL1*'de mutasyonu olan örneklerde, n=20 (%58,8) e14a2, n=7 (%20,5) e13a2 füzyonları saptandı. Ayrıca bu örneklerde, n=3 (%8,8) e14a2/e13a2, n=1 (%2,9) e14a2/e1a2, 3 (%8,8) e14a2/e19a2 birlikte ekspresyonları görüldü. *ABL1* mutasyonu olmayan örneklerde, n=22 (%59,5) e14a2, n=9 (%24,3) e13a2 füzyonları belirlendi. Bunlara ek olarak n=3 (%8,1) e14a2/e13a2, n=1 (%2,7) e14a2/e1a2, n=1 (%2,7) e14a2/e13a2/e1a2/e19a2, n=1 (%2,7) e13a2/e18a2 birlikte ekspresyonları saptandı. *ABL1* mutasyonu olan ve olmayan örnekler, taşıdıkları füzyonlara göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 23).

Tablo 23: Direnç anı örneklerinde iki grup arasında füzyon transkriptlerinin dağılımı

	e14a2	e13a2	e14a2/ e13a2	e14a2/ e1a2	e13a2/ e1a2	e14a2/ e19a2	e14a2/ e13a2/ e1a2/ e19a2	e13a2/ e18a2
<i>ABL1</i>'de mutasyonu olan (n=34)	20 (%58,8)	7 (%20,5)	3 (%8,8)	0	1 (%2,9)	3 (%8,8)	0	0
<i>ABL1</i>'de mutasyonu olmayan (n=37)	22 (%59,5)	9 (%24,3)	3 (%8,1)	1 (%2,7)	0	0	1 (%2,7)	1 (%2,7)
<i>p değeri</i>	0,956	0,706	0,913	0,334	0,293	0,064	0,334	0,334

4.2.3. İlk geliş ve Direnç Anı Örneklerinin Karşılaştırılması

İlk geliş ve direnç anı örnekleri transkript tipleri açısından karşılaştırıldığında, e14a2, e13a2, e14a2/e13a2 füzyonları ilk geliş örneklerinde sırasıyla; n=54, %48,6; n=39, %35,1; n=17, %15,3 olarak bulundu. Direnç anı örneklerinde ise bu oranlar sırasıyla; n=42, %59,2; n=16 %22,5; n=6 %8,4'tü. p210 füzyonları ile birlikte ifade edilen, atipik nadir e1a2 ve e19a2 transkriptleri e13a2/e1a2 n= 1 %1,4; e14a2/e1a2 n=1, %1,4; e14a2/e19a2 n=3, %4,2 ile direnç anı örneklerinde görüldü. İlk geliş örneklerinde bu füzyonlar görülmemiştir.

İlk geliş ve direnç anı örneklerinde birer örnekte e13a2/atipik füzyonları belirlendi. Tüm verilerin p değerleri hesaplandığında yalnızca e14a2/e19a2 koekspresyonunun varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,02$) (Tablo 24).

Tablo 24: Tüm örneklerin ilk geliş ve direnç anı örnekleri olarak karşılaştırılması

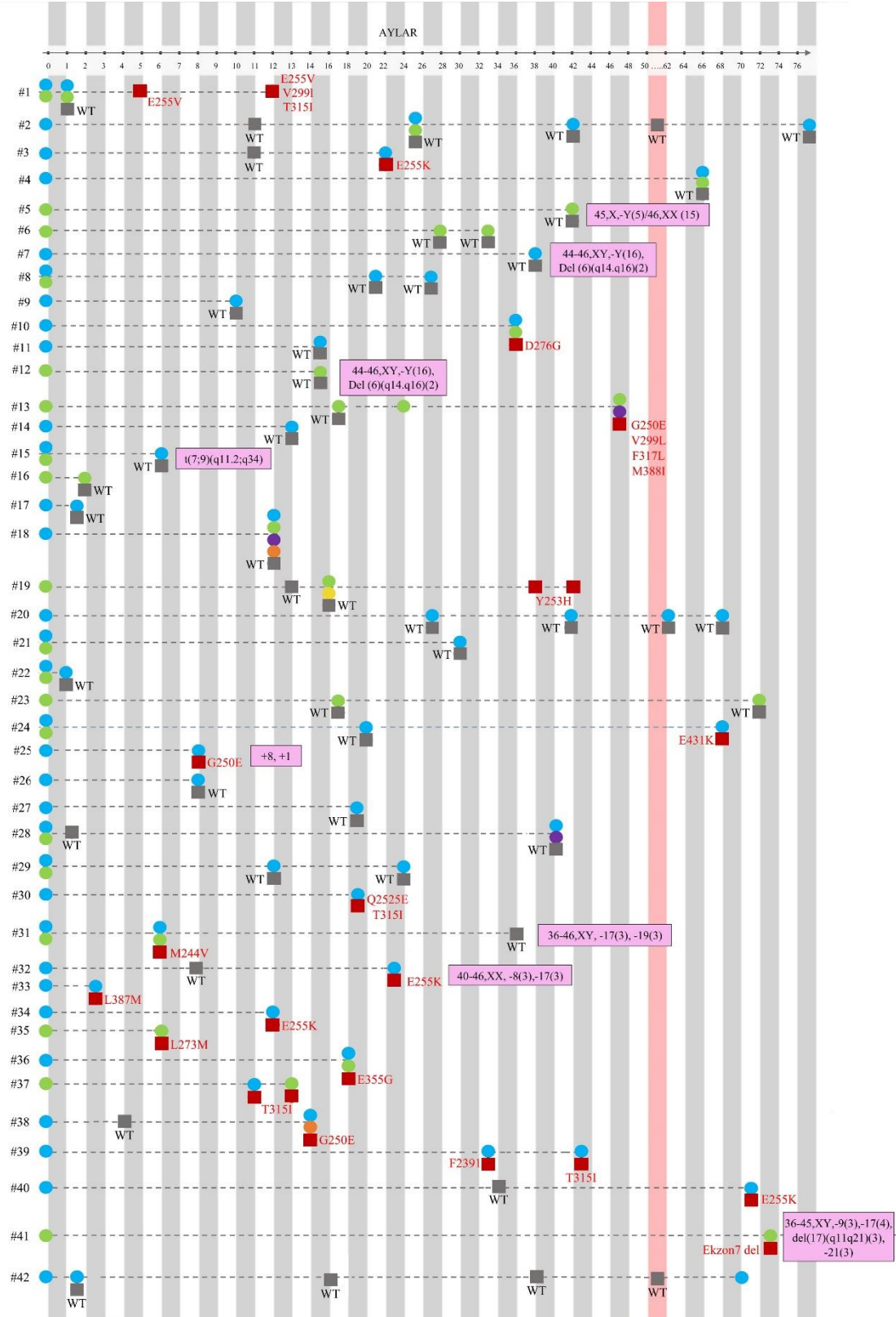
	e14a2	e13a2	e14a2/ e13a2	e14a2/ e1a2	e13a2/ e1a2	e14a2/ e19a2	e14a2/e13a2/ e19a2/e1a2	e13a2/ atipik
İlk geliş (n=111)	54 (%48,6)	39 (%35,1)	17 (%15,3)	0	0	0	0	1 (%0,9)
Direnç anı (n=71)	42 (%59,2)	16 (%22,5)	6 (%8,4)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	3 (%4,2)	1 (%1,4)	1 (%1,4)
p değeri	0,110	0,071	0,174	0,209	0,209	0,02*	0,209	0,748

4.3. Koekspresyonların Çalışma Grubundaki Dağılımı

İlk geliş ve direnç anı örneklerinde herhangi bir füzyonu birlikte ifade eden örnekler koekspresyon olan örnekler olarak değerlendirildi. İlk geliş örnekleri koekspresyon açısından değerlendirildiğinde, 111 örnekte birlikte ekspresyon görülen örnek sayısı 18 (%16,2)'di ve bu örneklerde sadece p210 e14a2a2/e13a2 ve e13a2/atipik füzyonlarının koekspresyonu görüldü. Direnç anı örnekleri koekspresyon açısından değerlendirildiğinde ise 71 örnekte 13 (%18,3) örneğin koekspresyona sahip olduğu saptandı. Bu verilere ait p değeri 0,714 olarak hesaplandı.

