

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEMATOLOJİK MALİGNANSİLERDE  
DÜŞÜK MOLEKÜLER  
AĞIRLIKLİ POLİPEPTİD-2 (LOW  
MOLECULAR WEIGHT POLYPEPTIDE-LMP2)  
VE DÜŞÜK MOLEKÜLER AĞIRLIKLİ  
POLİPEPTİD-7 (LMP7) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SELÇUK KÖK  
OCAK 2011**

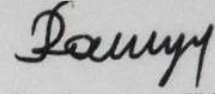
T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**Tezin Adı:** Hematolojik Malignansilerde Düşük MolekülerAğırlıklı Polipeptid-2 (Low Molecular Weight Polypeptide-Lmp2) ve Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-7 (Lmp7) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

**Öğrencinin, Adı Soyadı:** Selçuk KÖK

**Tez Savunma Tarihi:** 19 Ocak 2011

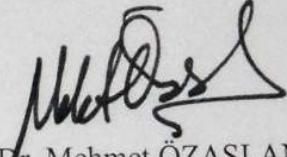
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Ramazan KOÇ

FBE Müdürü

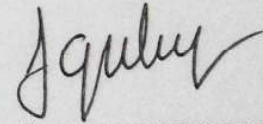
Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri:**

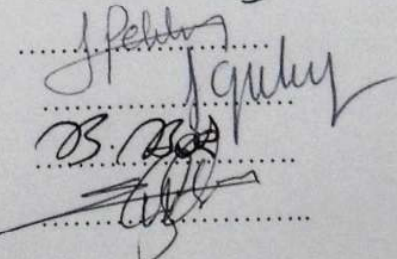
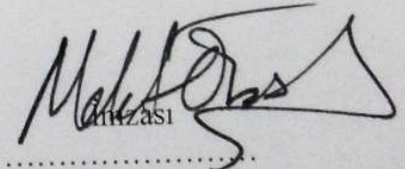
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN

Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL



**Hematolojik Malignansilerde  
Düşük Moleküler  
Ağırlıklı Polipeptid-2 (Low Molecular  
Weight Polypeptide-LMP 2) ve Düşük  
Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-7 (LMP 7)  
Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman  
Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER**

**SELÇUK KÖK  
OCAK 2011**

## ÖZET

### **Hematolojik Malignansilerde Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-2 (Low Molecular Weight Polypeptide-LMP2) ve Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-7 (LMP7) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

KÖK, Selçuk

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Ocak 2011, 60 sayfa

Bu çalışmada, LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin hematolojik malignansiler ile ilişkisi araştırılmıştır. Hematolojik malignansiler, kemik iliğinden türeyen hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. LMP2 ve LMP7 genleri MHC Sınıf II bölgesinde yer alan ve proteozom bileşenlerini oluşturan peptidleri kodlayan genlerdir. Bu genlerdeki polimorfizmlerin farklı hastalıklarla ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Hematolojik malignansilerin gelişiminde de bu gen polimorfizmlerinin etken olabileceği düşünülebilir. Çalışmada, KML (n=48), AML (n=27), KLL (n=23), ve MM (n=23) hasta gruplarında ve kontrol grubunda (n=110) LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilmiştir. LMP2-H allel frekansı AML hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli oranda yüksek ( $p=0.00$ ), MM hasta grubunda ise belirgin şekilde düşük ( $p=0.00$ ) bulunmuştur. LMP2 genotip dağılımı kontrol grubu ve KLL hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir ( $\chi^2=20.7$ ,  $p=0.000$ ). LMP7 gen polimorfizmi genotip dağılımı ve Q alleli frekansının kontrol ve KML hasta grubunda aynı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, LMP2 gen polimorfizminin AML, KLL ve MM; LMP7 gen polimorfizminin ise AML ve MM hastalıkları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hematolojik Malignansiler, LMP2, LMP7, Polimorfizm

## ABSTRACT

### **Analysis Of The Low Molecular Weight Polypeptide–2 (LMP2) And Low Molecular Weight Polypeptide–7 (LMP7) Gene Polymorphisms In Hematological Malignancies**

KÖK, Selçuk

M.Sc. in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

January 2011, 60 pages

In this study, the association between hematological malignancies and LMP2 and LMP7 gene polymorphisms were investigated. Hematologic malignancies is a group of neoplasms developing in the cells originated from the bone marrow. LMP2 and LMP7 genes, localized in the MHC Class II region, encode the proteosome components. There have been several studies demonstrating the possible association of these polymorphisms with different genetic disorders. It can be thought that these polymorphisms may also have a role in the development of hematological malignancies. In the study, CML (n=48), AML (n=27), CLL (n=23) and MM (n=23) patient groups and the control group (n=110) were analysed for the LMP2 and LMP7 gene polymorphisms by using PCR-RFLP method. It was found that the frequency of LMP2-H allele is significantly increased in AML ( $p=0$ ), but decreased in MM ( $p=0$ ) when compared to the control group. LMP2 genotype distribution showed statistically significant difference in control group and CLL patients ( $\chi^2=20.7$ ,  $p=0.000$ ). The genotype distribution of the LMP7 gene and LMP7-Q allele frequency was found to be the same in the control group and CML patients. As a result, it is thought that there might be an association between LMP2 gene polymorphism and AML, CLL, MM and between LMP7 gene polymorphism and AML, MM.

**Key words:** Hematologic malignancies, LMP2, LMP7, Polymorphism

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek teorik, gerekse de pratik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, tezimin her aşamasında sabrını benimle harcayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER' e,

Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN başta olmak üzere eğitimime katkı sağlayan tüm değerli hocalarıma,

Çalışmaya sağladıkları değerli katkılarından dolayı başta Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN olmak üzere tüm GAÜN, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyelerine ve Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN başta olmak üzere Tıbbi Biyoloji AD Öğretim Üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarında yanımda olarak desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Mol.Bio. Deniz MIHÇIOĞLU, Bio. Nazlı BOZMAN ve Bio. Sevgi GEZİCİ' ye,

ve son olarak benden tüm desteklerini esirgemeyen aileme,

en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                       | Sayfa No |
|---------------------------------------|----------|
| ÖZET.....                             | I        |
| ABSTRACT .....                        | II       |
| TEŞEKKÜR.....                         | III      |
| İÇİNDEKİLER .....                     | IV       |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                 | VI       |
| TABLolar LİSTESİ.....                 | VII      |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... | IX       |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| <b>BÖLÜM 1: GİRİŞ</b> .....                  | 1  |
| 1.1.Hematolojik Maligniteler.....            | 1  |
| 1.1.1.1.Akut Lösemiler.....                  | 4  |
| 1.1.1.1.1.Akut Myeloid Lösemi (AML).....     | 4  |
| 1.1.1.2.Kronik Lösemiler.....                | 8  |
| 1.1.1.2.1.Kronik Myeloid Lösemi (KML).....   | 8  |
| 1.1.1.2.3.Kronik Lenfositik Lösemi(KLL)..... | 11 |
| 1.1.1.2.4.Multipl myelom (MM).....           | 13 |
| 1.2.MHC Genleri.....                         | 16 |
| 1.2.1.LMP2 ve LMP7 Genleri.....              | 19 |
| 1.3. Amaç.....                               | 20 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <b>BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ</b> ..... | 22 |
|---------------------------------------|----|

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>BÖLÜM 3: MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....                               | 29 |
| 3.1. Örneklem.....                                                     | 29 |
| 3.2. DNA İzolasyonu.....                                               | 30 |
| 3.3. LMP2 ve LMP7 Genlerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması.....         | 32 |
| 3.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....                                     | 35 |
| 3.5. LMP2 ve LMP7 Gen Polimorfizmlerinin RFLP Tekniği ile Analizi..... | 36 |
| 3.6. Genotip Tayini .....                                              | 37 |

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7. İstatiksel Analizler.....                             | 38        |
| <b>BÖLÜM 4: BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>                  | <b>39</b> |
| 4.1 Örneklem ve DNA İzolasyonu.....                        | 39        |
| 4.2. LMP2 ve LMP7 Genlerinin PZR ile Çoğaltılması.....     | 39        |
| 4.3. LMP2 ve LMP7 Genlerinin RFLP Tekniği ile Analizi..... | 40        |
| 4.4. LMP2 Gen Polimorfizmi ve KML İlişkisi .....           | 41        |
| 4.5. LMP2 Gen Polimorfizmi ve AML İlişkisi.....            | 43        |
| 4.6. LMP2 Gen Polimorfizmi ve KLL İlişkisi.....            | 43        |
| 4.7. LMP2 Gen Polimorfizmi ve MM İlişkisi.....             | 44        |
| 4.8. LMP7 Gen Polimorfizmi ve KML İlişkisi.....            | 45        |
| 4.9. LMP7 Gen Polimorfizmi ve AML İlişkisi.....            | 45        |
| 4.10. LMP7 Gen Polimorfizmi ve KLL İlişkisi.....           | 46        |
| 4.11. LMP7 Gen Polimorfizmi ve MM İlişkisi.....            | 47        |
| 4.12. Hardy-Weinberg Dengesinin Test Edilmesi.....         | 48        |
| <b>BÖLÜM 5: SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                     | <b>52</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                      | <b>53</b> |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                            | Sayfa No |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 1.1: Kan hücrelerinin farklılaşması.....                                                             | 2        |
| Şekil 1.2: Filadelfiya Kromozomunun oluşum mekanizması.....                                                | 10       |
| Şekil 1.3. 6p 21.1-21.3 üzerinde yerleşik MHC bölgesinin gen haritası.....                                 | 21       |
| Şekil 4.1. LMP2 geninin PZR ile çoğaltılması sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi..... | 39       |
| Şekil 4.2. LMP7 geninin PZR ile çoğaltılması sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi..... | 40       |
| Şekil 4.3. LMP2 gen polimorfizminin Hha I enzim kesimiyle analizi.....                                     | 40       |
| Şekil 4.4. LMP7 gen polimorfizminin Bsm I enzim kesimiyle analizi.....                                     | 41       |

## TABLÖLAR LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.1.</b> Kanslerle ilişkili olduğu bilinen genlerden bazıları.....                                                            | 3  |
| <b>Tablo 1.2.</b> Hematolojik malignitelerle ilişkilendirilen yapısal ve/veya sayısal kromozomal anomalilerinin bazıları .....         | 4  |
| <b>Tablo 1.3.</b> AML’de FAB Sınıflaması.....                                                                                          | 6  |
| <b>Tablo 1.4.</b> Dünya Sağlık Örgütü’ ne göre Akut lösemilerin sınıflandırması .....                                                  | 7  |
| <b>Tablo 1.5.</b> KLL için NCI-WG ve IWCLL Tanı Kriterleri .....                                                                       | 12 |
| <b>Tablo 1.6.</b> Rai Evrelendirmesi.....                                                                                              | 12 |
| <b>Tablo 1.7.</b> Binet Evrelendirmesi.....                                                                                            | 13 |
| <b>Tablo 1.8.</b> MM’de Majör ve Minör Tanı Kriterleri.....                                                                            | 14 |
| <b>Tablo 1.9.</b> Durie- Salmon Evreleme Sistemi.....                                                                                  | 15 |
| <b>Tablo 1.10.</b> MM için önerilen İnternasyonal Prognostik İndeks (IPI).....                                                         | 16 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı.....                                                           | 28 |
| <b>Tablo 3.2.</b> LMP2 ve LMP7 genlerinin çoğaltılmasında kullanılan özgül primer dizileri.....                                        | 32 |
| <b>Tablo 3.3.</b> LMP2 ve LMP7 genlerinin çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon içeriği.....                                          | 33 |
| <b>Tablo 3.4.</b> PZR işleminin gerçekleştirildiği ısı döngüleri.....                                                                  | 33 |
| <b>Tablo 3.5.</b> LMP2 gen bölgesinin Hha I ile Kesim Koşulları.....                                                                   | 35 |
| <b>Tablo 3.6.</b> LMP7 gen bölgesinin Bsm I ile Kesim Koşulları.....                                                                   | 36 |
| <b>Tablo 3.7.</b> Kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri.....                                       | 36 |
| <b>Tablo 3.8.</b> Kesim sonucunda elde edilen bantlara göre LMP2 genotiplendirme.....                                                  | 37 |
| <b>Tablo 3.9.</b> Kesim sonucunda elde edilen bantlara göre LMP7 genotiplendirme.....                                                  | 37 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve kontrol grubunda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekanslarının karşılaştırılması..... | 42 |
| <b>Tablo 4.2.</b> KML ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması.....                                           | 41 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.3.</b> AML ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması | 43 |
| <b>Tablo 4.4.</b> KLL ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması | 44 |
| <b>Tablo 4.5.</b> MM ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması  | 45 |
| <b>Tablo 4.6.</b> KML ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması | 45 |
| <b>Tablo 4.7.</b> AML ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması | 46 |
| <b>Tablo 4.8.</b> KLL ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması | 47 |
| <b>Tablo 4.9.</b> MM ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması  | 47 |
| <b>Tablo 4.10.</b> Çalışılan hastalıklarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmi ilişkisi       | 48 |
| <b>Tablo 4.11.</b> . Bazı hastalıklarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri ilişkisi       | 50 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                      |                                                                          |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| A                    | :Adenin                                                                  |
| aa                   | :aminoasit                                                               |
| AML                  | :Akut Lenfoblastik Lösemi                                                |
| bç                   | :baz çifti                                                               |
| C                    | :Sitozin                                                                 |
| dk                   | :dakika                                                                  |
| DNA                  | :Deoksiribonükleik asit                                                  |
| dNTP                 | :deoksiribonükleozid trifosfat                                           |
| EDTA                 | :Etilen Diamin Tetra Asetik Asit                                         |
| G                    | :Guanin                                                                  |
| GP                   | :Geri primer                                                             |
| HL                   | :Hodking Lenfoma                                                         |
| HLA                  | :Human Leukocyte Antigens (İnsan Lokosit Antijenleri)                    |
| İP                   | :İleri primer                                                            |
| KML                  | :Kronik Myeloid Lösemi                                                   |
| KLL                  | :Kronik Lenfoblastik Lösemi                                              |
| LMP                  | :Low Molecular Weight Polypeptide (Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptit) |
| Na <sub>2</sub> EDTA | :Sodyum EDTA                                                             |
| NHL                  | :Non Hodking Lenfoma                                                     |
| MM                   | :Multiple Myeloma                                                        |
| mg                   | :miligram                                                                |
| MgCl <sub>2</sub>    | :Magnezyum Klorür                                                        |
| MHC                  | :Major Histocompatibility Complex (Ana Doku Uyuşum Bileşeni)             |
| mM                   | :milimolar                                                               |
| NFκB                 | :Nükleer Faktör Kappa B                                                  |
| p                    | :Anlamlılık değeri                                                       |
| PZR                  | :Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                             |
| pmol                 | :pikomol                                                                 |
| RFLP                 | :Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi                                 |
| rpm                  | :Dakikadaki devir sayısı                                                 |
| SPSS                 | :Statistical Package for Social Sciences Version                         |
| SDS                  | :Sodyum Dodesil Sülfat                                                   |
| T                    | :Timin                                                                   |
| Taq                  | :Thermus aquaticus                                                       |
| TBE                  | :Tris Borik Asit EDTA                                                    |
| TE                   | :Tris-EDTA                                                               |
| Tm                   | :Melting temperature                                                     |
| u                    | :unit (birim)                                                            |
| V                    | :Volt                                                                    |
| μl                   | :mikro litre                                                             |
| μM                   | :mikro molar                                                             |
| μg                   | :mikrogram                                                               |

WHO :World Healt Organization  
 $\chi^2$  :Ki kare

## **BÖLÜM 1**

### **GİRİŞ**

Herhangi bir hastalığın oluşumunda ve tedavi amaçlı uygulanan ilaca verilen yanıtta çevre, yaş, beslenme, yaşam biçimi gibi faktörlere ek olarak, kişilerin genetik yapıları da etkindir. Bu nedenle, toplumlardaki genetik varyasyonların ve bireylerdeki gen mutasyonlarının çalışılması kanser oluşum riskinin, ilaç toksisitesi ve etkinliğinin belirlenmesinde yararlı olmaktadır (Ekmekçi vd, 2008).

Genetik farklılıklar, ilaç metabolizmasını değiştirerek ya da enzim ve/veya reseptörleri, substrat ya da ligantlara olan bağlanma etkilerini değiştirerek organizmanın ilaca olan yatkınlıklarını etkileyebilmektedir (Bennet ve vd., 1996). Bireyler arasındaki bu farklılığın çeşitli kanser, diyabet, kardiyovasküler ve mental hastalıkların moleküler temelini oluşturabileceği düşünülmektedir. Bireyler arasındaki farklılıkların aydınlatılmasıyla, ileride kişiye özel tedavi yaklaşımları geliştirilebilecektir (Johnson, 2003).

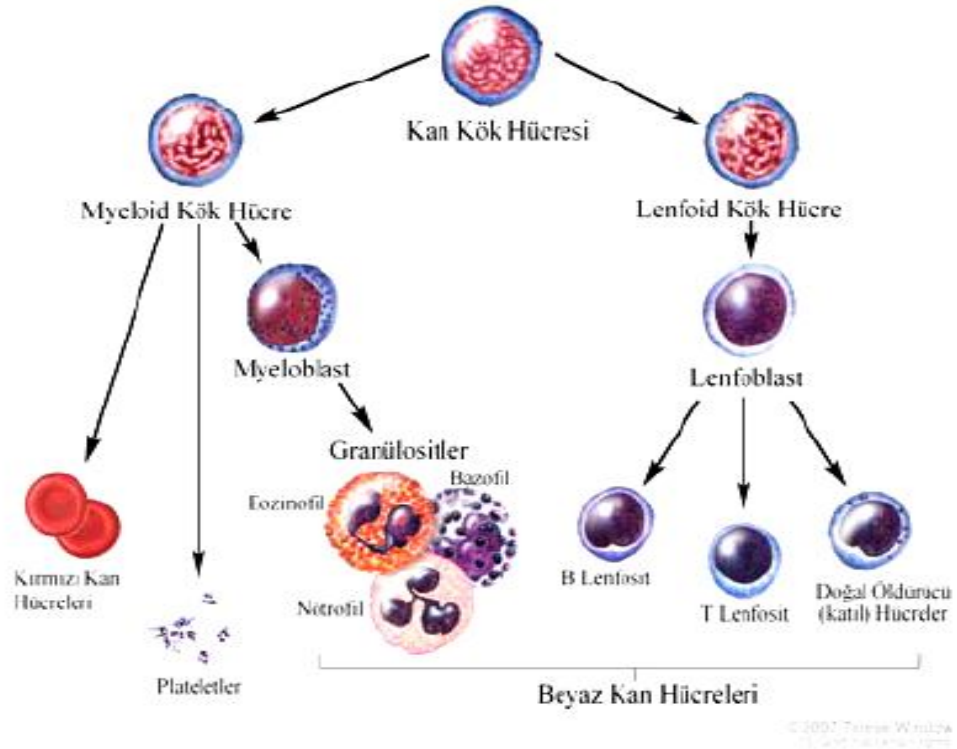
Kanser, çok sayıda genin aynı hücre içerisinde uzun bir zaman dilimi içerisinde mutasyona uğrayarak, hücrenin kontrol edilemez biçimde büyüme ve yayılma özelliği kazanması sonucu gelişen bir hastalıktır (Altıok, 2008). İnsanlardaki mutasyonlar, kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir (Ekmekçi vd, 2008).

#### **1.1. Hematolojik Maligniteler**

Kemik iliğindeki öncü hücrelerden; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve plateletler oluşmaktadır (Şekil 1.1). Hematolojik kanserler, kemik iliğinden türeyen

hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hematolojik tümörlerin büyük bir çoğunluğunun yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kromozom anomalileri gen ifadesinin bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteinin oluşmasına yol açmaktadırlar (Pala, 2005).

Hematolojik kanserlerin oluşumunda kromozom translokasyonları çok önemli bir rol oynamaktadır. Hematopoietik neoplazmların yaklaşık %50'sinde somatik kromozom translokasyonu sonucu bir protoonkogenin aktif hale geçmesi söz konusudur. Bu olay hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki hassas dengenin hücre proliferasyonu lehine dönmesine neden olmaktadır. Kromozom translokasyonu sonucu bir neoplazmanın gelişmesindeki faktör, bir protoonkogenin onkogen haline dönüşmesi veya aşırı ifadesi gibi, bir tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu kaybederek onkogenleri baskılayamaması da olabilir. Bazen de bir translokasyon sonucu normalde vücutta bulunmayan yeni bir kimerik protein ortaya çıkabilmektedir (Deviren, 2005). Kanserle ilişkisi tanımlanmış çok sayıda gen bulunmaktadır (Tablo 1.1), bu genler genel olarak onkogenler, tümör baskılayıcı genler veya bekçi (kapıcı) genler şeklinde 3 ana grupta ele alınmaktadır.



**Şekil 1.1.** Kan hücrelerinin farklılaşması

**Tablo 1.1.** Kanslerle ilişkili olduğu bilinen genlerden bazıları (Deviren, 2005)

| Gen sembolü | Gen ismi                                       | Kromozom |
|-------------|------------------------------------------------|----------|
| Abl         | Onkogen:Abelson mürin lösemi virüsü            | 9        |
| ERBB        | Onkogen:ERBB                                   | 7        |
| ERV1        | Endojen retrovirüs                             | 18       |
| FES         | Onkogen:Feline sarkom virüsü                   | 15       |
| FMS         | Onkogen:FMS(Mc Donough feline sarkom virüsü)   | 5        |
| FOS         | Onkogen:FOS:FBJ osteosarkom virüsü             | 2        |
| HRAS1       | Harvey rat sarkoma-1 protoonkogen              | 11       |
| INT1        | Onkogen:INT:Mürine meme kanser onkogeni        | 12       |
| KRAS1       | Kristen Rat Sarkoma Protoonkogeni1             | 6        |
| KRAS2       | Kristen Rat Sarkoma Protoonkogeni2             | 12       |
| MEN2        | Multiple endokrin neoplasia tip2 (Sipple Send) | 20       |
| MOS         | Onkogen: Moloney mürine sarkoma virüsü         | 8        |
| MYB         | Onkogen:Avina myeloblastosis virus             | 6        |
| MYC         | Onkogen:Myelomatosis (Myelocytomatosis) virus  | 8        |
| NRAS        | Onkogen:NRAS                                   | 1        |
| RAF1        | Onkogen:RAF1                                   | 3        |
| RB1         | Retinoblastoma geni                            | 13       |
| SRC         | Onkogen:SRC (Ras Sarkoma)                      | 20       |
| WAGR        | WilmsTümör/Aniridi/Gonadoblastoma/Retardasyon  | 11       |

Hematolojik kanserlerin sınıflandırılması üç temel özellik esas alınarak yapılır. Hastalığın gidişini ve hücre olgunluğunu esas alan Akut-Kronik, malign hücrelerin köken aldığı hücre tipinin esas alındığı Lenfoid-Myeloid, tutulum bölgesinin esas alındığı kan ve kemik iliği bölge tutulumu ön planda (lösemi), doku tutulumunun ön planda olması (lenfoid kökenlilere lenfoma, myeloid kökenlilere granülositik sarkom) özelliklerini değişik kombinasyonlarda birleştirerek, hematolojik kanserleri sınıflandırmak mümkündür ( Harris vd., 1999).

**Tablo 1.2.** Hematolojik malignitelerle ilişkilendirilen yapısal ve/veya sayısal kromozomal anomalilerinin bazıları (Pala, 2005)

| Hematolojik malignite          | Prognozu etkileyen kromozom anomalileri                                                                                 |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Akut Lenfoblastik Lösemi       | t (12.21) (p12; q22), t (9; 22) (q34;q11);<br>t (4, 11) (q21, q23), t (1; 19) (q23; p13), t (1.14),<br>del 1p32         |
| Kronik Lenfositik Lösemi       | +12, del 11q, del 17p13, del 13q14                                                                                      |
| Diffüz büyük B hücreli lenfoma | t (3, var) (q27, var), t (14.18), t (8.14), mutasyon<br>ve/veya del17p13                                                |
| Mantle hücreli lenfoma         | t (11.14), +3q ve del 11q                                                                                               |
| Miyelom                        | -13, del 13q, del 11q, t (11.14), t (4.14), t (6.14),<br>t (14.16)                                                      |
| Akut miyeloid lösemi           | t (8.21) (q22; q22), t (15.17) (q22; q12), inv (16)<br>(p13q22) t (16; 16) (p13; q22),<br>del 11q23, del 5q, del 7q, +8 |
| Miyelodisplastik sendrom       | -5, -7, del 7q, del 5q                                                                                                  |
| Kronik miyeloid lösemi         | t (9.22) (q34, q11)                                                                                                     |
| Diffüz büyük B hücreli lenfoma | t (14.18) del p53, t (3, var) (q27, var)                                                                                |
| Folikül merkez hücreli lenfoma | t (14.18) del 9p21-22 +p53                                                                                              |

### 1.1.1.Akut Lösemiler

#### 1.1.1.1.Akut Myeloid Lösemi (AML)

Akut lösemiler hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu ve klonal proliferasyonu sonucu kemik iliğinde immatür hücrelerin artışıyla oluşan malign hastalıklardır (Haznedar, 2003). Kontrolsüz çoğalan blastlar, kemik iliği, lenfatik dokular, karaciğer ve merkezi sinir sistemi (MSS) gibi hayati organlarda

invazyona sebep olarak fonksiyon bozukluđuna yol açar. AML’li hastalar tedavi edilmezlerse ortalama 3-4 ay kadar yaşarlar (Üskent, 2006).

Akut lösemiler, lenfoid veya miyelositer serinin tutulumuna göre başlıca 2 ana gruba ayrılır. Akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) % 80’i çocuklarda görülür ve erişkin ALL’lere göre daha iyi prognoza sahiptir. Buna karşın akut miyelositer lösemilerin (AML) % 90’ı erişkinlerde ortaya çıkar. AML’deki malign hücre daha çok monosit veya miyeloid farklılaşma gösteren blasttır. Yüzde 5-10’unda megakaryositik veya eritroid farklılaşma görülebilir (Üskent, 2006).

AML tüm kanserlerin % 1’ini oluşturur. Görülme yaşı ortalama 60’dır. Görülme oranı gelişmiş ülkelerde ve endüstrileşmiş şehirlerde yüksektir. AML’nin yıllık insidansı 3,4/100.000’dir. Otuz yaş öncesi bu insidans 1/100.000 iken 75 yaş sonrası 17/100.000’e ulaşır. Genetik faktörlerin AML’nin etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Tek yumurta ikizlerinin birinde 10 yaşımdan önce lösemi gelişirse; diğer ikizinde 1/5 olasılıkla lösemi gelişebileceğı rapor edilmiştir. Trizomi 21 (Down), trizomi 13 (Patau) ve XXY (Klinifelter) gibi somatik hücre kromozom anomalisi olan birçok sendromda AML görülme riski artmıştır. Bloom Sendromu, Monozomi 7, Fanconi Anemisi ve Ataksia Telenjektazia gibi birçok otozomal resesif hastalıkta akut lösemi oluşturmaya eğilimli kromozom dengesizlikleri vardır. İnsan T-hücre lenfotropik virüs tip 1 (HTLVI), erişkin T hücre lösemisinin sebebi olarak düşünülmektedir (Haznedar, 2003).

X ışınları ve iyonize edici diğer ışınlar lösemi yapabilir. AML gelişme riskinin büyüklüğü radyasyonun dozuna, zaman içinde dağılımına ve kişinin yaşına bağlıdır. Kısa sürede yüksek doz radyasyona maruz kalmış genç kişilerde bu risk daha yüksektir. Herhangi bir sebepten dolayı radyoterapi alan hastalarda AML gelişebilir. Hodgkin hastalığının kemoterapisinde kullanılan MOPP protokolünde yer alan prokarbazin lökomojeniktir ve bu olgularda radyoterapinin de ilaç tedavisine kombine edilmesi akut lösemiye yatkınlığı artırır. Kozmik radyasyona maruz kalan kokpit pilotlarında da artmış AML riski mevcuttur (Kantarcı, 2008).

Başka bir malign hastalık sonrası görülen lösemilere sekonder lösemi adı verilir. Bunun en iyi bilinen ve en sık rastlanan örneğı Hodgkin Hastalığı sonrası görülen lösemilerdir. Ayrıca Hodgkin dışı lenfomalar, meme veya over gibi organ tümörleri

tedavisi sonrasında da sekonder lösemi gelişebilir. Sekonder kanser gelişiminde, lökomojenik ilaçlar, radyoterapi ve kişinin bağışıklık sisteminin rolü vardır. Kronik miyelositik lösemi (KML), miyelodisplastik sendrom (MDS) ve paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH) gibi bazı hematolojik hastalıklar, doğal seyri sırasında AML'ye dönüşebilmektedir (Haznedar vd., 2003).

Akut lösemiler; morfolojik, sitokimyasal, hücre yüzey belirteçleri ve onkogen ifadesine göre farklı şekillerde sınıflanabilmektedir. AML ve ALL'nin ayırıcı tanısı önemlidir. Çünkü bu iki hastalık birbirinden klinik davranış, prognoz ve tedaviye cevap açısından belirgin farklılıklar gösterir. AML'ye morfolojik olarak ilk yaklaşım 1976 yılında Fransız-Amerikan-British (FAB) konfederasyon grubu tarafından yapılmıştır (Schwartz vd., 1988). FAB sınıflamasında akut lösemiler, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır (Tablo 1.3). Ancak bu sınıflama şekli; immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermemektedir (Ali, 2006). Ayrıca, FAB sınıflamasında Hiposellüler AML, mix AML, myeloproliferatif hastalıklarla çakışan eozinofilik, bazofilik, mast hücreli lösemiler yer almamaktadır (Kantarıcı, 2008).