4.4. Eşlenik Örneklerin Değerlendirilmesi

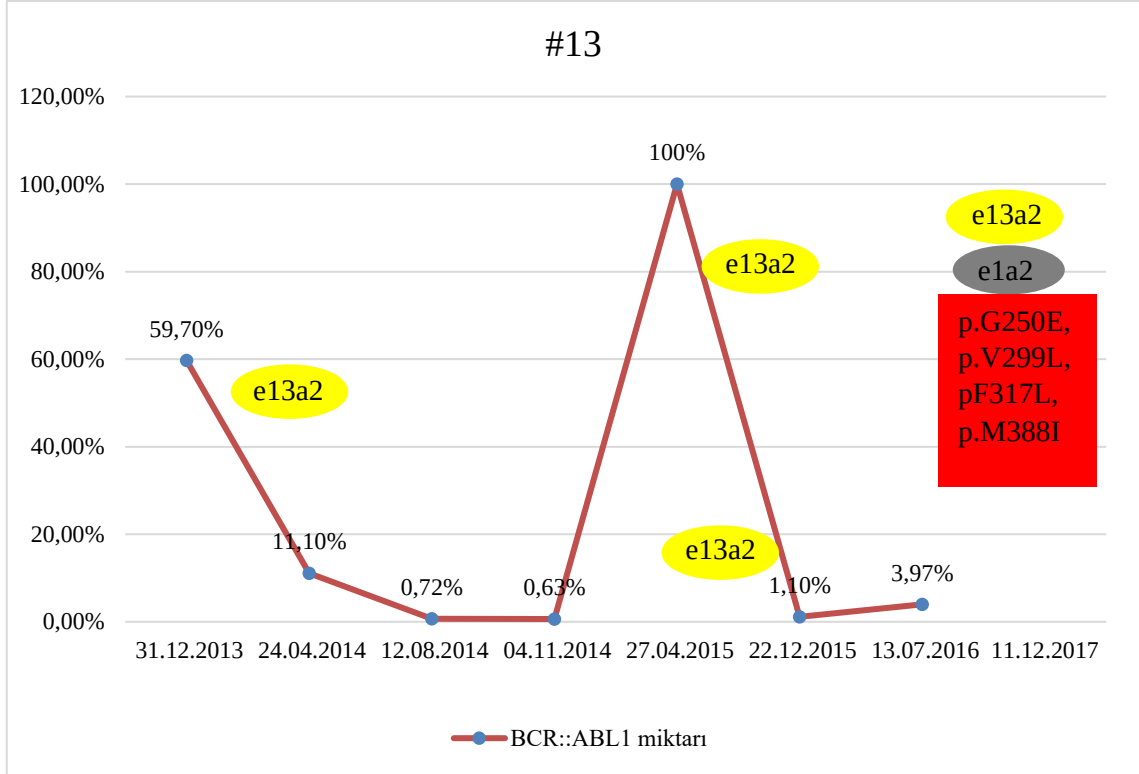
Çalışmadaki 125 hastanın 42'si eşlenik örneklere sahip hastalardır. Bu eşlenik örneklerin ifade ettiği füzyon tiplerinin iki gruptaki değişimi, ABL mutasyon durumları ve atipik nadir füzyon varlığı Şekil 26'da verildi. Burada bazı hastalara ait mutasyon sonuçları Erbilgin ve ark. (98) daha önce yayınladığı ve Sanger ile yeni nesil dizilemenin karşılaştırıldığı çalışmadan elde edilmiştir.



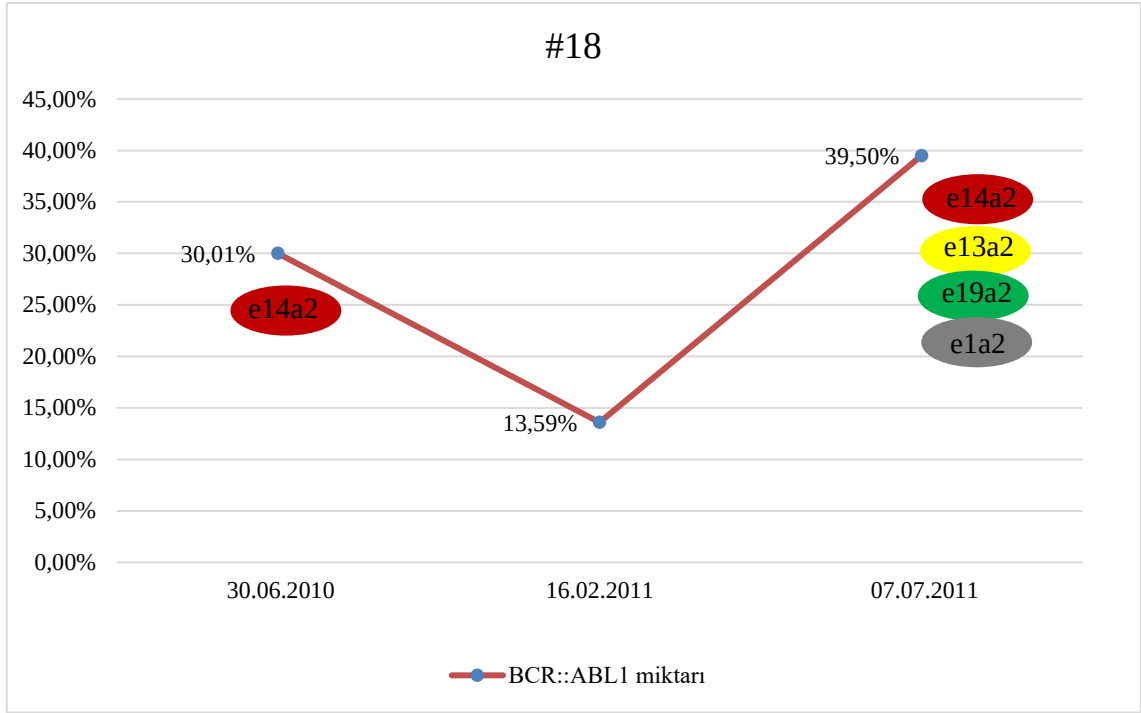
Şekil 26: Eşlenik örneklerdeki füzyon tiplerinin aylara göre dağılımları ve *ABL1* mutasyon durumları. P210 füzyonları, mavi; e14a2, yeşil; e13a2, Gri; *ABL1* wild tip, kırmızı; *ABL1* mutasyonu, mor; p190 e1a2, turuncu; p230 e19a2, sarı; e18a2. Pembe kutulara hastalara ait t(9;22)'ye ek sitogenetik bulgular verilmiştir.