**Tablo 1.3.** AML'de FAB Sınıflaması (Schwartz vd., 1988)

Alt Tip Tanımlama

|      |                                                            |
|------|------------------------------------------------------------|
| M0   | Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi     |
| M1   | Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi           |
| M2   | Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi |
| M3   | Akut promiyelositer lösemi                                 |
| M3V  | Akut varyant promiyelositer lösemi (mikrogranuler)         |
| M4   | Akut miyelomonositer lösemi                                |
| M4Eo | Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi                    |
| M5a  | Akut monoblastik lösemi                                    |
| M5b  | Akut monositer lösemi                                      |
| M6   | Akut eritrolösemi                                          |
| M7   | Akut megakaryoblastik lösemi                               |

Dünya sağlık örgütü (WHO) 1997’de yeni bir sınıflama önermiştir. Bu sınıflama klinik immunofenotipik ve sitogenetik özellikleri de içerdiği için yalnızca morfoloji tabanlı olan FAB sınıflamasından daha üstündür. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından tanımlanan 5 majör kategorizasyon vardır (Wardiman vd., 2002).

Hastalık genelde akut olarak başlar. Semptomlar hemen daima sitopenilere bağlı olarak gelişir. Bazen lösemik hücrelerin kemik iliğini ayrıca dokuları infiltrate etmesine bağlı semptomlar da görülür. Sitopeniler sonucu anemi ve anemiye bağlı semptomlar, nötropeni sonucu enfeksiyonlar ve ateş, trombositopeniye bağlı kanamalar en sık bulgulardır. En sık rastlanan klinik bulgu birkaç aydır olan yorgunluk ve kırıklık hissidir. Lösemiden veya enfeksiyona sekonder ateş, hastaların % 15-20’sinde görülür ve terleme ile birlikte dir. Peteşi, epistaksis, dişeti kanaması, vücutta morluklar, menoraji, retina kanaması ile kendini gösteren kanama, hastaların tanı anında yaklaşık yarısında mevcuttur (Kantarıcı, 2008).

**Tablo 1.4 . Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ ne göre Akut lösemilerin sınıflandırması** (Wardiman vd., 2002).

• **Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML’ler**

t (8;21) (q22;q22), (AML 1 ETO) ile AML

İnv.(16) (p13q22) veya t(16;16)(p13q22), (CBF  $\beta$ / MYH11) ile AML

Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)q(22;22), (PML/RAR $\alpha$ ) ile AML

11q23 (MLL) anomalisi ile AML

• **Çoklu displazisi olan AML**

Önceden myelodisplastik sendromu olan

Önceden myelodisplastik sendromu olmayan

• **AML ve myelodisplastik sendromlar tedaviye bağlı**

Alkilleyici ajan ile ilişkili

Epipodofilotoksin ile ilişkili

Diğer tipler

• **Başka türlü sınıflanmamış AML’ler**

Minimal diferansiye AML

Olgunlaşmamış AML

**Tablo 1.4 .(devam)** Dünya Sağlık Örgütü' ne göre Akut lösemilerin sınıflandırması (Wardiman vd., 2002).

|                                        |
|----------------------------------------|
| Olgunlaşmış AML                        |
| Akut myelomonositik lösemi             |
| Akut monositik lösemi                  |
| Akut eritroid lösemi                   |
| Akut megakaryositik lösemi             |
| Akut bazofilik lösemi                  |
| Myelofibrozla beraber panmiyelo        |
| Myeloid sarkom                         |
| • Kökeni belirlenememiş akut lösemiler |

### 1.1.2.Kronik Lösemiler

#### 1.1.2.1.Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Kronik miyeloid lösemi (KML), kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılır. KML, primitif pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi, çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve splenomegali ile karakterizedir. Akut lösemide varolan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. Diğer myeloproliferatif hastalıklar; polisitemia vera (PV), myelofibroz (AMM) ve esansiyel trombositemi (ET)'dir. KML, üç fazlı bir hastalıktır. KML'nin klinikopatolojik seyri; kronik faz, akselere faz, ve blastik fazdan oluşmaktadır (Haznedaroğlu, 2007).

**Kronik faz,** kan ve kemik iliğinde blast hücre sayısının % 5' den az olduğu evredir. Herhangi bir belirti bulunmayabilir veya hafif belirtiler görülebilir. KML hastalarının çoğu birkaç aydan birkaç yıla sürebilen tanı alır.

**Akselere Faz,** hastaların lösemi hücrelerinin daha hızlı arttığı daha tehlikeli bir evredir. Blast sayısı yaklaşık % 15'e yükselir. Bu evre haftalar veya aylar sürebilir.

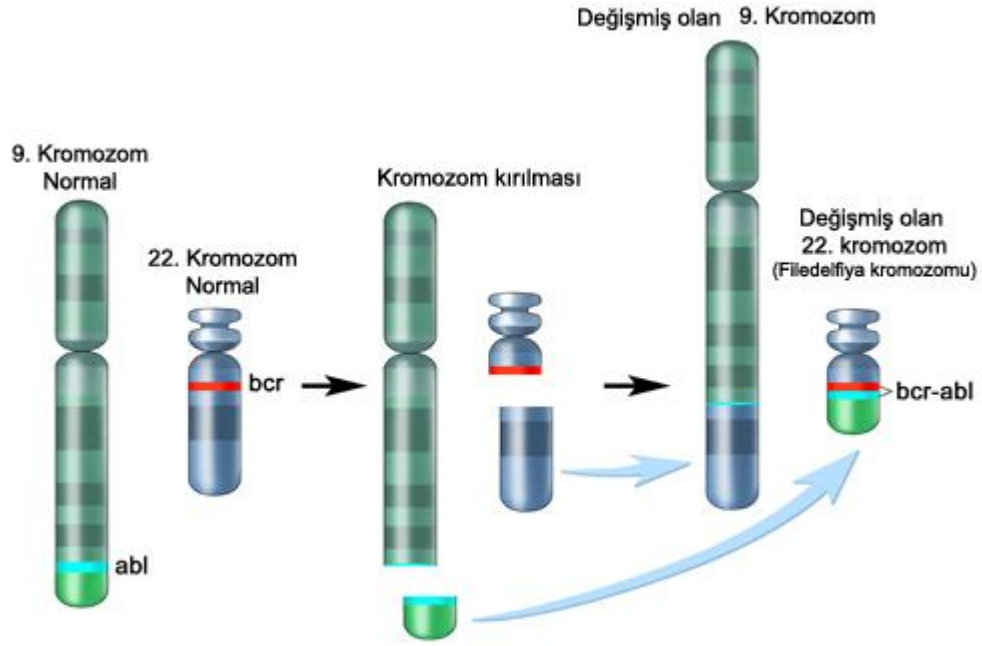
Akselere evrede ateş (enfeksiyon olmaksızın), kemik ağrısı ve dalak büyümesi gelişmektedir.

**Blastik Faz**, genellikle 5 yıl içinde ortaya çıkan, olgunlaşmamış akyuvar (lösemi hücresi) sayısının çok fazla olduğu evredir. Blastik evredeki lösemilerin tedavisi çok zor olmaktadır. Bu evrede kemik iliği yetmezliğine bağlı olarak kanama ve enfeksiyonlar görülebilir. Blast hücre sayısı % 30'un üzerine çıkmıştır. Bazen bu hücreler kemikte veya lenf nodlarında tümörler oluşturabilirler. Bu noktada kronik lösemi, hızlı ilerleyen akut bir lösemi halini almaktadır (Sever, 2009).

KML, insanlarda bir spesifik kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır. KML vakalarının % 90'dan fazlasında sitogenetik analiz ile Fildelfiya (Ph\*) kromozomu tespit edilir. Ph\* kromozomu (9:22) translokasyonu sonucu oluşmaktadır (**Şekil 1.2**). Bu translokasyon sonucu oluşan füzyon transkripti, bcr/abl'dir. Yeni oluşan bu kimerik genin ürünü 210 kDa (p210) molekül ağırlığında bir proteindir ve KML'de lösemik fenotipin gelişmesinden sorumludur. KML'nin kesin etiyolojisi bilinmemektedir. İyonize radyasyonu takip eden 4-11 yılda KML insidansında artış gözlenir. KML gelişiminde kimyasal ajanlar ve enfeksiyonun rolü net olarak gösterilememiştir. Genetik geçiş de tespit edilmemiştir. KML, tüm lösemilerin % 15 kadarını oluşturur. Yıllık KML insidansı popülasyonda 100.000' de 1-2 vaka şeklinde gerçekleşir. Erkeklerde daha sıktır. Ortalama görülme yaşı 45-55 yaşları olarak saptanmıştır. KML insidansı yaşla artış gösterir, hastaların % 30'u 60 yaş üstündedir. KML vakalarının yaklaşık % 3'ü çocukluk çağındadır (Haznedaroğlu, 2007).

KML' de klinik bulgular değişkenlik göstermektedir. Tanı sırasında vakaların % 30'u asemptomatik olabilmektedir. KML hastalarının % 10'u akselere fazda, % 10'u da blastik fazda teşhis edilmektedir. Kromozom anomalisinin gelişmesi ile klinik bulguların ortaya çıkması arasında yaklaşık 6 yıl vardır. Görülebilen KML semptomları; anemi semptomları (halsizlik, çabuk yorulma, efor intoleransı, fonksiyonel kapasitede azalma gibi), splenomegaliye bağlı semptomlar (karında şişlik ve ağrı, dalağın mideye basısı sonucu çabuk doyma), hipermetabolik duruma bağlı semptomlar (ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, gut), disfonksiyona bağlı semptomlar (hemoraji, ekimoz, hematoma, tromboembolik olaylar, retinal hemoraji),

hiperlokositoz ve hiperviskositeye bağılı bulgular (tinnitus, stupor, görme bozukluğu, nefes darlığı, priapizm ve serebrovasküler olaylar) şeklinde kendini gösterebilmektedir. KML blastik fazda hastalarda kilo kaybı, terleme ve kemik ağrısı görülmektedir. KML hastalarının fizik muayenesinde % 50-90 splenomegali, % 10-20 hepatomegali vardır. KML seyrinde ekstrameduler hematopoez odakları, cilt altı lezyonlar, lenfadenopati (LAP) gelişimi nadirdir (İlhan, 2007).



**Şekil 1.2.** Filedelfiya kromozomunun oluşum mekanizması (Ulusal Kanser Enstitüsü, [www.siteman.wustl.edu /xmlfiles/Media\\_big/CDR0000533336.jpg](http://www.siteman.wustl.edu/xmlfiles/Media_big/CDR0000533336.jpg))

KML hastalarının laboratuvar incelemelerinde; beyaz küre (BK) değerleri yüksek bulunur (Lökositoz: 20-500 bin/mm<sup>3</sup>). trombosit sayısı vakaların yarısında artmaktadır, kronik fazda 100 bin/mm<sup>3</sup> altında trombosit değerlerine rastlanması nadirdir. Periferik yaymada trombosit şekil bozuklukları görülebilir. Bazofil sayısı belirgin şekilde artmıştır, lökosit alkalen fosfataz düzeyleri düşüktür, periferik yaymada miyeloid serinin tüm hücreleri görülür. Eozinofillerde de artış vardır. LDH, ürik asit, histamin ve Vitamin B12 düzeyleri yüksektir. Kemik iliğinde myeloid seriye ait hücreler belirgin şekilde artmıştır. Karyotip analizinde ise Ph\* kromozomu tespit edilir. PZR, FISH gibi tekniklerle bcr/abl kimerik geni tespit edilir (Haznedaroğlu, 2007).

### 1.1.2.2.KLL (Kronik Lenfositik Lösemi)

Kronik lenfositik lösemi (KLL), B veya T lenfositlerinin nispeten olgun hücre döneminden köken alan, olgun görünümlü küçük lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf bezi ve dalağı infiltre etmesi ve lenfositlerin fonksiyon bozukluğu göstermesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir hastalığıdır (Özkocaman, 2007). Sıklıkla ileri yaş grubunda görülür. 40 yaş altında nadir olarak bildirilmiştir. Batı toplumlarındaki yetişkinlerde en sık (% 24) görülen lösemi türüdür. Otuz yaşın altında çok nadir olmasına rağmen KLL'ye yakalanan kişilerin % 20-30 kadarı 55 yaşın altındadır. Uzak Doğuda, özellikle Çin'de ve Japonya'da nadir görülür. Dünya üzerindeki bu farklı insidansın sebebi henüz bilinmemektedir. Erkeklerde daha sıktır (Erkek/Kadın = 1.7:1). Olguların % 98'i B lenfosit kökenlidir. T hücreli KLL, olguların sadece % 2'sini oluşturmaktadır (Duman, 2008).

Kimyasallar, radyasyon, diyet, virüs enfeksiyonu ve otoimmün hastalıkların KLL gelişmesinde önemli bir risk olduğu kesin olarak bugüne kadar gösterilememiştir. Fakat KLL' ye yakalanan kişilerin birinci ve ikinci derecedeki akrabalarında bu lösemi gelişme ihtimalinin yüksek olduğu bilinmektedir. Literatürde KLL'ye yakalanan ailelere ait detaylı çalışmalar olmasına rağmen, bu kişilerin genel genetik yapılarında bir bozukluk bulunamamıştır ve genetik geçiş mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır (Alkan, 2005).

Bazı çalışmalar KLL hücrelerinde somatik kromozom bozukluğu ve tek bir gende (p53 ve ATM genleri gibi) mutasyon olduğunu göstermiştir. Fakat bu kişilerin ve ailelerinin üyelerinde aynı gende somatik bir değişiklik saptanamamıştır. KLL olan kişilerin ailelerinde diğer hematolojik malign lezyonların örneğin lenfoma ve multipl miyelom hastalığının normal kişilere göre daha sık olduğu da bilinmektedir. (Alkan, 2005).

KLL, yetişkin popülasyonda en sık görülen lösemi tipidir. Hastalar lenfadenopati, halsizlik, çabuk yorulma, gece terlemesi, ateş, kilo kaybı, tekrarlayan bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi özgün olmayan semptomlar ile başvurabilirler (Duman, 2008). Mikroskopik olarak tipik KLL hücreleri çok az sitoplazması olan küçük yuvarlak veya oval nükleuslu lenfositlerdir. Kromatin yapısı biraz kabadır,

kümeleşme veya mozaik görünüşü olabilir ve büyük bir çoğunluğun nukleolusu yoktur. Bazı KLL hastalarında biraz daha büyük lenfositler daha fazla sitoplazma ve belirgin bir nukleolus gösterir ki bunlar prolenfosit olarak tanımlanır. Eğer prolenfosit sayısı % 10'un üzerine çıkacak olursa bu hastalık KLL/PL (prolenfositik) olarak adlandırılır (Alkan, 2005).

KLL tanısı için birçok kriter geliştirilmiştir. 1988'de "National Cancer Institute sponsored Working Group- NCI-WG " ve "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia – IWCLL" tarafından tanı kriterleri, evreleme ve tedavi yöntemleri ortaya konulmuştur (Cheson vd., 1996). NCI-WG ve IWCLL tanı kriterleri Tablo 1.5'de verilmektedir.

**Tablo1.5.** KLL için NCI-WG ve IWCLL Tanı Kriterleri (Cheson vd, 1996).

| NCI                                                                                    | IWCLL                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| > 5.000/ mm <sup>3</sup> lenfositoz; en az 1 adet B hücre işareti (CD19,CD20,CD23)+CD5 | ≥ 10.000/mm <sup>3</sup> lenfositoz + B fenotipi veya kemik iliği tutulumu |
| < % 55 atipik hücre oranı                                                              | < 10.000/mm <sup>3</sup> lenfositoz + B fenotipi +kemik iliği tutulumu     |
| ≥ % 30 kemik iliği lenfosit oranı                                                      | > % 30 kemik iliği lenfosit oranı                                          |

Günümüzde prognozun belirlenmesinde kullanılan iki farklı klinik evreleme sistemi vardır; Rai evrelendirmesi (Tablo 1.6) ve Binet evrelendirmesi (Tablo 1.7).

**Tablo 1.6.** Rai Evrelendirmesi (Rai,1975)

| Evre | Klinik-Hematolojik Özellikler                                    |
|------|------------------------------------------------------------------|
| 0    | Lenfositoz                                                       |
| 1    | Lenfositoz + Lenfadenomegali                                     |
| 2    | Lenfositoz+ Splenomegali ve/veya hepatomegali                    |
| 3    | Lenfositoz+ Anemi (Hb<11 g/dl)                                   |
| 4    | Lenfositoz+ Trombositopeni (Trombosit<100.000/ mm <sup>3</sup> ) |

**Tablo 1.7.** Binet Evrelendirmesi (Binet,1981)

| Evre | Klinik-Hematolojik Özellikler                                               |
|------|-----------------------------------------------------------------------------|
| A    | 3'ten az lenfoid bölge* tutulumu                                            |
| B    | 3 ya da daha fazla lenfoid bölge* tutulumu                                  |
| C    | Anemi (Hb<10g/dl) ya da Trombositopeni (Trombosit<100.000/mm <sup>3</sup> ) |

\*Tek veya iki taraflı servikal, aksiler ve inguinal bölgeler, dalak ve karaciğer lenfoid alanlardır.

### 1.1.3. Multipl Myelom (MM)

Multipl myelom (MM), kemik iliğinde plazma hücre artışı ve bu hücrelerin salgıladığı M proteinlerin serum ve/veya idrarda bulunmaları ve litik kemik lezyonları ile karakterize bir hastalıktır. Görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve 60-70 yaşlarında en yüksek orana ulaşır. Multipl myelom erişkinlerde görülen malignitelerin % 1'ini, hematolojik malignitelerin ise % 10'unu oluşturmaktadır (Altuntaş, 2004).

Bu hastalığı diğer lenfomalardan ayıran önemli biyolojik tümör karakteristikleri vardır. Miyelom hücreleri, tanı ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi açısından büyük önem taşıyan bazı özellikleri gösterirler. Kemik iliğinde ya da nadir olarak ilik dışında (ekstramedüller) yayılma mevcuttur. Kemik iliğinin infiltrasyonu sonucunda sitopeni ortaya çıkabilir. İmmünglobülinler ya da hafif zincirlerin üretimi artmıştır ve bunun bir sonucu olarak hipervizkozite sendromu ortaya çıkabilir. Ancak, immünglobülinlerin artışına rağmen, immünglobülinler fonksiyonel açıdan yetersiz kalmaktadır. Bu durumda da enfeksiyonlar sık rastlanan bir ölüm nedenini oluşturmaktadır (Sezer, 2005).

MM, etyolojisi bilinmeyen bir hastalıktır. Diğer malignitelerde olduğu gibi radyasyon, çalışma alanları, hayat tarzı ve öncü medikal problemlerle bu hastalık ilişkilendirilmek istenmiştir. Nükleer iş kollarında çalışanlarda hastalığın oluşumunda radyasyona maruz kalma süresi önemlidir, fakat tanı ve tedavi amaçlı

radasyona maruz kalma ile MM oluşumunu ilişkilendirecek bir bulgu henüz yoktur. Tarım ve metal işçiliği, obezite, kötü sosyo-ekonomik koşullar, bazı verilere göre özellikle siyah renkli saç boyası myelom riskini artıran faktörler olarak belirlenmiştir. Benzene maruz kalma, sigara ve alkol, myelom için risk faktörü oluşturmamaktadır. Turunçgiller ve vitamin C tüketimi riski azaltan faktörler olarak belirlenmiştir. AIDS’de diğer malignitelerde olduğu gibi myelom görülme sıklığında da artma mevcuttur (Aydın, 2005).

Birçok B hücre kökenli malignitede olduğu gibi myelom plazma hücreleri de germinal merkez veya post germinal merkez kaynaklı hücrelerdir. Multiple myelom patogenizinde siklin-D ifadesinde artma, p16 ve p15 hipermutasyonu, Ras-onkogen mutasyonu, p53 kaybı, c-myc artmış ifadesi gibi hücre döngüsü düzenleyicilerindeki değişikliklerin yanında kemik iliği mikroçevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (Aydın, 2005).

Myelomda tanı kriterleri Tablo 1.8’ de verilmektedir. Evreleme prognozu, uzun dönem sağ kalımı özellikle tedaviye yaklaşımı belirlemede temeli oluşturmaktadır.

**Tablo 1.8.** MM’de Majör ve Minör Tanı Kriterleri (Kyle vd., 2004)

|                        |                                                                                                         |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Majör Kriterler</b> |                                                                                                         |
| ❖                      | Doku biyopsisinde plazmositom tanısı                                                                    |
| ❖                      | Kemik iliğinde plazma hücreleri $\geq$ % 30 (plazmasitoz)                                               |
| ❖                      | Serum elektroforezinde Monoklonal M protein                                                             |
| ❖                      | IgG>3.5 g/dL veya IgA>2 g/dL                                                                            |
| ❖                      | İdrarda hafif zincir atımı; >1 g/24 saatlik idrarda kappa ( $\kappa$ ) veya lambda ( $\lambda$ )zinciri |
| <b>Minör Kriterler</b> |                                                                                                         |
| ❖                      | Kemik iliğinde % 10-30 plazmasitoz                                                                      |
| ❖                      | Majör kriterlerdeki düzeylerden daha düşük M protein varlığı                                            |
| ❖                      | Litik kemik lezyonları                                                                                  |
| ❖                      | Normal immünglobulinlerde azalma (IgM<50 mg/dL, IgA<100 mg/dL, IgG<600 mg/dL)                           |

MM şüphesinde öykü ve fiziksel muayenenin yanısıra tam kan sayımı, elektrolitler, üre, kreatin, kalsiyum, fosfor, ürik asit, LDH, alkalen fosfataz, serum protein elektroforez, immünglobulin düzeyleri, serum immünoelektroforez,  $\beta$ -2 mikroglobulin, C-reaktif protein (CRP) düzeylerine bakılmalıdır. Ayrıca kemiklerin radyolojik incelenmesi, kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi, tercihen plazma hücre işaretleme indeksi, sitogenetik ve FISH analizleri yapılması gereken testlerdir (Gülçin, 2008).

MM evrelendirmesinde Durie–Salmon evreleme sistemi (Tablo 1.9) ve Uluslararası Prognostik İndeks (Tablo 1.10) kullanılmaktadır.

**Tablo.1.9.** Durie- Salmon Evreleme Sistemi (Durie vd., 1975)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>EVRE I:</b><br>Hemoglobin>10 g/dL, Serum kalsiyum<12 mg/dL<br>Kemik lezyonu yok veya sadece soliter kemik plazmositomu<br>IgG<5 g/dL, IgA<3 gr/dL, İdrarda hafif zincir <4 g/24 saat                                                                                            | <b>Tümör kitlesi</b><br><br><br>$<0.6 \times 10^{12}$ hücre/m <sup>2</sup> |
| <b>EVRE II:</b> EVRE I ve EVRE III dışında kalanlar                                                                                                                                                                                                                                | $0.6-1.2 \times 10^{12}$ hücre/m <sup>2</sup>                              |
| <b>EVRE III:</b> Aşağıdakilerden bir veya daha fazlası mevcut<br>Hemoglobin<8.5 g/dL, serum kalsiyum>12 mg/dL<br>Litik kemik lezyonları<br>IgG>7 g/dL, IgA>5 g/dL<br>İdrar hafif zincir >12 g/24 saat<br><b>Alt grup</b><br>A: Serum Kreatin <2 mg/dL<br>B: Serum Kreatin >2 mg/dL | $>1.2 \times 10^{12}$ hücre/m <sup>2</sup>                                 |

**Tablo.1.10.** MM için önerilen İnternasyonal Prognostik İndeks (Fonseca vd., 2007)

| Evre     | Parametre                                                                                                |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Evre I   | $\beta$ -2 mikroglobulin<3.5 mg/dL<br>Albumin>3.5 mg/dL                                                  |
| Evre II  | $\beta$ -2 mikroglobulin<3.5 mg/dL<br>Albumin<3.5 mg/dL veya<br>$\beta$ -2 mikroglobulin 3.5 – 5.5 mg/dL |
| Evre III | $\beta$ -2 mikroglobulin>5.5 mg/dL                                                                       |

## 1.2.MHC Genleri

**Büyük Doku Uyum Kompleksi (MHC)**, bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli olan “doku antijenleri” ni içermektedir (Dalva, 2004). Doku uygunluk kompleksi, yüksek düzeyde polimorfik genlerden kodlanan bileşenlerden oluşmaktadır (Tahsin, 2004 ).

Yirminci yüzyılın başlarında farelerde spontan gelişen tümörlerin yine aynı farede kendiliğinden kaybolabildiği farkedilince, bu tümörleri hasta fareden alıp sağlıklı fareye aktarma girişiminde bulunulmuştur. Akraba fareler arasında transplantasyonun başarılı olduğunun fark edilmesi, bugünkü MHC genleri bilgilerimizin temelini oluşturmaktadır. Birbirine çok yakın veya daha uzak akrabalık gösteren fareler arasında yapılan transplantasyon deneyleri, doku reddinde rol oynayan gen bölgelerinin saptanmasını sağlamıştır. Böylece farelerde güçlü ve zayıf etki eden gen bölgeleri tespit edilmiş ve bunların tümüne Doku Uyum Bölgesi (Tissue Histocompatibility Loci) adı verilmiştir (Beksaç, 2004).

İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan MHC bölgesi insanda 6. kromozomun kısa kolunda yerleşmiş olup; ilk olarak beyaz kan hücrelerinde tanımlandığı için **İnsan Lökosit Antijenleri-HLA** (“Human Leukocyte Antigens”) olarak da adlandırılmaktadır (Dalva, 2004).

Birçok otoimmün, allerjik, infeksiyon yada çeşitli malign hastalıklarda, hastalığın seyri açısından bireyler arasında belirgin farklılıkların olduğu bilinmektedir. Bu farklılıkların hastalığı oluşturan etkenlerle ilgili olduğu gibi, bireylerin HLA doku uygunluk antijenlerinin yarattığı cevabın farklılığını oluşturan genetik çeşitlilikle de ilgili olduğu ortaya çıkmıştır (Tahsin, 2004 ).

MHC bölgesi, insan genomunun ( $3 \times 10^9$  bp) % 0,13'ünü oluşturur fakat protein kodlayan genlerin yaklaşık % 0,5'i bu bölgede yer alır. Bu bölge insan genomundaki gen açısından en yoğun ve en iyi tanımlanmış bölgelerden birisidir. MHC gen ürünlerinin çoğu immün yanıtta ligandlar, reseptörler sinyalizasyon faktörleri, etkileşim proteinleri ve transkripsiyon faktörleridir (Shiina vd., 2009).

HLA genlerinin hastalıklar üzerindeki etkisinin T- lenfositlerin antijen tanımadaki fonksiyonları ile ilgili olduğu öngörülmektedir. Doku uygunluk kompleksi yüksek düzeyde polimorfik genlerin oluşturduğu hücre yüzeylerindeki değişik bölgelerdir. Genelde MHC molekülleri ya da MHC antijenleri olarak isimlendirilen MHC şifreli proteinler nakil dokunun reddedilmesinde başlıca belirleyici olmaktadır (Tahsin, 2004 ). HLA allellerinin tanımlanması, belirli hastalıklar ile spesifik HLA antijenleri veya haplotipleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Her bir HLA antijeni kendisine özgül bir gen tarafından kontrol edilir (Sabuncuoğlu, 2006).

MHC sisteminde antijen sunumu MHC lokusundaki genlerle kodlanan ve antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan özelleşmiş proteinler aracılığıyla olur. Antijen sunucu hücreler vücudu dolaşır, antijeni bulur ve fagositozla içine alır, onları antijenik peptid parçalarına ayırır ve bunları MHC moleküllerine bağlar. Böylece antijen-peptid parçası - MHC kompleksi daha sonra hücre yüzeyinde sunulabilir (Demir, 2005).

MHC gen bölgesi 3.673.800 nükleotid ve 4.464 farklı allel ve toplam 253 bölge içermektedir (Sabuncuoğlu, 2006). MHC bölgesi, kodlanan proteinlerin immünolojik özelliklerine göre **genişletilmiş Sınıf I, Sınıf I, Sınıf III, Sınıf II ve genişletilmiş Sınıf II** olarak beş alt bölgeye ayrılır. Bu bölgelerdeki lokus sayısı sırasıyla 4, 128, 75, 27 ve 19'dur (Shiina vd., 2009).

BABBR1, SUMO2P, MOG ve ZNP57 genleri **Genişletilmiş Sınıf I bölgesi**'nde yer alır. Telomerik bölgede ise koku almaçları, histon, tRNA ve çinko parmak protein gibi proteinleri kodlayan duplike genler yer alırlar (Shiina vd., 2009).

**Sınıf I bölgesi**, MHC nin telomerik ucunda yer alır ve alfa, beta, kapp blok olmak üzere 3 ayrı bölümden oluşur (Shiina vd., 2009). HLA-A, HLA-B, HLA-C olarak da tanınan 3 klasik transplantasyon antijen bölgesi, HLA-E, HLA-F, HLA-G olmak üzere 3 klasik olmayan antijen bölgesi ve yalancı gen (psödogen) veya kodlamayan gen bölümleri (HLA-S/17, -X, -N/30, -L/92, -J/59, -W/80, -U/21, -K/70, -16, -H/54, -90, -75) bu bölgede yer alır (Dawkins vd., 1999).

**MHC Sınıf-III antijenleri**, Sınıf-I ve Sınıf-II antijenleri arasındaki bölgede bulunurlar. Klasik kompleman yolunun C2, C4a ve C4b, alternatif yolun properdin faktörü ile 21-hidroksilaz gibi enzimler ve TNF gibi sitokinlerin sentez edildiği bölgedir (Akçam, 2003).