4.5. Farklı Füzyonları İfade Eden Örneklerin Değerlendirilmesi

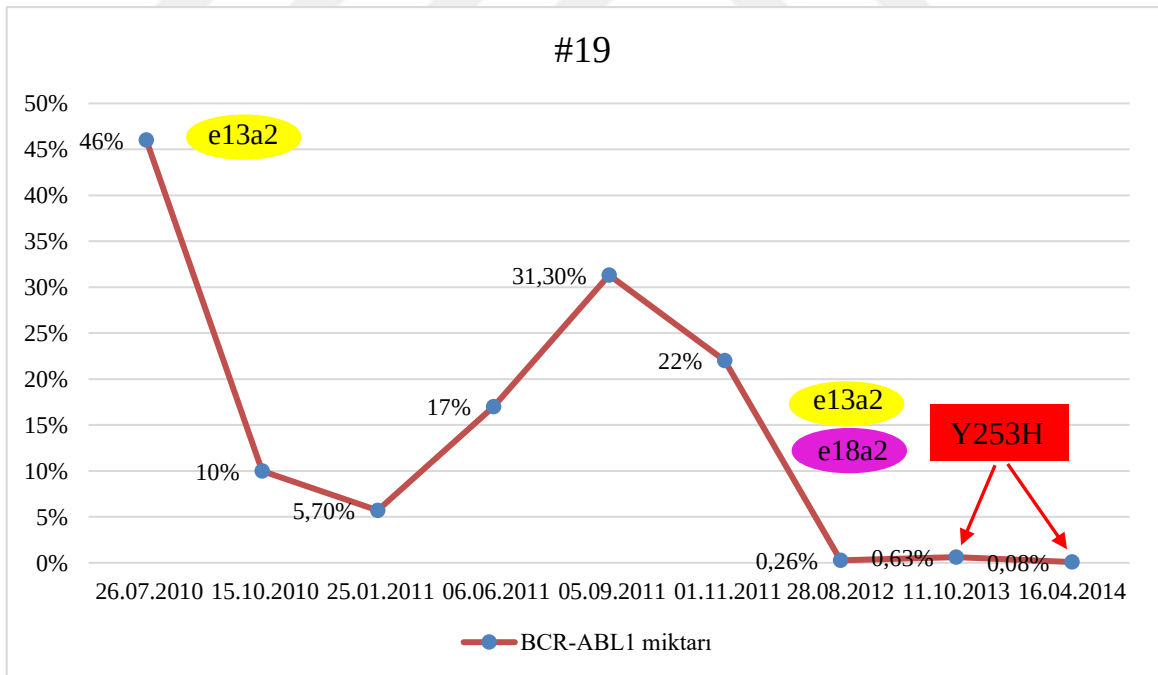
Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinin laboratuvarımıza başvurduğu süreler dahilinde periyodik olarak *BCR::ABL1* seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışma kapsamında da hastalara ait farklı zaman örneklerinin füzyon tipleri belirlendi ve böylece atipik ve nadir füzyonları ifade eden örnekler ayrıca değerlendirildi.



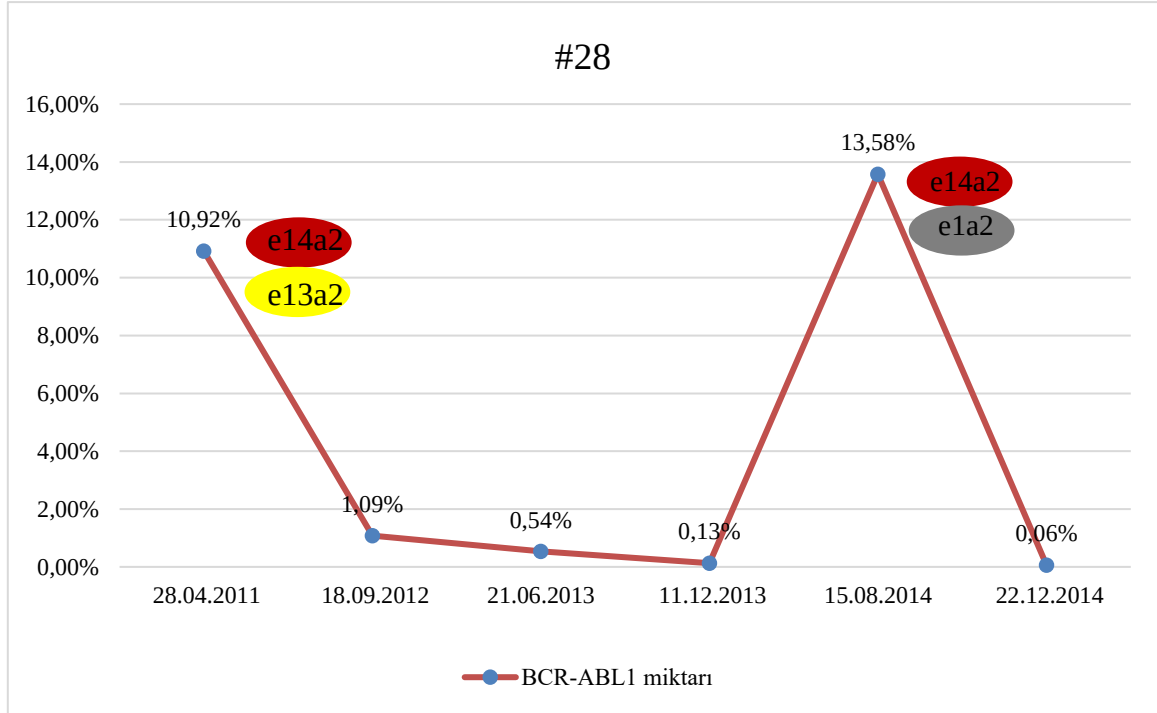
Şekil 27: #13 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.



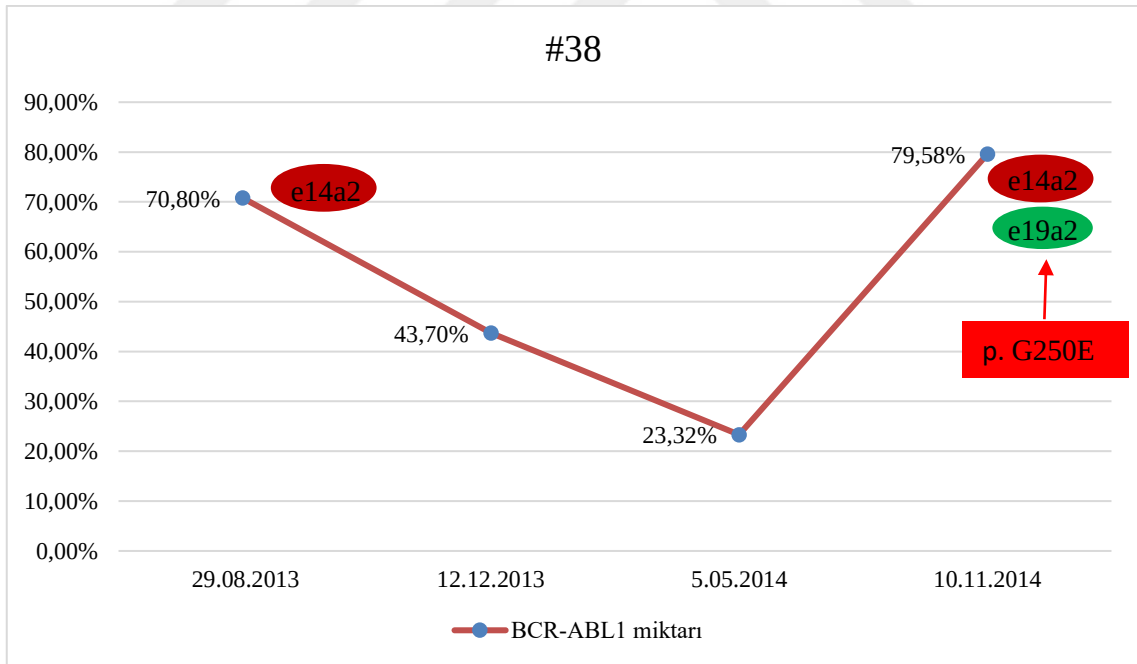
Şekil 28: #18 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.



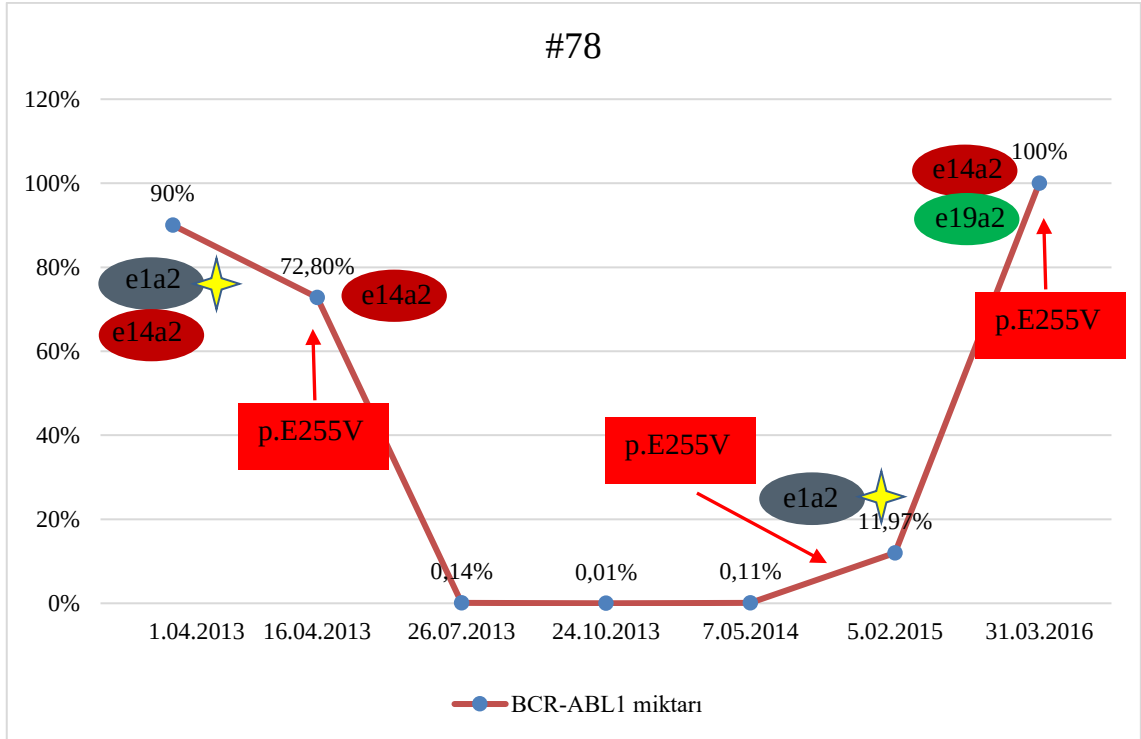
Şekil 29: #19 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.



Şekil 30: #28 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.



Şekil 31: #38 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği.



Şekil 32: #78 nolu örneğe ait *BCR::ABL1* anlatım düzeyleri ve belirlenen zamanlardaki kırık tiplerini gösteren çizgi grafiği. (✦ işaretli füzyonlar belirlenirken QRT-PCR tekniği kullanılmıştır.)

5. TARTIŞMA

KML hastalarında, *BCR::ABL1* füzyonunun kantitatif takibi tedavi yanıtının değerlendirilmesi için önemlidir. Bazı KML hastaları t(9;22) p210 füzyonlarının yanı sıra KML’de nadir görülen p190 ve p230 füzyonlarını ve diğer atipik füzyonları da ifade edebilir. Farklı kırık tiplerinin tanı, tedavi ve hastalığın seyri üzerine önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Hastalık süresince bu kırık tiplerinin karakterizasyonu, hastalığın klinik seyri ve tedavi yanıtı, direnç/toksisite ve nüks durumları için önemli sonuçlar verebilir. Bu tez çalışmasında KML tanısı almış 125 hastaya ait 182 örnek 8 farklı kırık tipi bakımından tanımlanmış ve saptanan kırık tiplerinin hastalığın seyri, direnç/toksisite ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

KML hastalarının ilk geliş örneklerinde e14a2 (%48,6), e13a2 (%35,1) kırık tipleri ve e14a2/e13a2 birlikte ekspresyonu (%15,3) saptanmıştır. Ayrıca bir hastada da e13a2/atipik kırık birlikteliği görülmüştür. Sık görülen transkript tipi açısından değerlendirildiğinde literatürdeki veriler çelişkili olsa da genel olarak çalışma kohortlarında e14a2 füzyonunun e13a2 füzyonundan daha sık olduğu bildirilmektedir (99-102).

Çalışmamızda, transkript tiplerinin cinsiyetlerdeki dağılımı incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte, e14a2’nin kadınlarda erkeklere göre daha sık olduğu gözlenirken (kadınlarda %55,3, erkeklerde %45,2), e13a2 ve e14a2/e13a2 için, kadınların erkeklere göre sıklığı daha düşük olarak görülmüştür. Tüm dünyadan 113 merkezin katıldığı çok geniş kapsamlı bir çalışmada, Baccarani ve arkadaşları 45 ülkeden 45503 yeni tanı KML hastasında kırık tiplerini sistematik bir şekilde incelemişlerdir. Hastaların yaş, cinsiyet ve etnik dağılımlarının detaylı olarak incelendiği bu çalışmada, bulgularımızla benzer olarak e13a2 kırığının erkeklerde (%39,2) kadınlara oranla (%36,2) daha fazla olduğu bildirilmektedir (100). Osman ve ark. araştırmasında, erkek KML hastaların e13a2, buna karşın kadın hastaların ise e14a2 ifade etme eğilimi gösterdiğini ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir ($p= 0.017$) (103). Lin ve ark. 166 hasta ile yaptığı retrospektif çalışmada ise e13a2 füzyonunun istatistiksel bir farklılık olmamakla birlikte kadınlarda (%38,2), erkeklere (%35,6) göre daha fazla olduğu, e14a2 füzyonunun ise kadın ve erkeklerde aynı oranda ifade edildiği bildirilmiştir (104). Yine aynı çalışmada e14a2/e13a2 füzyonlarını birlikte ifade etme oranının erkeklerde daha fazla olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda transkript tiplerinin cinsiyete göre dağılımlarının farklılık gösterebileceği belirtilirken, toplumsal farklılıklar nedeni ile transkript tipinin genel ve cinsiyet üzerindeki dağılımı toplumlarda değişkenlik gösterebilmektedir. Bilgimiz dahilinde, *BCR::ABL1* transkript dağılımları ile ilişkili bir Türkiye verisi bulunmamaktadır. Çalışmamız tek merkezli de olsa, bu dağılımı gösteren ilk çalışma olması nedeni ile önemlidir.

Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu, direnç zamanı örneklerinde belirlenen alternatif kırılma ürünlerinin dağılımlarıdır. Dirençli KML hastalarında saptadığımız füzyonlardan %59'un e14a2 iken, %22'si e13a2 tipinde ve %8,4 kadarında ise 14a2/e13a2 birlikte ifadesi belirlenmiştir. Dirençli hasta grubunda kırık tiplerinin incelendiği yakın tarihli bir yayın olan Kagita ve ark. nın çalışmasında, imatinib dirençli örneklerin %61'inde e14a2 füzyonu görülmüştür. Ayrıca, e14a2 değişimleri taşıyan tanı KML örneklerinin kısmi tedavi yanıtı olan hastalarda hematolojik yanıtı olan hastalara göre (%66 vs %59,85) daha sık olduğu tespit edilmiştir(105).

Tanı örneklerinin çalışıldığı bazı yayınlarda, e13a2 füzyonuna sahip hastaların MR oranlarının, bu füzyonu taşımayan hastalara göre daha düşük olduğu bildirilmiş ve bu füzyona sahip hastalar daha yüksek riskli hastalar olarak değerlendirilmiştir (101, 106-108). Buna karşın, görece daha az sayıda örneklem ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda da anlamlı bir ilişki gösterilememiştir (102, 109-111). Bu bilgiler ışığında ve elde ettiğimiz verilere göre e14a2 insidansının direnç anı örneklerinde artması, e14a2'nin kötü yanıt ve prognozla ilişkili olduğu sonucunu desteklemektedir.

Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu da koekspresyon verileridir. İlk geliş örneklerinde e14a2/e13a2 birlikte ekspresyonu direnç zamanı örneklerine göre daha fazladır. Upadhyay ve ark. yaptıkları çalışmada, e14a2/e13a2 koekspresyonuna sahip hastaların *BCR::ABL1* yüksek ekspresyon sergiledikleri, bununla birlikte en iyi tedavi yanıtını gösterdikleri belirtilmiştir. Bu hastaların, verilen tedavi ile nispeten daha stabil kalan ve tek bir füzyonu ifade eden örneklere kıyasla daha düşük nüks oranı gösteren hastalar olduğunu bildirmişlerdir (112). e14a2/e13a2 koekspresyonu taşıyan hastaların tedaviye en iyi yanıt veren hastalar olduğu düşünüldüğünde, çalışmamızdaki direnç anı örneklerinde e14a2/e13a2 insidansının düşük olması sonucunu destekler niteliktedir. Ayrıca bu çalışmada, kadınlarda erkeklere göre nüksün daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (112). Çalışmamızdaki takip örneklem grubunda, %15,3 e14a2/e13a2 birlikte ekspresyonu belirlenmiştir. Baccarani ve ark. 113 merkez katılımlı

çalışmalarında, her iki M-BCR transkriptini eş zamanlı ifade eden toplam hasta oranını %7,6 olarak bildirmişlerdir (100). İki çalışma arasındaki farklılığı, Baccarani ve ark. çalışmasında açıkça görülen, e14a2/e13a2 sıklığının toplumlarda oldukça farklı olması ile açıklanabilir. Kagita ve ark. çalışmalarında, takip örneklerinde e14a2/e13a2 füzyonlarını birlikte ifade eden örnek bulunmadığını, dirençli örneklerde ise %5,3 oranında e14a2/e13a2 sıklığı bildirmişlerdir. Tanı grubumuzdaki sıklık, dirençli örneklerde belirlenen e14a2/e13a2 koekspresyonunun sıklığı (%8,4) ile uyumlu değildir (105).

Direnç zamanı örneklerinde ayrıca KML'de nadir ve atipik füzyonlar olarak değerlendirilen; e14a2/e1a2, e13a2/e1a2, e14a2/e13a2/e1a2/e19a2, e14a2/e19a2 ve e13a2/e18a2 füzyonlarının birlikte ifadesi görülmüştür. Bu örneklerde görülen p190 e1a2 ve p230 e19a2 füzyon tiplerinin varlığı KML'de tedavi planlanması ve hastalık seyrinin değerlendirilmesi için oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda p190 füzyonuna sahip KML hastalarının riskli grup olarak değerlendirilmesi ve farklı tedavi yaklaşımlarının uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Verma ve ark, e1a2 ifade ettiğini belirledikleri beş KML hastasından 3'ünün miyeloid blastik faza, 1'inin lenfoid blastik faza ve 1'nin akselere fazla ilerlediğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu hastaların geç MMR elde ettiklerini ve TKI tedavisine daha düşük yanıt verdiklerini bildirmişlerdir (113). Literatürde bir kaç çalışmada, p190 *BCR::ABL1*'li hastalarda TKI'lere nispeten zayıf yanıt ve kötü prognoz bildirilmiştir (99, 114). P230 (e19a2) füzyonu ise başlangıçta normal splenomegali ve iyi huylu bir klinik seyir ile karakterize, nadir bir hastalık olan Ph+ kronik nötrofilik lösemi (KNL) olarak adlandırılan hafif bir KML formu gösteren hastalarda tanımlanmıştır (115-117). Daha sonra, tipik KML'li hastalarda veya oldukça agresif bir klinik seyri olan hastalarda e19a2 yeniden düzenlemesi saptanmıştır (118-120). Arana-Trejo ve ark. yaptıkları çalışmada yüksek riskli klinik özelliklere sahip hastalarda p210/p230 ve p190/p210/p230 füzyonları belirlenmiştir. P230 proteininin ifade edildiği KML hastaları yüksek riskli olarak kabul edilen nötrofilik KML ve trombositopeni fenotipli KML ile ilişkilendirilir ve bu hastalar sıklıkla belirgin trombositopeni ve splenomegali gösterir (121). Qin ve ark. e19a2 transkriptine sahip beş hastanın, ikinci nesil TKI'lere daha iyi yanıt veriyor gibi görüldüğünü ve bu hastaların tedavi yanıtlarını ve sonuçlarını iyileştirmek için birinci basamak tedavi olarak ikinci nesil TKI'lerin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (122).