**Sınıf II bölgesi** ise sentromere yakın yerleşik olup toplam 0,7 Mb'lık bir alanı kapsar ve toplam 27 lokus içerir (Shiina vd., 2009). MHC Sınıf-II antijenleri özellikle B lenfositleri, makrofaj, dentritik hücre, endotel hücreleri ve bazı aktif T hücrelerinde bulunurlar. Bu antijenler başlangıçta HLA-D olarak adlandırılmış daha sonra farklı antijenler bulununca D ile ilgili anlamına gelen (D related) HLA-DR antijeni denilmiştir. Bu bölgedeki diğer antijenlere de alfabedeki yakınlık nedeni ile HLA-DQ, HLA-DP... şeklinde isimler verilmiştir. HLA-DP, HLA-DN, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DQ ve HLADR bölgelerinin yanı sıra çeşitli yalancı genler (psödogenler), antijen işlenmesinde rol alan LMP ve TAP gibi önemli genler MHC sınıf II bölgesinde yer almaktadır (Akçam, 2003).

**Genişletilmiş Sınıf II bölgesi**, 0,2 Mb'lık bir alanı kaplar ve toplam 19 lokus içerir (Shiina vd., 2009).

Ağır zincirleri kodlayan Sınıf I genleri, HLA-A, -B, -C, -E, -F ve -G işlevsel HLA izoformlarını oluşturur. HLA-A, -B ve -C klasik sınıf I antijenlerini sentezletir, diğer yandan klasik olmayan HLA-E, -F, -G ise doğal öldürücü hücreler ile ilişkili bağışıklık cevapta görev almaktadırlar. HLA-H, -J, -K ve -L olarak isimlendirilen

yalancı genlerin henüz herhangi bir immünolojik görevi bildirilmemiştir. MHC sınıf I moleküllerinin esas görevler hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır (Beksaç, 2004).

Sınıf I molekülleri fizyolojik rollerine uygun olarak bütün çekirdekli hücrelerde bulunurlar. Bir antijenin CD8 (öldürücü) T lenfositlerce tanınabilmesi ancak Sınıf I molekülü ile bir arada tutulmuş olmasına bağlıdır. Bu olgu HLA restriksiyonu olarak isimlendirilir. Örneğin, bir virüs bir hücreyi enfekte ettiği zaman viral antijenler peptid fragmanlarına ayrılırlar. Daha sonra Sınıf I moleküllerince bağlanarak CD8 öldürücü T hücrelerine sunulurlar (Yakut, 2004).

Belirli bir T lenfositin antijen reseptörü, belirli bir viral peptide ancak belirli bir Sınıf I molekülü bağlamında tanıyabilir. Bu reseptörler farklı bir Sınıf I molekülü ile bağlı özgün bir peptidi özgün bir Sınıf I molekülü ile bağlanması farklı bir viral peptidi veya bağlı olamayan bir Sınıf I molekülünü tanımazlar. Tanıma oluştuğunda Killer-T lenfositler (CD8) viral antijen taşıyan hedef hücreyi öldürürler. Fizyolojik olamayan transplantasyon koşullarında nakil dokunun reddi sırasında (o ana kadar tanımlanmamış peptidlerle bağlı olan) yabancı Sınıf I molekülleri yerli CD8 T lenfositlerince tanınır (Yakut, 2004). Sınıf I ve II moleküllerinin yapısal farklılıkları, bağlayacakları peptidin özelliklerini ve bağlanma gücünü farklı kılmaktadır (Beksaç, 2004).

### **1.2.1. LMP2 (Low molecular weight polypeptide 2) ve LMP7 (Low molecular weight polypeptide 7) Genleri**

LMP2 ve LMP7 genleri, 6 nolu kromozomun kısa kolu üzerinde MHC sınıf II bölgesinde yer alır (Şekil 1.3). Bu genler, proteozom yapısının bileşenlerini oluşturan peptidleri kodlamaktadır (Çarin, 2004). Proteozomlar, kısa-ömürlü hasarlı proteinler ile antijenin proteinlerin yıkımından sorumlu multikatalitik enzim kompleksleridir. LMP2 ve LMP7 genleri proteozom bileşenlerini kodlamak suretiyle antijenik peptidlerin oluşturulmasında görev almaktadırlar.

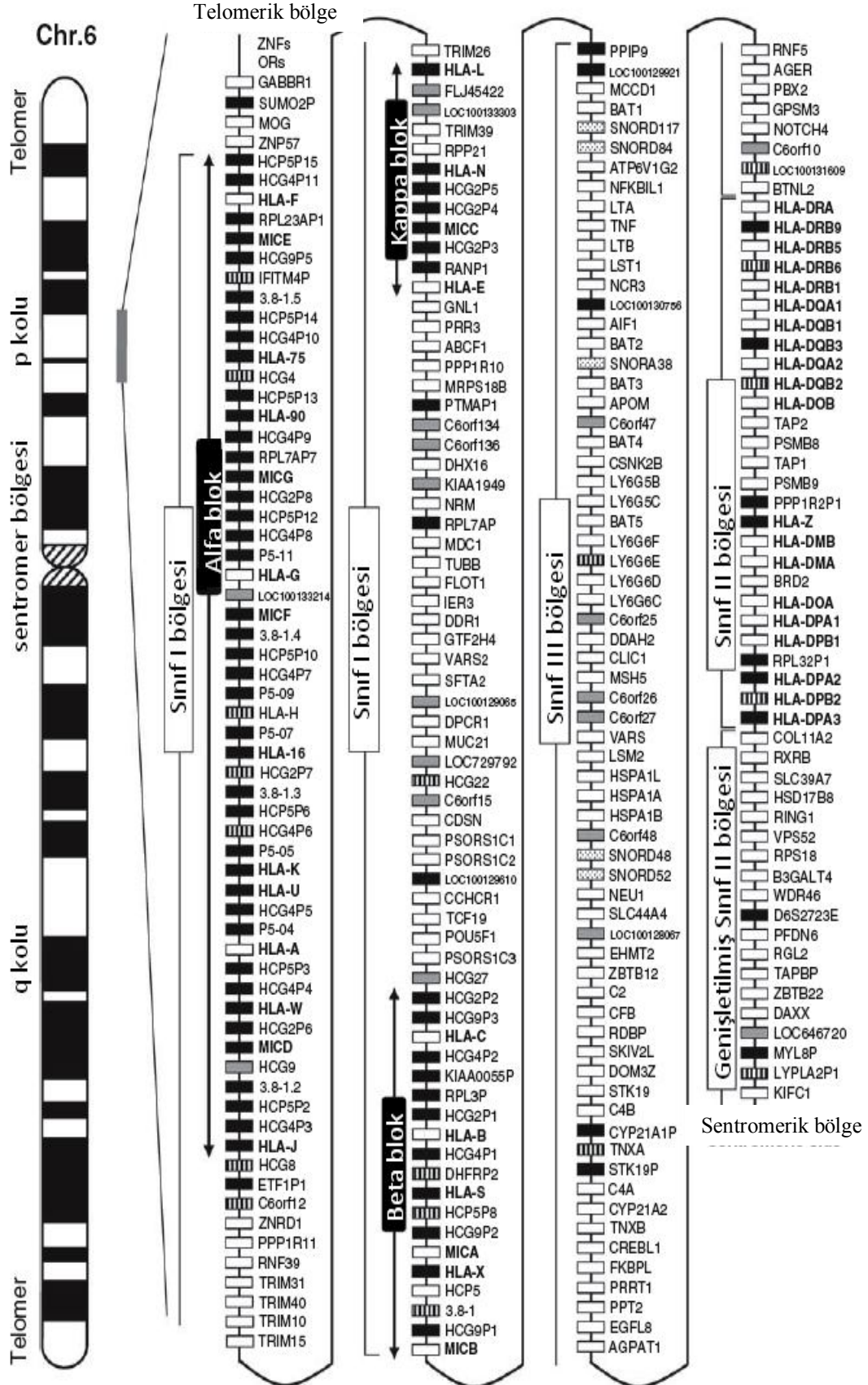
Otoimmün hastalıklarda, sunulacak peptidleri ve dolayısıyla oluşacak immun yanıtın özelliklerini HLA molekülleri kadar antijenlerin işlenmesi sırasında oluşan

peptidlerin yapısı da belirlemektedir. Bu nedenle LMP genlerindeki çeşitliliğin de hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Dalva, 2004).

LMP genleri HLA genleri kadar olmasa da polimorfik genlerdir. Oluşturulan ve sunulan antijenik peptidlerin spektrumunun incelenmesi, ve populasyon genetiği çalışmaları, LMP genlerindeki genetik varyasyonların fonksiyonel etkilerinin anlaşılması için oldukça önemlidir (Faucz vd., 2000).

### **1.3. Amaç**

Bu çalışmanın amacı; Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bölümü'nde tanı konmuş KML (Kronik Myeloid Lösemi), KLL (Kronik Lenfositik Lösemi), AML (Akut Myeloid Lösemi) ve MM (Multiple Myeloma) hastalarında ve birbiriyle akrabalık ilişkisi olmayan sağlıklı bireylerde LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin incelenmesi, allel-genotip frekanslarının belirlenmesi ve karşılaştırılması ile hematolojik maligniteler ve LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.



Şekil 1.3. 6p21.1-21.3 üzerinde yerleşik MHC bölgesinin gen haritası (Shiina vd., 2009)

## BÖLÜM 2

### KAYNAK ÖZETLERİ

Gen polimorfizmleri ve hastalıklar arasındaki ilişkilerin incelenmesi çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar, ABO kan grupları ile çeşitli hastalıklar arasındaki bağlantının gösterilmesine yöneliktir (Akçam, 2003).

MHC antijenleri, transplantasyonda nakil dokunun reddedilmesinde başlıca belirleyicidirler. Aynı MHC moleküllerini taşıyan bireyler birbirlerinden doku alabildikleri halde MHC molekülleri farklı bireyler nakil dokularını şiddetle reddederler (Yakut, 2004).

HLA ve hastalık ilişkileri konusunda birçok teori ileri sürülmüş, bunlardan 3 tanesi kabul görmüştür (Akçam, 2003) :

- **İmmün cevap genleri teorisi:** Hastalık etmenlerine karşı immünolojik cevabın kişinin genetik yapısıyla ilişkili olduğu, immün cevap genlerinin de HLA antijenleri gibi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunduğu ileri sürülmüştür. İmmün cevabı farklı kılan bu gen yapısındaki değişikliklerin yakın komşuluk sebebiyle HLA antijenlerini regüle eden genler ile tanımlanabileceğini savunan teoridir.
- **Antijenik benzerlik teorisi:** HLA antijenleri ile bazı hastalık etmeni antijenlerin arasında benzerlik bulunması sebebiyle immün cevabın tam olmadığını ve bu hastalık etkeninin kronik hastalığa neden olduğunu ileri süren teoridir.
- **Membran reseptörleri teorisi:** Hücreler bulundukları ortam ile ilişkilerini yüzeylerindeki reseptörler ile sağlarlar. HLA antijenleri de hücre yüzeyinde bulunan reseptörler olarak kabul edilirse, hücrelerin aynı etken karşısında farklı cevap vermeleri mümkündür.

MHC bölgesindeki genlerin alellik durumunun otoimmün hastalıklara yatkınlıkta önemli role sahip olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir:

- Deng vd., (1995) tarafından yapılan çalışmada, LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin İnsüline Bağımlı Diyabet gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Güneydoğu Amerika bölgesinden akraba olmayan 198 İnsüline Bağımlı Diyabet hastası ve 192 sağlıklı birey analiz edilmiş ve sonucunda İnsüline Bağımlı Diyabet hastalığının LMP7 gen polimorfizmi ile güçlü bir ilişki içinde olduğu, LMP2- Arg/His polimorfizminin ise sadece HLA DR4-DQB1\*0302 haplotipi taşıyan bireylerde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, LMP genlerinin IDDM yatkınlığında bağımsız etkilere sahip olduğu bildirilmiştir.
- Chevrier vd. (1997), HLA-DPBI,- DRBI, - DMA, - DMB, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 genleri ve İdiyopatik-Sekonder Membranöz Nefropati üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada fenotip frekanslarının hasta ve sağlıklı bireylerde benzer olduğunu belirlemişlerdir.
- Vinasco vd. (1998) Romatoid Artrit; Ishihara vd. (1999) Sarkoidoz ve Behçet hastalığı; Lee vd. (2001) Atopik dermatit hastalığı ile LMP genleri arasındaki ilişkiyi bağımsız çalışmalarıyla araştırmış fakat anlamlı bir ilişki tespit edememişlerdir.
- LMP7 gen polimorfizminin HCV hastalarının interferon tedavisine verdikleri yanıtı etkileyen önemli bir konakçı faktörü olduğu bildirilmiştir (Sugimoto vd., 2002).
- Casp vd. (2003), vitiligo patogenezinde etken olan antimelanosit otoimmün yanıtta LMP ve TAP genlerinin rolü olabileceğini bildirmişlerdir.
- LMP2 gen polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi de incelenmiştir (Mishto vd., 2004). Çalışma, 154 Alzheimer hastası ve 406 sağlıklı birey üzerinde yapılmış olup çalışma sonucunda, LMP2 ekspresyonunun Alzheimer hastalığından etkilenmiş dokularda, etkilenmemiş dokulara oranla

daha fazla gözlemlendiği ve bu genlerle proteozom aktivitesi arasında yakın bir ilgi olabileceği öne sürülmüştür.

- Vargas-Alarcon vd., (2004), Meksika’da LMP gen polimorfizminin spondiloartrit hastalığı üzerine etkisini araştırmışlar, çalışmaya 223 Meksikalı SpA hastası ve 139 sağlıklı bireyi dahil etmişlerdir. Çalışma sonucunda, LMP2 ve LMP7 genlerinin allel frekansları sağlıklı ve hasta bireylerde benzer dağılım göstermiştir. Genotip frekansı açısından LMP7 geni, hasta ve sağlıklı bireyler arasında önemli bir fark göstermezken, LMP2 genine ait genotiplerin Ankilozan spondilit hastalığının gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir.
- LMP7 ve TAP2 gen polimorfizmlerinin Çin’de özofagus kanseri üzerine etkisi incelenmiştir (Cao vd., 2005). Çalışma sonucunda, LMP7 ve TAP2 genlerinin özofagus kanseri gelişimi için risk faktörü olduğu ve HPV (Human Papilloma Virus) ile enfekte olan kişilerde tümör oluşumunu etkilediği öne sürülmüştür.
- Çin’de yapılan bir başka çalışmada LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonuna etkisi incelenmiş ve LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin HBV enfeksiyonu için önemli bir konakçı faktör olduğu belirlenmiştir (Dai vd., 2005).
- Krämer vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, LMP ve TAP genleri ile sedef hastalığı arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmada, 321 Alman sedef hastası ve 235 akraba olmayan sağlıklı birey yer almıştır. Çalışma sonucunda, LMP ve TAP genlerinin allelleri ile sedef hastalığı arasında güçlü bir ilişki olduğu ve bu durumun da ilaç tedavisinde önemli bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir.
- Çin popülasyonunda, Hepatit B virüs enfeksiyonu riskinin LMP ve TAP genlerinin polimorfizmleri ile ilişkisi incelenmiş ve LMP7, TAP1 ve TAP2 genleri ile Hepatit B enfeksiyonu arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Changqing vd., 2007).

- Mehta vd. (2007), servikal kanserler ve TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 ve ERAP1 genleri arasındaki ilişki üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, servikal kanserli 75 hastanın TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 ve ERAP1 genleri analiz edilmiş ve ERAP1-56, ERAP1-127 haplotiplerinin ve LMP7-145 gen polimorfizminin servikal kanser oluşumunda önemli rolünün olduğu bildirilmiştir.
- Rusya’da Melnikova vd. (2008), ratlarda timus gelişimi ile LMP2 ve LMP7 genleri arasında yakın bir ilişki olduğunu bildirmiştir.
- Ukrayna’da Honcharov vd. (2009) çalışmalarında erişkin arteriyel hipertansiyon hastalığında LMP2, LMP7 ve PSMA6 gen polimorfizmlerinin etkisini incelemişlerdir. Toplam 147 erişkin arteriyel hipertansiyon hastası ve 208 sağlıklı bireyin LMP2, LMP7 ve PSMA6 gen polimorfizmleri analiz edilmiş ve çalışma sonunda LMP2 ve PSMA6 gen polimorfizmlerinin arteriyel hipertansiyon riskinde önemli olduğu bildirilmiştir.
- Liu vd. (2009)’ nin özafagus kanserlerinde TAP1, TAP2, LMP2 ve LMP7 gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, 143 kanserli doku incelenmiş ve çalışma sonucunda bu genlerin ekspresyon seviyeleri ile özafagus kanserleri arasında önemli bir ilişki bulunmuştur.
- Sharova vd. (2009)’ nin yaptıkları çalışmada ratlarda doğum sonrası karaciğer ve dalak gelişimi ile LMP2, LMP7 gen ekspresyonu arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir.
- Tu vd. (2009) tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada , *Toxoplasma gondii* enfeksiyonlarına yatkınlıkta LMP7 genlerinin önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.
- Japonya ‘da Chou vd, (2010)’ nin yaptığı çalışmada, *Trypanosoma cruzi*’ nin etken olduğu Chagas hastalığında hastaların oluşturduğu immün yanıtta LMP2 ve LMP7 genlerinin önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

- Camarena vd. (2010), güvercin yetiştirenlerdeki alerjik pnömoni hastalığı ile LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Meksikalı 50 alerjik pnömoni hastası ve 50 sağlıklı bireyin analiz edildiği çalışmanın sonucunda, LMP2 ve alerjik pnömoni arasında bir ilişki bulanamamış iken LMP7 ve alerjik pnömoni arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.
- Tang vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, oral kanserli 43 Çinli hastadan doku örneği alınmış ve LMP2 ve LMP7 gen ekspresyonları belirlenmiştir. LMP2 ve LMP7 gen ekspresyonları normal epitel hücre-hattı ekspresyonu ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri arasında önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir.
- Ankilozan spondilit hastalığına yatkınlıkta ERAP1, TAP1, TAP2, LMP2, ve LMP7 gen polimorfizmlerinin rolü incelenmiştir (Maksymowych vd., 2010). Çalışmaya, Kanadanın Alberta bölgesi, Ternöv bölgesi ve Toronto bölgesi olmak üzere 3 farklı merkezden Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı bireyler katılmış ve çalışma sonunda Ankilozan spondilit hastalığı ile ERAP1 gen polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.
- Retina pigment epitel hücrelerindeki yaşlanma ve kronik oksidatif stres olaylarında da LMP2 ve LMP7 genlerinin önemli role sahip olduğu ileri sürülmüştür (Hussong vd., 2010).
- Hindistan – Yeni Delhi’de Sukriti vd, (2010)’ nin Kronik Hepatit B Virüs (HBV) enfeksiyonlarında TAP1, TAP2, LMP2 ve LMP7 gen ekspresyon seviyeleri üzerine yaptıkları çalışmada, HBsAg ve HBeAg-Pozitif 40 hasta ve 11 sağlıklı birey yer almıştır. Çalışma sonunda Alanin amino transferaz (ALT) enzimi yüksek seviyede olan Kronik HBV’li hastalarda, ALT enzim seviyesi normal olan Kronik HBV’li hastalara oranla TAP1 ve LMP7 mRNA ekspresyon seviyelerinin daha düşük olduğu, TAP1, TAP2 ve LMP2 mRNA ekspresyon seviyelerinin Kronik HBV’li hastalarda ise sağlıklı bireylerdekine oranla önemli derecede düşük olduğu gözlenmiştir.

- Cathro vd. (2010), mesane kanseri ile MB1, LMP2, LMP7, LMP10, HLA sınıf I ağır zincir, Tapasin, TAP1, TAP2 ve ERp57 gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki üzerine bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, MB1, LMP2 ve TAP2 genleri hariç diğer genlerin ekspresyon seviyelerinin normal üretral dokulara oranlara daha düşük olduğu gözlenmiştir.

LMP genleri hastalık asosiasyon çalışmalarına ek olarak ayrıca populasyon genetiği çalışmalarında da incelenmiştir:

- Vargas Alarcon vd. (2002), Meksika etnik populasyonlarında LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerini incelemişler ve populasyonların genetik ilişkilerini ortaya koymaya çalışmışlardır.
- Mihçioğlu vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada Güneydoğu Anadolu populasyonunda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri incelenmiş, literatürdeki diğer populasyonlara ait veriler kullanılarak oluşturulan dendogramda Güneydoğu Anadolu populasyonuna en yakın populasyonun Nahua en uzak populasyonların ise Beyaz ırk-ABD ve Kaingang- Brezilya populasyonu olduğu bildirilmiştir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Örneklem

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'nda tanı koyulup takip ve tedavisi yapılan 48 KML, 27 AML, 23 KLL ve 25 MM hastası olmak üzere toplam 123 hasta ve akrabalık ilişkisi olmayan 110 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ve cinsiyet dağılımı **Tablo 3.1.**'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve cinsiyet dağılımı

|         | Cinsiyet | Sıklık | Yüzde(%) | Minimum Yaş | Maksimum Yaş |
|---------|----------|--------|----------|-------------|--------------|
| KML     | K        | 33     | 68       |             |              |
|         | E        | 15     | 32       |             |              |
|         | TOPLAM   | 48     |          | 19          | 78           |
| AML     | K        | 10     | 37       |             |              |
|         | E        | 17     | 63       |             |              |
|         | TOPLAM   | 27     |          | 16          | 67           |
| KLL     | K        | 8      | 34       |             |              |
|         | E        | 17     | 66       |             |              |
|         | TOPLAM   | 23     |          | 40          | 80           |
| MM      | K        | 10     | 40       |             |              |
|         | E        | 15     | 60       |             |              |
|         | TOPLAM   | 25     |          | 36          | 74           |
| KONTROL | K        | 55     | 50       |             |              |
|         | E        | 55     | 50       |             |              |
|         | TOPLAM   | 110    |          | 17          | 58           |

Toplam 10 ml kan örneği steril EDTA'lı tüp içerisine alınmıştır. Bireylere çalışmanın amacı, izlenecek yöntem, risk ve faydalar hakkında bilgiler verilerek yazılı onamları alınmıştır.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (30.06.2008, Karar no: 06-2008/118).

### **3.2. DNA İzolasyonu**

Örnekleme sırasında bireylerden alınan 10 ml periferik kandan, yüksek tuz konsantrasyonu ile DNA'nın çöktürülmesi ("salting out") metodu ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, yüksek miktarda DNA eldesine olanak sağlayan, kolay uygulanabilir, ekonomik ve biyogüvenlik açısından avantajlı bir yöntem olduğu için tercih edilmiştir.

#### **3.2.1. DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar:**

- 50 ml'lik Falcon Tüp
- EDTA (Sigma)
- SDS (Merck)
- Amonyum Asetat (Merck)
- Mezür (100ml, 250ml, 500ml)
- Erlen
- Etanol (Sigma)
- Mikropipetler (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl Gilson)
- Steril pipet uçları (Gilson)
- 1,5 ml'lik Eppendorf tüpleri (Axygen)
- Eppendorf tüp destekleyiciler
- Vorteks (Heidolph Reaks Top)
- Santrifüj Aleti (P Selecta Centronic –BL II)
- Steril lateks eldiven
- Etüv (Memmert)
- 10 ml EDTA'lı tüp (Hema)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu (Uğur)

#### **3.2.2. DNA İzolasyonu Sırasında Kullanılan Tampon Çözeltiler:**

##### **• Çekirdek Lizis Tamponu (pH: 8.2)**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 10 mM Tris-HCL            | 1,576 g |
| 400 mM NaCl               | 23,4 g  |
| 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA | 0,7 g   |

Distile su ile çözülerek 1 lt'ye tamamlandı. Çözelti pH' sı, NaOH ile 8.2' ye ayarlandı. Çözelti otoklavlanarak buzdolabında (+4 °C ) muhafaza edildi.

- **SDS %10**

SDS 10 g

Distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. Membran filtre ile sterilizasyon yapılarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **Amonyum Asetat**

Amonyum Asetat 148 g

Distile su ile çözülerek 200 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **TE Tampon Çözeltisi (pH: 7.5)**

1 mM Tris-HCL 0,394 g

1mM Na<sub>2</sub>EDTA 0,093 g

Distile su ile çözülerek 250 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak buzdolabında (+4°C ) muhafaza edildi.

- **Proteinaz K**

200 mg proteinaz K, 10 ml'ye steril distile su ile tamamlandı ve -20 °C'de saklandı.

### **3.2.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

1. 10 ml kan 50 ml'lik tüplere alınarak üzerine 40 ml soğuk steril distile su eklendi ve eritrositleri patlatmak amacıyla tüpler 1-2 dk çalkalandı. Tüpler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hacim 25 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi, pellet çözülene kadar tüpler çalkalandı ve örnekler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 3 ml Çekirdek Lizis Tamponu, 200 µl Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 150 µl Proteinaz K eklendi ve karışım vorteks ile homojenize edildi.

4. 10 ml kan 50 ml'lik tüplere alınarak üzerine 40 ml soğuk steril distile su eklendi ve eritrositleri patlatmak amacıyla tüpler 1-2 dk çalkalandı. Tüpler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hacim 25 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi, pellet çözülene kadar tüpler çalkalandı ve örnekler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 3 ml Çekirdek Lizis Tamponu, 200 µl Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 150 µl Proteinaz K eklendi ve karışım vorteks ile homojenize edildi.
7. Tüpler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.
8. Tüplerin içerisine 2 ml Amonyum Asetat eklendikten sonra 1 dk sallandı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
9. Örnekler 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatant toplanarak başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında Etanol eklendi.
11. Tüpler dairesel şekilde döndürülerek DNA'nın toparlanması sağlandı.
12. Pipet ucuna değdirilerek alınan DNA steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
13. Elde edilen DNA örnekleri 500 µl TE (Tris-EDTA) tamponunda çözündürüldükten sonra kullanılacağı zamana kadar -40 °C'de saklandı.

### **DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü**

İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü. Stok DNA örneğinden 1 µl örnek Nanodrop'a konuldu. Hazırlanan örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri ölçüldü.

Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı  $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8$ 'dir. Bu değerden düşük değerler protein kontaminasyonu, büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (Aksoy vd, 2000).

### **3.3. LMP2 ve LMP7 Genlerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması**

Hasta ve kontrol grubu bireylerinden izole edilen DNA örneklerinde LMP2 ve LMP7 genleri özgül primerler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

### PZR için Kullanılan Çözeltiler

- **Taq DNA Polimeraz** (-20 °C’de muhafaza edildi)  
(5U/ µl) MBI Fermantas  
(100U/20 µl) Bio Basic  
(5U/ µl) Vivantis
- **PZR Tampon (10X)** (-20 °C’de muhafaza edildi)
- **MgSO<sub>4</sub>** (-20 °C’de muhafaza edildi)  
(25 mM) Fermantas  
(20 mM) Bio Basic  
(50 mM) Vivantis
- **dNTP** (-20 °C’de muhafaza edildi)  
Deoksi-nükleotid trifosfatların her birinden 25 µl alınarak 900 µl steril distile su eklenerek stok karışım hazırlandı.
- **Primerler** (-20 °C’de muhafaza edildi)  
LMP2 ve LMP7 genlerinde incelenecek polimorfizmleri kapsayan bölgelerin amplifikasyonu için tasarlanan özgül primer dizileri Tablo3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** LMP2 ve LMP7 genlerinin çoğaltılmasında kullanılan özgül primer dizileri (Sugimoto vd., 2002)

| GEN  | PRİMER DİZİLERİ                                                        | PZR ÜRÜN BÜYÜKLÜĞÜ |
|------|------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| LMP2 | İP 5'-CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG-3'<br>GP 5'-CAGCTGAACCAGAGAGTGCATAGT-3' | 228 bç             |
| LMP7 | İP 5'-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3'<br>GP 5'-TCTCCGGGACTGAAGGCTA-3'          | 304 bç             |

**Tablo 3.3.** LMP2 ve LMP7 genlerinin çoğaltılması için hazırlanan reaksiyon içeriği

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| ddH <sub>2</sub> O                              | 17,3 µl |
| dNTP                                            | 2,0 µl  |
| 10x tampon                                      | 2,5 µl  |
| MgSO <sub>4</sub> (25 mM)                       | 1,5 µl  |
| İleri primer LMP2 (100 pmol)<br>LMP7 (100 pmol) | 0,3 µl  |
| Geri primer LMP2 (100 pmol)<br>LMP7 (100 pmol)  | 0,3 µl  |
| Taq polimeraz (5u/µl)                           | 0,1 µl  |
| * DNA örneği                                    | ~1,0 µg |
| Toplam                                          | 25 µl   |

\*DNA örneği miktarı DNA konsantrasyonuna göre değişmektedir.

PZR işleminin gerçekleştirildiği ısı döngüleri ise Tablo 3.4.'de verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu bireylerine ait genomik DNA'ların LMP2 ve LMP7 gen bölgeleri, Takara PCR (Gradient PCR) ısı döngüleyici kullanılarak çoğaltılmıştır.

**Tablo 3.4.** PZR işleminin gerçekleştirildiği ısı döngüleri

|          | İŞLEM                 | SICAKLIK | SÜRE  | DÖNGÜ SAYISI |
|----------|-----------------------|----------|-------|--------------|
| 1. SAFHA | Ön Denatürasyon       | 95 °C    | 5 dk  | 1            |
| 2. SAFHA | Denatürasyon          | 95 °C    | 30 sn | 35           |
|          | Primer Bağlanma       | 53 °C    | 30 sn |              |
|          | Zincir Uzama (Sentez) | 72 °C    | 30 sn |              |
| 3. SAFHA | Final Sentez          | 72 °C    | 5 dk  | 1            |

### 3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR sonucunda elde edilen ürünlerin kontrolü için, kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olan agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

#### 3.4.1. Agaroz jel Elektroforezi için Kullanılan Kimyasallar

- **Etidyum Bromür**

Steril distile su ile 5 mg/ml olacak şekilde 10 ml'lik stok hazırlandı.