Çalışmamızda, e13a2/e18a2 füzyonlarını ifade eden bir hasta bulunmuştur. Literatürde e18a2 ile ilgili 3 vaka sunumu bulunmuştur; 2'sinde e18a2 füzyonuna kırılma noktasından *ABL* intron 1b'nin dahil olduğu bildirilmiştir (123, 124). Diğerinde ise e18a2/e19a2 koekpresyonunun varlığı belirtilmiştir (125). Çalışmamızda, bir tanı/taki örneğinde saptanan e13a2/atipik füzyonu birlikteliğinde, atipik füzyonun intronik diziler (e13a2ins) içerdiği ve e13a2ins füzyonuna eklenen dizilerin stop kodunu oluşturduğu tespit edilmiştir. Böylece bu varyantın bir *BCR::ABL1* proteinine çevrilmeyeceği anlaşılmıştır. Daha önce Hirota ve ark. yine bir stop kodonu oluşturan e14a2ins varyantını bir Ph⁺ ALL vakasında bildirmişlerdir (126).

Takip örnekleri bulunan altı dirençli hastanın, farklı zamanlardaki örneklerinde yaptığımız çalışmalarda, mutasyondan bağımsız olarak tedavi ile birlikte hastaların ifade ettikleri kırık tiplerinin değiştiği görülmektedir. #18 numaralı KML olgusunda artan *t*(9;22) düzeyleri ile birlikte dört farklı kırık tipini ifade etmeye başladığı görülmektedir. #13, #19, #28, #38 ve #78 numaralı olguların tanı zamanında saptanan alternatif kırılma ürününe direnç zamanında yeni tip füzyonlar eklenmiştir. #18 numaralı örnekte p210 füzyonlarına ek olarak p190 ve p230 füzyonlarının dahil olması, hücre içi farklı sinyal yollarının kullanılması ve farklı hücrel lokalizasyonlar ile farklı alt hedeflerin fosforile edilmesi yoluyla, *ABL1* mutasyonu olmaksızın direnç oluşumuna ve ilaç duyarlılığını azaltarak *BCR::ABL1* miktarının artmasına sebep olabilir. e14a2 ve e13a2 füzyonlarının farklı tedavi yanıtı ile ilişkisi hala tartışılmaktadır. e14'ün e13'ten farklı olarak, kodladığı 25 aminoasit dizisinin iki füzyondaki aminoasitlerinin ikincil yapı elemanları olan SH1,2,3 ve DNA bağlanma alanlarında farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (127). #13, #18, #19, #28, #38 ve #78 nolu örneklerde görülen ilk geliş ve direnç anında ifade edilen p210 transkrip tipinin değişimi ve farklı transkriptlerin ortaya çıkışı olası klonal değişim ve alternatif kırılmada gerçekleşen farklılıklar ile açıklanabilir. Sonuç olarak #13, #19, #38 ve #78 nolu örneklerde direnci, *ABL1* mutasyonu ile atipik nadir transkriptler birlikte yönetiyor gibi görünmektedir.

Atipik ve nadir *BCR::ABL1* füzyonlarının hücre içi sinyal iletimi ile ilişkili olan önemli moleküller üzerine etkisi bazı çalışmalarda ele alınmıştır. Cutler ve ark. yaptıkları çalışmada JAK/STAT gibi önemli hücrel yolların p190 ve p210 *BCR::ABL1* tarafından farklı şekilde aktive edildiğini ve farklı hücre altı kompartmanları ile etkileşim gösteren moleküllerle birleştiği bildirmişlerdir.

p210 *BCR::ABL1* durumunda, membrana proksimal olan aktif moleküllerde artmış birleşme gözlenirken, p190 *BCR::ABL1* durumunda hücre iskeleti moleküllerinde birleşmenin gözlemlendiği belirtilmiştir (128). Reckel ve ark. yaptıkları çalışmada; p190 ve p210 proteomlarının hücre içi farklı lokalizasyon hipotezinden yola çıkarak, bu iki izoformun farklı alt sinyal interaktomlarını etkilediğini bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada her iki izoformun ortak etkileşiminde Ship2 fosfataz ve Grb2/Sos kompleksinin varlığı bildirilmiştir (129). P210 *BCR::ABL1*, Sts1 fosfataz ile daha güçlü bir ilişki ve Stat5 transkripsiyon faktörünün yanı sıra Erk1/2 ve Fyn/Lck kinazlarının daha yüksek aktivasyonunu gösterirken, p190, AP2 kompleksi ve klatrin ile daha güçlü bir ilişki ve Dok1 adaptörünün ve Lyn kinazın daha yüksek aktivasyonunu gösterdiği belirtilmiştir (129, 130). Ek olarak, fare modellerinde Lyn'in B-ALL oluşumu için önemli olduğu ve Lyn upregülasyonunun imatinib direncine aracılık ettiği bildirilmiştir (131). Tüm bu bilgiler KML'de nadir ve atipik *BCR::ABL1* füzyonlarının kötü prognoz ve dirence olan katkısını açıklar niteliktedir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında;

- KML hasta grubunda t(9;22)'nin 8 farklı alternatif kırılma ürünü ve atipik kırıkların dağılımı belirlenmiştir.
- *BCR::ABL1* füzyon tiplerinin sıklığının genel olarak ve cinsiyetler arası dağılımının toplumlar arası farklılık gösterdiği görülmüştür.
- Direnç zamanı örneklerinde, hastaların ilk gelişlerinde tespit edilen füzyon tiplerinden farklı füzyonların bulunduğu görülmüştür. Bu konuda yapılmış tek yayın bulunmaktadır. Bu yayında hastalar belli bir düzen içinde takip edilmiş olup füzyon tipleri ve *BCR::ABL1* miktarı arasındaki ilişkiye odaklanılmıştır. Ancak atipik ve nadir transkriptler değerlendirilmemiştir. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, hastaların *ABL1* mutasyonu taşımasa da, tedavi yanıtı düşük olduğu için *ABL1* mutasyonu taraması için laboratuvarımıza gönderilen direnç anı örnekleri ile çalışılmış ve bunlar dirençli örnekler kabul edilmiştir. Böylece mutasyon taşımayan hastaların da tedaviye neden optimal yanıt oluşturmadığının açıklanması hedeflenmiştir. Bu çalışmadan farklı bir diğer nokta, atipik nadir füzyonların araştırılmasıdır. Böylece bu füzyonların KML sürecine katkısı ve tedavi yanıtı ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

- Dirençli hastalarda ve eşlenik takip örneklerinde yapılan incelemeler, başlangıçtaki e13a2 ve e14a2/e13a2 füzyonlarının direnç anında azaldığı, e14a2'nin ise arttığı ve atipik füzyonların ortaya çıktığı görülmüştür. Buna dayanarak, e14a2 füzyonunun KML'de direnç ve düşük tedavi yanıtı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yine direnç anı örneklerinde görülen atipik ve nadir transkriptler bu füzyonların direnç oluşumunda rol oynadığını destekler niteliktedir.

Bu çalışmanın kısıtları;

- Hastalara örneklerinin, özellikle atipik ve nadir transkriptleri ifade eden hastaların tüm zamanlara ait örneklerinin değerlendirilememiş olması.
- Alternatif füzyonların belirlenmesinde, Real Time PZR gibi daha hasas tekniklerin kullanılamamış olması.