- **Agaroz jel Yükleme Tamponu**

6x, 10x Bromo Fenol mavisi yükleme tamponu (Fermentas)

Orange G yükleme tamponu

10mM Tris-HCl, % 0.15 Orange G boyası, %0.3 ksilen siyanol, %60 gliserol ve 60mM EDTA

- **TBE Tampon Çözeltisi (pH: 8,3)**

Tris 121,1 g

Borik Asit 61,8 g

EDTA 7,44 g

Distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı ve NaOH ile pH 8.3'e ayarlandı.

Membran filtre ile sterilize edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### 3.4.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

- 2 g agaroz hassas terazide tartılıp bir erlene konuldu.
- Üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ilave edildi ve mikrodalga fırın kullanılarak agaroz eriyip solüsyon homojenize olana kadar kaynatıldı.
- Erlen 50-55 °C'ye soğutulduktan sonra, içerisine 10 µl etidyum bromür (5mg/ml) eklendi.
- Karışım hava kabarcığı olmayacak şekilde jel tabağına döküldü ve oda sıcaklığında yaklaşık 40 dk jelin polimerize olması için bekletildi.
- Jel tabağı, jel tamamen tamponun içerisinde olacak şekilde tankın içerisine yerleştirildi.

- PZR ürünleri (8 µl), Bromo fenol mavisi veya orange G içeren yükleme tamponu (6 µl) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
- Örnekler 120 V akımda yaklaşık 35 dakika yürütüldü. (Cleaver MP- 250 V Yatay elektroforez sistemi)
- Ardından jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat) UV ışığında bantlar görüntülendi ve görüntüler bilgisayarda kaydedildi.

### 3.5. LMP2 ve LMP7 Gen Polimorfizmlerinin RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği ile Analizi

Polimorfizm analizi, genel olarak polimeraz zincir reaksiyonu-bağlantılı restriksiyon fragment polimorfizmi (PZR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırılmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklılıklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır (Deligezer, 2004).

Restriksiyon enzim koşulları Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da gösterilmiştir. Kesim sonucu oluşan ürünler, agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı ve UV ışığında görüntülendi. Oluşan bantların büyüklükleri standart DNA belirleyicileri ile karşılaştırılarak tespit edildi ve bu şekilde polimorfizmler analiz edilebildi.

**Tablo 3.5.** LMP2 gen bölgesinin Hha I ile Kesim Koşulları

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| PZR ürünü                   | 6 µl   |
| Restriksiyon enzimi (Hha I) | 0,5 µl |
| 10Xtampon                   | 1 µl   |
| ddH <sub>2</sub> O          | 2,5 µl |
| Toplam                      | 10 µl  |

37 °C’de 4 saat inkübe edildi.

**Tablo 3.6.** LMP7 gen bölgesinin Bsm I ile Kesim Koşulları

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| PZR ürünü                   | 6 µl   |
| Restriksiyon enzimi (Bsm I) | 0,5 µl |
| 10Xtampon                   | 1 µl   |
| ddH <sub>2</sub> O          | 2,5 µl |
| Toplam                      | 10 µl  |

37 °C’de 4 saat inkübe edildi.

PZR ürünlerinin kesimi sonucunda oluşan bantların büyüklükleri Tablo 3.7.’de verilmiştir.

**Tablo 3.7.** Kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri (Sugimoto vd., 2002)

| Polimorfizm                                                | Restriksiyon Enzimi | Kesim Ürünleri    |
|------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| <b>LMP2</b><br>60 (CGC→TGC)<br>Arjinin (R) → Histidin (H)  | Hha I               | 199 ve 29 bç – R  |
| <b>LMP7</b><br>145 (CAG → AAG)<br>Glutamin (Q) → Lizin (K) | Bsm I               | 174 ve 130 bç – Q |

Kesim ürünlerinin analizi için % 3’lük agaroz jel hazırlandı. Kesim ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Örnekler, 90 V’da yaklaşık 1 saat yürütüldü. Kesim ürünlerinin büyüklükleri DNA belirleyicilerle karşılaştırılarak tespit edildi.

### 3.6. Genotip Tayini

LMP2 gen bölgesine ait PZR ürünü 228 bç uzunluğundadır. Kesim işlemi sonucunda; 228 bç'lik tek bir bant gözleendiğinde (her iki allel de kesilmemiş) genotip (H/H); 199 ve 29 bç'lik iki bant gözleendiğinde (her iki allel de kesilmiş) genotip (R/R); 228, 199 ve 29 bç'lik üç bant gözleendiğinde ise genotip (R/H) olarak değeriendirildi. (Tablo 3.8).

LMP7 genine ait PZR ürünü ise 304 bç uzunluğundadır. Kesim işlemi sonucunda; 304 bç'lik tek bir bant gözleniyorsa (her iki allel de kesilmemiş ise) genotip (K/K); 174 ve 130 bç'lik iki bant gözleniyorsa (her iki allel de kesilmiş) genotip (Q/Q); 304, 174 ve 130 bç'lik üç bant gözleniyorsa genotip (Q/K) olarak değeriendirildi. (Tablo 3.9).

**Tablo 3.8.** Kesim sonucunda elde edilen bantlara göre LMP2 genotiplendirme

| LMP2 (GENOTİPLER) | BANT BÜYÜKLÜKLERİ     |
|-------------------|-----------------------|
| R/R               | 199 bç, 29 bç         |
| R/H               | 228 bç, 199 bç, 29 bç |
| H/H               | 228 bç                |

**Tablo 3.9.** Kesim sonucunda elde edilen bantlara göre LMP7 genotiplendirme

| LMP7 (GENOTİPLER) | BANT BÜYÜKLÜKLERİ      |
|-------------------|------------------------|
| Q/Q               | 174 bç, 130 bç         |
| Q/K               | 304 bç, 174 bç, 130 bç |
| K/K               | 304 bç                 |

### **3.7. İstatiksel Analizler**

LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin PZR-RFLP ile incelenmesi sonucunda allel ve genotip frekansları direk sayım yöntemi ile belirlendi. Hasta ve kontrol grubu verileri “SPSS 13,0 for Windows” programı ile Ki-kare ( $\chi^2$ ) analizi yapılarak karşılaştırılmıştır

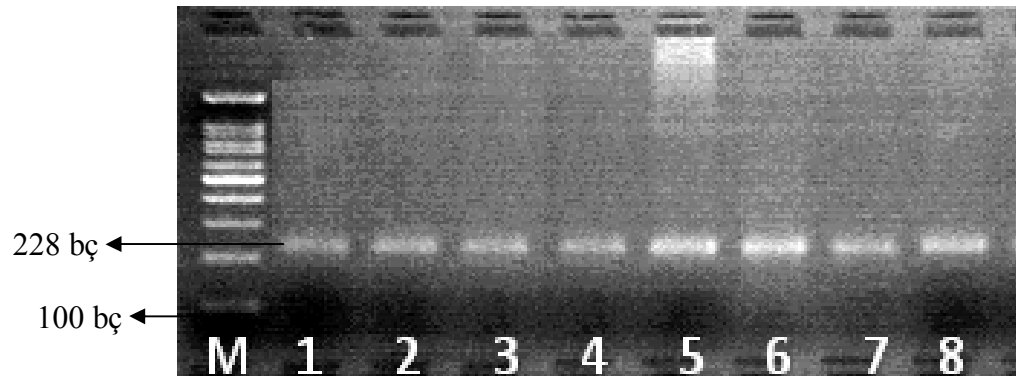
## BÖLÜM 4

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1. Örneklem ve DNA İzolasyonu

Çalışmada, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji bölümünde tanı konmuş hasta ve kontrol bireylerinden izole edilen DNA örneklerinde LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri PZR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elli üç KML, otuz bir AML, yirmi yedi KLL, yirmi sekiz MM hastası olmak üzere toplamda yüz otuz dokuz hasta ve yüz yirmi üç sağlıklı bireyden kan alınmıştır ama DNA izolasyonu 48 KML, 27 AML, 23 KLL, 25 MM hastası olmak üzere 123 hasta ve 110 sağlıklı bireyde başarı ile yapılmıştır. DNA konsantrasyonları ölçüldüğünde ortalama 200 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

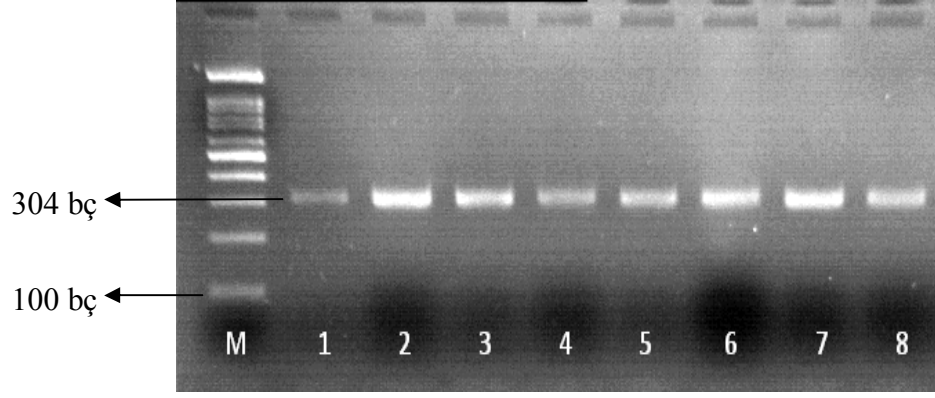
#### 4.2. LMP2 ve LMP7 Genlerinin PZR ile Çoğaltılması



**Şekil 4.1.** LMP2 geninin PZR ile çoğaltılması sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi

M: 100 bç'lik DNA belirleyici (marker)

1-8: Hastalarda LMP2 geninin çoğaltılması sonucu elde edilen 228 bç'lik ürün

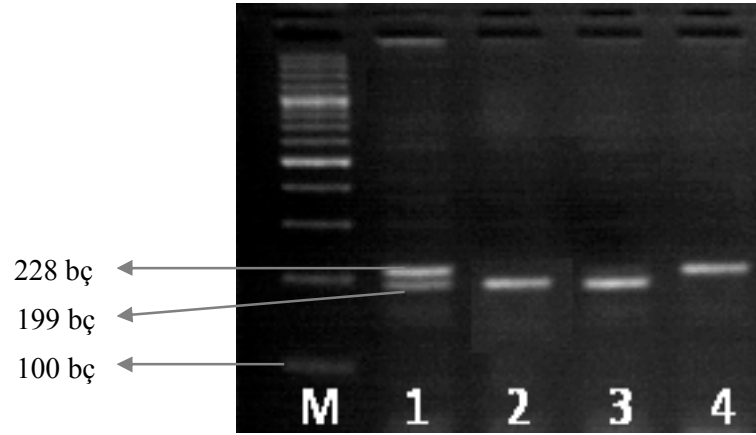


**Şekil 4.2.** LMP7 geninin PZR ile çoğaltılması sonrasında agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi

M: 100 bç'lik DNA belirleyici (marker)

1-8: Hastalarda LMP7 geninin çoğaltılması sonucu elde edilen 304 bç'lik ürün

#### 4.3. LMP2 ve LMP7 Gen Polimorfizmlerinin RFLP Tekniği ile Analizi



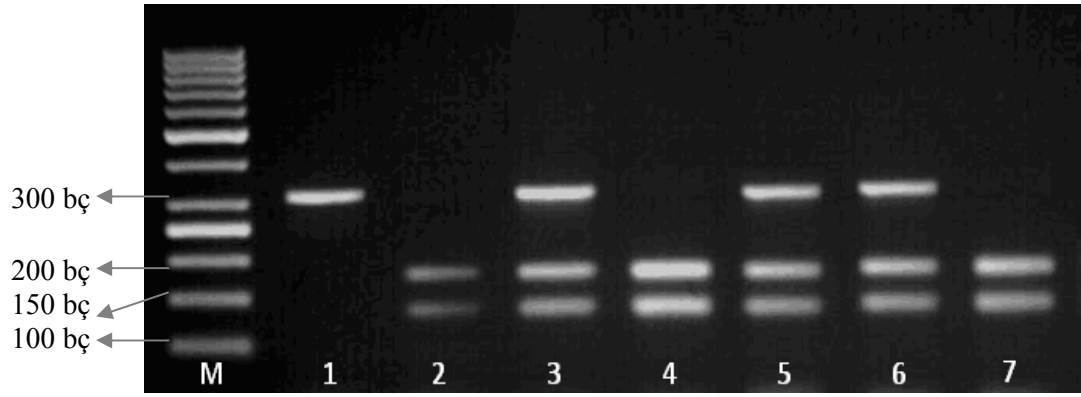
**Şekil 4.3.** LMP7 gen polimorfizminin Hha I enzim kesimiyle analizi

M: 100 bç'lik DNA belirleyici

1: H/h (199 bç)

2,3: h/h (199 bç)

4: H/H (228 bç)



**Şekil 4.4.** LMP7 gen polimorfizminin Bsm I enzim kesimiyle analizi

M: 50 bç'lik DNA belirleyici

1: Kesilmemiş PZR ürünü (304 bç)

2,4,7: Q/Q (174 bç, 130 bç)

3,5,6: Q/K (304 bç, 174 bç, 130 bç)

Çalışma sonucunda kontrol ve hasta gruplarında elde edilen LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmi genotip ve allel frekansları Tablo 4.1' de toplu halde verilmiştir.

#### 4.4. LMP2 Gen Polimorfizmi ve KML İlişkisi

KML hasta grubunda LMP2-R allel frekansı 0.59 hesaplanmışken, kontrol grubunda bu değer 0.55 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Her iki gruptaki LMP2 genotip dağılımı karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $\chi^2 = 1.79$ ,  $p > 0.05$ ). Başka bir deyişle, LMP2 gen polimorfizmi ile KML gelişimi arasında bir ilişki saptanmamıştır.