KAYNAKLAR

1. Foroni L, Wilson G, Gerrard G, Mason J, Grimwade D, White HE, et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;153(2):179-90.
2. Chereda B, Melo, J. V. The Biology and Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Chronic Myeloid Leukemia*. Annals of Hematology: Springer; 2016.
3. Derneği TH. Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Kronik Myeloid Lösemi (KML) Tanı ve Tedavi Kılavuzu. In: derneği TH, editor. 2016.
4. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(6):2343-55.
5. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(3):545-68, vii-viii.
6. Sonali C. Sonar KSB. An Efficient Technique for White Blood Cells: Nuclei Automatic Segmentation. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2015;6(5).
7. Sell S. Leukemia: stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. *Stem Cell Rev*. 2005;1(3):197-205.
8. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(6):2162-8.
9. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1330-40.
10. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015;94 Suppl 2:S107-21.
11. Timothy P. Hughes DMR, Junia V. Melo. *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia*: Springer; 2016.
12. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85-109.
13. Baikie AG, Court-Brown WM, Buckton KE, Harnden DG, Jacobs PA, Tough IM. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1960;188:1165-6.
14. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
15. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res*. 1970;30(8):2213-22.
16. Goff SP, Gilboa E, Witte ON, Baltimore D. Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell*. 1980;22(3):777-85.
17. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984;37(3):1035-42.
18. Canaani E, Gale RP, Steiner-Saltz D, Berrebi A, Aghai E, Januszewicz E. Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 1984;1(8377):593-5.
19. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-30.
20. John M. Goldman GQD. *Myeloproliferative Disorders*. 1-13 p.

21. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2020;95(6):691-709.
22. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35:48.
23. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, van der Velden VH, Wai H, Bottcher S, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*. 2009;23(6):1106-17.
24. Bernt KM, Hunger SP. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol*. 2014;4:54.
25. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal*. 2010;3(139):re6.
26. Khatri A, Wang J, Pendergast AM. Multifunctional Abl kinases in health and disease. *J Cell Sci*. 2016;129(1):9-16.
27. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, et al. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol*. 1991;11(4):1785-92.
28. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 1991;67(3):459-68.
29. Losson H, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. HDAC6-an Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
30. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7587-95.
31. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev*. 2003;55(3):401-23.
32. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*. 2016;101(5):541-58.
33. Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):840-53.
34. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.
35. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J*. 1999;18(17):4754-65.
36. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*. 2000;96(6):2269-76.
37. Thomas EK, Cancelas JA, Chae HD, Cox AD, Keller PJ, Perrotti D, et al. Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell*. 2007;12(5):467-78.
38. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(2-3):129-57.
39. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75(1):175-85.
40. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2002;1(5):479-92.

41. Notari M, Neviani P, Santhanam R, Blaser BW, Chang JS, Galletta A, et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood*. 2006;107(6):2507-16.
42. Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, Rohrer J, Brown MP, Bunting KD, et al. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood*. 2000;96(6):2277-83.
43. Hoelbl A, Kovacic B, Kerenyi MA, Simma O, Warsch W, Cui Y, et al. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*. 2006;107(12):4898-906.
44. Holtschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F, et al. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell*. 1996;87(2):307-17.
45. Hao SX, Ren R. Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol Cell Biol*. 2000;20(4):1149-61.
46. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004;119(3):431-43.
47. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2254-64.
48. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2015;385(9976):1447-59.
49. Zitvogel L, Rusakiewicz S, Routy B, Ayyoub M, Kroemer G. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(7):431-46.
50. Patel AB, O'Hare T, Deininger MW. Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(4):589-612.
51. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):28-39.
52. Sorel N, Cayssials E, Brizard F, Chomel JC. Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017;75(2):129-45.
53. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, et al. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2011;29(11):1046-51.
54. Manouchehri A, Kanu E, Mauro MJ, Aday AW, Lindner JR, Moslehi J. Tyrosine Kinase Inhibitors in Leukemia and Cardiovascular Events: From Mechanism to Patient Care. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(2):301-8.
55. Yang K, Fu LW. Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;93(3):277-92.
56. Zimmermann J, Caravatti G, Mett H, Meyer T, Muller M, Lydon NB, et al. Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch Pharm (Weinheim)*. 1996;329(7):371-6.
57. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2531-41.
58. Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood*. 2009;114(24):4944-53.

59. Marchesi V. Haematological cancer: Nilotinib reduces emergence of BCR-ABL mutations in CML. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(5):248.
60. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):345-56.
61. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009;16(5):401-12.
62. Gozgit JM, Wong MJ, Wardwell S, Tyner JW, Loriaux MM, Mohemmad QK, et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1028-35.
63. Chase A, Bryant C, Score J, Cross NC. Ponatinib as targeted therapy for FGFR1 fusions associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Haematologica*. 2013;98(1):103-6.
64. Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells. *Cancer Res*. 2006;66(23):11314-22.
65. Ankathil R, Azlan H, Dzarr AA, Baba AA. Pharmacogenetics and the treatment of chronic myeloid leukemia: how relevant clinically? An update. *Pharmacogenomics*. 2018;19(5):475-393.
66. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell*. 2020;37(4):530-42.
67. Hochhaus A. Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 10:x274-9.
68. Wang W, Cortes JE, Tang G, Khoury JD, Wang S, Bueso-Ramos CE, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2016;127(22):2742-50.
69. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(7):2242-9.
70. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-80.
71. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. 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*. 2002;2(2):117-25.
72. Balabanov S, Braig M, Brummendorf TH. Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Drug Discov Today Technol*. 2014;11:89-99.
73. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:461-76.
74. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J, Nicolini FE, et al. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell*. 2014;26(3):428-42.

75. Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(5):515-29.
76. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, Talpaz M, Deininger MW, Martinelli G, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2014;38(1):10-20.
77. Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2005;65(19):8912-9.
78. Abrahamsson AE, Geron I, Gotlib J, Dao KH, Barroga CF, Newton IG, et al. Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3925-9.
79. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-67.
80. Zhao H, Deininger MW. Declaration of Bcr-Abl1 independence. *Leukemia*. 2020;34(11):2827-36.
81. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(1):33-44.
82. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y, Tanizaki R, Minami Y, et al. BCR-ABL-independent and RAS / MAPK pathway-dependent form of imatinib resistance in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cell line with activation of EphB4. *Eur J Haematol*. 2010;84(3):229-38.
83. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46:249-79.
84. Hentschel J, Rubio I, Eberhart M, Hipler C, Schiefner J, Schubert K, et al. BCR-ABL- and Ras-independent activation of Raf as a novel mechanism of Imatinib resistance in CML. *Int J Oncol*. 2011;39(3):585-91.
85. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995;86(2):726-36.
86. Burchert A, Wang Y, Cai D, von Bubnoff N, Paschka P, Muller-Brusselbach S, et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*. 2005;19(10):1774-82.
87. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):1018-29.
88. Etten RAV. Cellular and molecular biology of chronic myeloid leukemia. 2021.
89. Nicholson E, Holyoake T. The chronic myeloid leukemia stem cell. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9 Suppl 4:S376-81.
90. Loscocco F, Visani G, Galimberti S, Curti A, Isidori A. BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2019;9:939.
91. Yaghmaie M, Yeung CC. Molecular Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(5):395-404.
92. Cortes J, O'Dwyer ME. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(3):671-84, x.
93. Alves R, Goncalves AC, Rutella S, Almeida AM, De Las Rivas J, Trougakos IP, et al. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia-From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19).

94. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976;18(4):421-31.
95. Kubonishi I, Miyoshi I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int J Cell Cloning*. 1983;1(2):105-17.
96. Kakishita HWSMJNYUMKMKHKSSDDAKE. Establishment and Molecular Characterization of a Novel Leukemic Cell Line with Philadelphia Chromosome Expressing p230 BCR/ABL Fusion Protein. *Cancer Reseach*. 1995;55(14).
97. D. Ustek SS, A. Cakiris, F. Coflan, B. Oku, U. Özbek. Cloning of chimerical translocations as positive control for molecular genetic diagnosis of leukemia. *Turk J Hematol*. 25:20-3.
98. Erbilgin Y, Eskazan AE, Hatirnaz Ng O, Salihoglu A, Elverdi T, Firtina S, et al. Deep sequencing of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia patients with resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(1):200-7.
99. Arun AK, Senthamizhselvi A, Mani S, Vinodhini K, Janet NB, Lakshmi KM, et al. Frequency of rare BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(3):235-42.
100. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, Albeer A, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia*. 2019;33(5):1173-83.
101. Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, Iurlo A, Levato L, Albano F, et al. The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Am J Hematol*. 2017;92(8):797-805.
102. de Almeida Filho TP, Maia Filho PA, Barbosa MC, Dutra LLA, Castro MF, Duarte FB, et al. Does BCR-ABL transcript type influence the prognosis of patients in chronic myelogenous leukemia chronic phase? *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41(2):114-8.
103. Osman EA, Hamad K, Elmula IM, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol*. 2010;33(2):229-31.
104. Lin HX, Sjaarda J, Dyck J, Stringer R, Hillis C, Harvey M, et al. Gender and BCR-ABL transcript type are correlated with molecular response to imatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2016;96(4):360-6.
105. Sailaja Kagita TKM, Leela Digumarti, Sadasivudu Gundeti, Raghunadharao Digumarti. **Assessment of BCR-ABL1 Fusion Transcripts and Their Association with Response to Imatinib Treatment in Chronic Myeloid Leukemia Patients.** *Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology*. 2018(04:425-558).
106. Jain P, Kantarjian H, Patel KP, Gonzalez GN, Luthra R, Kanagal Shamanna R, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2016;127(10):1269-75.
107. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*. 2014;99(9):1441-7.
108. Chen K, Ruan Y, Tian K, Xiong P, Xia N, Li J, et al. Impact of BCR-ABL1 Transcript Type on Outcome in Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated With

Tyrosine Kinase Inhibitors: A Pairwise and Bayesian Network Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2022;12:841546.

109. de Lemos JA, de Oliveira CM, Scerni AC, Bentes AQ, Beltrao AC, Bentes IR, et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res.* 2005;4(4):803-11.

110. Azad NA, Shah ZA, Pandith AA, Khan MS, Rasool R, Rasool J, et al. Prognostic Implication of BCR-ABL Fusion Transcript Variants in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib. A First of Its Kind Study on CML Patients of Kashmir. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(6):1479-85.

111. Ercaliskan A, Eskazan AE. The impact of BCR-ABL1 transcript type on tyrosine kinase inhibitor responses and outcomes in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2018;124(19):3806-18.

112. Upadhyay V, Raval A, Shah K, Shah FD, Rawal R. A Prognostic and Predictive Study of BCR-ABL Expression Based on Characterization of Fusion Transcripts. *Indian J Clin Biochem.* 2020;35(1):88-94.

113. Verma D, Kantarjian HM, Jones D, Luthra R, Borthakur G, Verstovsek S, et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood.* 2009;114(11):2232-5.

114. Pardanani A, Tefferi A, Litzow MR, Zent C, Hogan WJ, McClure RF, et al. Chronic myeloid leukemia with p190BCR-ABL: prevalence, morphology, tyrosine kinase inhibitor response, and kinase domain mutation analysis. *Blood.* 2009;114(16):3502-3.

115. Greco M, Caocci G, La Nasa G. Early Complete Molecular Response to First-Line Nilotinib in Two Patients with Chronic Myeloid Leukemia Carrying the p230 Transcript. *Case Rep Hematol.* 2013;2013:871476.

116. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood.* 1996;88(7):2410-4.

117. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, et al. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1990;76(9):1819-24.

118. Mondal BC, Majumdar S, Dasgupta UB, Chaudhuri U, Chakrabarti P, Bhattacharyya S. e19a2 BCR-ABL fusion transcript in typical chronic myeloid leukaemia: a report of two cases. *J Clin Pathol.* 2006;59(10):1102-3.

119. Ohsaka A, Hoshino S, Kobayashi M, Kudo H, Kawaguchi R. Blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia carrying micro-bcr breakpoint (e19a2 and e191a). *Br J Haematol.* 2002;118(1):251-4.

120. Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene.* 2002;21(56):8652-67.

121. Arana-Trejo RM, Ruiz Sanchez E, Ignacio-Ibarra G, Baez de la Fuente E, Garces O, Gomez Morales E, et al. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clin Lab Haematol.* 2002;24(3):145-50.

122. Qin YZ, Jiang Q, Jiang H, Lai YY, Shi HX, Chen WM, et al. Prevalence and outcomes of uncommon BCR-ABL1 fusion transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia: data from a single centre. *Br J Haematol.* 2018;182(5):693-700.

123. Qin YZ, Liu YR, Li JL, Wang H, Chang Y, Fu JY, et al. [Two Ph chromosome positive chronic myelogenous leukemia patients with rare bcr/abl fusion gene]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2004;25(7):409-12.
124. van der Velden VH, Beverloo HB, Hoogeveen PG, Zwaan Ch M. A novel BCR-ABL fusion transcript (e18a2) in a child with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007;21(4):833-5.
125. Sheng HX, Zhou LN, Chen JL, Hu GL, Wang QH, Gao DG, et al. [Concurrence of e18a2 and e19a2 in Ph (+) chronic myelogenous leukemia: a case report and literature review]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2017;38(9):799-802.
126. Hirota M, Hidaka E, Ueno I, Ishikawa M, Asano N, Yamauchi K, et al. Novel BCR-ABL transcript containing an intronic sequence insert in a patient with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;110(4):867-70.
127. Hai A, Kizilbash NA, Zaidi SH, Alruwaili J, Shahzad K. Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. *Bioinformation*. 2014;10(3):108-14.
128. Cutler JA, Tahir R, Sreenivasamurthy SK, Mitchell C, Renuse S, Nirujogi RS, et al. Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia*. 2017;31(7):1513-24.
129. Reckel S, Hamelin R, Georgeon S, Armand F, Jolliet Q, Chiappe D, et al. Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*. 2017;31(7):1502-12.
130. Reckel S, Hantschel O. Bcr-Abl: one kinase, two isoforms, two diseases. *Oncotarget*. 2017;8(45):78257-8.
131. Wu J, Meng F, Kong LY, Peng Z, Ying Y, Bornmann WG, et al. Association between imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(13):926-39.

HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ HASTALARINDA FARKLI T(9;22)
KIRIKLARININ TESPİTİ VE TEDAVİ YANITI İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI'

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 9	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	onkotest.com İnternet Kaynağı	% 1
3	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.scialert.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

nek.istanbul.edu.tr:4444