**Tablo 4.2.** KML ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| LMP2 Genotipler | KONTROL (n=110) % | KML (n=48) % | $\chi^2$ | p     |
|-----------------|-------------------|--------------|----------|-------|
| H/H             | 30                | 23           | 1.79     | 0.407 |
| H/R             | 30                | 35           |          |       |
| R/R             | 40                | 42           |          |       |

**Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol grubunda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekanslarının karşılaştırılması

|       |                   | KONTROL GRUBU (n=110) | HASTA GRUBU |      |            |      |            |      |           |      |     |
|-------|-------------------|-----------------------|-------------|------|------------|------|------------|------|-----------|------|-----|
|       |                   |                       | KML (n=48)  |      | AML (n=28) |      | KLL (n=23) |      | MM (n=25) |      |     |
| LMP 2 | H/H               | 34                    | %31         | 11   | %23        | 16   | %57        | 4    | %17       | 1    | %4  |
|       | H/R               | 32                    | %29         | 17   | %35        | 8    | %29        | 14   | %61       | 11   | %44 |
|       | R/R               | 44                    | %40         | 20   | %42        | 4    | %14        | 5    | %22       | 13   | %52 |
|       | Allel Frekansları | H                     | 0,45        | 0,41 |            | 0,71 |            | 0,48 |           | 0,26 |     |
|       |                   | R                     | 0,55        | 0,59 |            | 0,29 |            | 0,52 |           | 0,74 |     |
| LMP 7 | Q/Q               | 97                    | %88         | 42   | %88        | 22   | %76        | 19   | %83       | 23   | %92 |
|       | Q/K               | 13                    | %12         | 6    | %12        | 6    | %21        | 3    | %13       | 1    | %4  |
|       | K/K               | 0                     | %0          | 0    | %0         | 1    | %3         | 1    | %4        | 1    | %4  |
|       | Allel Frekansları | Q                     | 0,94        | 0,94 |            | 0,86 |            | 0,89 |           | 0,94 |     |
|       |                   | K                     | 0,06        | 0,06 |            | 0,14 |            | 0,11 |           | 0,06 |     |

#### 4.5. LMP2 Gen Polimorfizmi ve AML İlişkisi

LMP2-R allel frekansı AML hasta grubunda 0.29 ve kontrol grubunda ise 0.55 olarak hesaplanmıştır. AML'li hastaların DNA'ları LMP2 polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde, H/H genotipini taşıyanların sıklığı % 57, R/R genotipini taşıyanların sıklığı % 14 olarak saptanmıştır. Aynı değerler kontrol grubunda sırasıyla % 31 ve % 40 olarak saptanmıştır. H/R genotipini taşıyanların sıklığı her iki grupta da % 30 olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

LMP2 gen polimorfizmini genotip dağılımlarına bakıldığında, kontrol ve AML hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $\chi^2 = 20.2$ ,  $p=0.00$ ). bu nedenle, LMP2 gen polimorfizminin AML gelişiminde etken olabileceği düşünülebilir.

**Tablo 4.3.** AML ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| LMP2 Genotipler | KONTROL (n=110) % | AML (n=28) % | $\chi^2$ | p     |
|-----------------|-------------------|--------------|----------|-------|
| H/H             | 30                | 57           | 20.2     | 0.000 |
| H/R             | 30                | 29           |          |       |
| R/R             | 40                | 14           |          |       |

#### 4.6. LMP2 Gen Polimorfizmi ve KLL İlişkisi

KLL hasta grubunda LMP2-R allel frekansı 0,52 hesaplanmışken, kontrol grubunda bu değer 0.55 olarak hesaplanmıştır. Allel frekansları benzerlik göstermesine rağmen KLL ve hasta grubu DNA'ları LMP2 polimorfizmi genotip dağılımları açısından değerlendirildiğinde, H/H genotipini taşıyanların sıklığı % 17, H/R genotipini taşıyanların sıklığı % 61, R/R genotipini taşıyanların sıklığı % 21 olarak saptanmışken, aynı değerler kontrol grubunda sırasıyla % 30, % 30 ve % 40 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.4). KLL hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla her iki homozigot genotipin azaldığı fakat heterozigotlarda artış olduğu tespit edilmiştir.

LMP2 gen polimorfizmi genotip dağılımı incelendiğinde, KLL ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $\chi^2 = 20.7$ ,  $p=0.000$ ) ve bu bulgu LMP2 gen polimorfizminin KLL gelişiminde önemli role sahip olduğunu destekler niteliktedir.

**Tablo 4.4.** KLL ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| <b>LMP2 Genotipler</b> | <b>KONTROL (n=110) %</b> | <b>KLL (n=23) %</b> | <b><math>\chi^2</math></b> | <b>p</b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|----------|
| <b>H/H</b>             | 30                       | 17                  | 20.7                       | 0.000    |
| <b>H/R</b>             | 30                       | 61                  |                            |          |
| <b>R/R</b>             | 40                       | 22                  |                            |          |

#### 4.7. LMP2 Gen Polimorfizmi ve MM İlişkisi

LMP2-R allel frekansı, MM hasta grubunda 0,74 ve kontrol grubunda 0.55 olarak hesaplanmıştır. MM hasta grubu DNA'larının LMP2 polimorfizmi genotip dağılımı değerlendirildiğinde, H/H genotipini taşıyanların sıklığı % 4, H/R genotipini taşıyanların sıklığı % 44, R/R genotipini taşıyanların sıklığı % 52 olarak saptanmışken, kontrol grubunda bu değerler sırasıyla % 31, % 29, % 40 olarak saptanmıştır (Tablo 4.5). MM hasta grubunda kontrol grubuna oranla H/H genotipindeki belirgin azalmaya karşın R/R genotipindeki artış dikkat çekmektedir.

Genotip dağılımları karşılaştırıldığında kontrol ve MM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmektedir ( $\chi^2 = 24,1$ ,  $p=0.000$ ). Elde edilen bulgular LMP2 polimorfizminin MM hastalığı ile olası ilişkisini ortaya koymaktadır.

#### 4.8. LMP7 Gen Polimorfizmi ve KML İlişkisi

LMP7 gen polimorfizmi KML ve kontrol grubunda incelendiğinde, Q allelinin frekansı çalışılan iki grupta da 0.94 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6) ve genotip frekansları dikkate alındığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $\chi^2 = 0$ ).

**Tablo 4.5.** MM ve kontrol grubunda LMP2 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| LMP2 Genotipler | KONTROL (n=110) % | MM (n=25) % | $\chi^2$ | p     |
|-----------------|-------------------|-------------|----------|-------|
| H/H             | 30                | 4           | 25.5     | 0.000 |
| H/R             | 30                | 44          |          |       |
| R/R             | 40                | 52          |          |       |

**4.8. LMP7 Gen Polimorfizmi ve KML İlişkisi**

LMP7 gen polimorfizmi KML ve kontrol grubunda incelendiğinde, Q allelinin frekansı çalışılan iki grupta da 0.94 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6) ve genotip frekansları dikkate alındığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $\chi^2=0$ ).

**Tablo 4.6.** KML ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| LMP7 Genotipler | KONTROL (n=110) % | KML (n=48) % | $\chi^2$ | p |
|-----------------|-------------------|--------------|----------|---|
| Q/Q             | 88                | 88           | 0        |   |
| Q/K             | 12                | 12           |          |   |
| K/K             | 0                 | 0            |          |   |

**4.9. LMP7 Gen Polimorfizmi ve AML İlişkisi**

LMP7- Q alleli frekansı, AML hasta grubunda 0,86, kontrol grubunda ise 0,94 olarak hesaplanmıştır. AML hasta grubunda Q/Q genotipini taşıyanların sıklığı % 76, Q/K genotipini taşıyanların sıklığı % 21, K/K genotipini taşıyanların sıklığı % 3 olarak saptanmışken, kontrol grubunda Q/Q genotipini taşıyanların sıklığı % 88, Q/K

genotipini taşıyanların sıklığı % 12 bulunmuş, ancak kontrol grubu bireylerinde K/K genotipini taşıyan bireye rastlanmamıştır (Tablo 4.7). LMP7 gen polimorfizmi Genotip frekansları karşılaştırıldığında, kontrol ve AML hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiş olup ( $\chi^2 = 6.33$ ,  $p=0.042$ ), elde edilen bulgular LMP7 gen polimorfizmi ve AML gelişimi arasında bir ilişki olabileceği yolundadır.

**Tablo 4.7.** AML ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| LMP7 Genotipler | KONTROL (n=110) % | AML (n=29) % | $\chi^2$ | p     |
|-----------------|-------------------|--------------|----------|-------|
| Q/Q             | 88                | 76           | 6.33     | 0.042 |
| Q/K             | 12                | 21           |          |       |
| K/K             | 0                 | 3            |          |       |

#### 4.10. LMP7 Gen Polimorfizmi ve KLL İlişkisi

KLL hasta grubunda LMP7-Q allel frekansı 0,89 hesaplanmışken, kontrol grubunda bu değer 0,94 olarak hesaplanmıştır. KLL hasta grubunda Q/Q genotipini taşıyanların sıklığı % 83, Q/K genotipini taşıyanların sıklığı % 13 olarak saptanmış olup kontrol grubunda Q/Q genotipini taşıyanların sıklığı % 88, Q/K genotipini taşıyanların sıklığı % 12 olarak saptanmıştır. Kontrol grubu bireylerinde K/K genotipini taşıyan bireye rastlanmamıştır ancak KLL hasta grubunda K/K genotipi sıklığı % 4 olarak saptanmıştır (Tablo 4.8). Genotip dağılımlarının karşılaştırılması sonucunda, kontrol ve MM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $\chi^2 = 4,18$ ,  $p > 0.05$ ). Allel frekansları ve genotip dağılımları kontrol grubunda ve KLL hasta grubunda uyum göstermektedir.

**Tablo 4.8.** KLL ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| <b>LMP7<br/>Genotipler</b> | <b>KONTROL<br/>(n=110) %</b> | <b>KLL<br/>(n=23) %</b> | <b><math>\chi^2</math></b> | <b>P</b> |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------|
| <b>Q/Q</b>                 | 88                           | 83                      | 4.18                       | 0.123    |
| <b>Q/K</b>                 | 12                           | 13                      |                            |          |
| <b>K/K</b>                 | 0                            | 4                       |                            |          |

#### 4.11. LMP7 Gen Polimorfizmi ve MM İlişkisi

LMP7 gen polimorfizmi MM ve kontrol grubunda incelendiğinde, Q allelinin frekansı çalışılan her iki grupta da 0.94 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9). Genotip dağılımlarındaki farklılık ise ki-kare analizine göre anlamlı ölçüdedir ( $\chi^2 = 8,09$ ,  $p = 0.018$ ). MM hasta grubunda kontrol grubuna oranla homozigotlardaki artışa karşın heterozigot birey sayısında azalma görülmüştür. Bu durumda, MM ile LMP7 gen polimorfizmi arasında bir ilişki olabileceği düşünülebilir.

**Tablo 4.9.** MM ve kontrol grubunda LMP7 genotip dağılımlarının karşılaştırılması

| <b>LMP7<br/>Genotipler</b> | <b>KONTROL<br/>(n=110) %</b> | <b>MM<br/>(n=25) %</b> | <b><math>\chi^2</math></b> | <b>p</b> |
|----------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------|----------|
| <b>Q/Q</b>                 | 88                           | 92                     | 8.08                       | 0.018    |
| <b>Q/K</b>                 | 12                           | 4                      |                            |          |
| <b>K/K</b>                 | 0                            | 4                      |                            |          |

#### 4.12. Hardy-Weinberg Dengesinin Test Edilmesi

LMP2 gen polimorfizmi açısından çalışmaya dahil edilen tüm gruplarda Hardy Weinberg dengesi test edilmiş ve kontrol grubu dışında tüm grupların dengede olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise H/H genotipinin beklenenden fazla, H/R genotipinin ise beklenenden az gözleendiği tespit edilmiştir ( $\chi^2 = 10.2$ ,  $p=0.006$ ).

Kontrol grubu ve tüm hasta gruplarının LMP7 gen polimorfizmi açısından Hardy-Weinberg dengesinde olduğu tespit edilmiştir ( $p > 0.05$ ).

Daha önce birçok hastalıkla ilişkisi tespit edilmiş olan LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin hematolojik malignitelerde (KML, AML, KLL, MM) allel ve genotip frekanslarının belirlenmesine yönelik tamamlanan bu çalışmanın sonucunda, KML hastalığında LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin bir etken olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır (Tablo 4.10). Öte yandan, AML ve MM hastalığında her iki gendeki polimorfizmlerin de etken olabileceği düşünülmektedir. KLL hastalığında ise LMP2 geninde bir ilişki tespit edilebilmiş ancak LMP7 geni ile bir ilişki saptanmamıştır.

**Tablo 4.10.** Çalışılan hastalıklarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmi ilişkisi

|     | LMP2 | LMP7 |
|-----|------|------|
| KML | -    | -    |
| KLL | +    | -    |
| AML | +    | +    |
| MM  | +    | +    |

- + hastalıkla ilgili gen polimorfizmi arasında ilişki var
- hastalıkla ilgili gen polimorfizmi arasında ilişki yok

Önceki çalışmalarda, LMP genleri ile birçok hastalık arasında ilişki bulunmuşken Sarkoidoz ve Behçet hastalığı gibi oluşum mekanizması tam olarak aydınlanamamış bazı hastalıklarda ilişki bulunamamıştır (Tablo 4.11). *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu, HSV Tip I enfeksiyonu, Alerjik pnömoni hastalığı ve mesane kanseri

gibi hastalıkların sadece LMP7 gen polimorfizmi ile ilişkisinin bulunması da dikkat çekicidir.

Kanser gelişiminde genlerin etkilerine ek olarak çevresel risk faktörleri de unutulmamalıdır. Kanser gelişiminde genlerin ve varyasyonlarının, çevresel risk faktörleriyle birlikte etkisi, tek tek göstermiş oldukları etkinin toplamından daha fazla olabilmektedir. Kişinin genetik yapısı kanser gelişimine doğrudan yatkınlık yaratabildiği gibi, kişinin çevresel faktörlere karşı verdiği yanıtta da etkilidir. Bir başka deyişle, genetik yapı çevresel faktörlerin zararlı etkilerine kişinin daha duyarlı ya da daha dirençli olmasında belirleyici bir faktördür. Kanser oluşumunda, çevre ve gen ilişkisi oldukça karmaşıktır.

Cao vd. (2005), TAP2 ve LMP7 genlerindeki polimorfizmlerin HPV enfeksiyonuna bağlı özofagus kanseri ile ilişkili olduğu yönünde sonuçlar elde etmiştir. Ayrıca, Mehta vd. (2007) tarafından yapılan çalışma sonucunda servikal kanser gelişiminde LMP7-145 polimorfizminin rolü olabileceği ileri sürülmüştür.

LMP ve TAP gen ekspresyonunun düşüklüğü nedeniyle MHC sınıf I yüzey ekspresyonundaki bozukluklar çeşitli kanser hücrelerinde gösterilmiş ve bu bozuklukların immün sistemden kaçışa sebep olabileceği bildirilmiştir (Seliger vd, 2000). Dolayısıyla, LMP ve TAP genlerindeki bozukluklar tümörogenezi kolaylaştırabilir. Ayrıca, LMP ve TAP genlerindeki polimorfizmler çeşitli insan tümörlerinde yüksek sıklıkta gözlenmiştir (Seliger vd, 2002).

HLA sınıf II molekülleri hücre döngüsü ve çoğalmada etkili oldukları için B-hücreli malignitelerin tedavisinde hedef proteinler olarak düşünülmüştür (Kostelny vd, 2001). Bu amaçla kullanılan ilaçlardan birisi Lym-1' dir (Hu, 1989).

Alemtuzumab, alkilleyici ajanlarla tedavi edilmiş ve fludarabin tedavisine yanıt vermemiş B-hücreli KLL hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere 2001 yılında FDA tarafından onaylanmış bir ilaçtır. Alemtuzumab (Campath-1H), normal B ve T lenfositlerinin yüzeyinde ifade edilen bir glikoprotein olan CD52' yi hedef alan bir monoklonal antikordur ve kompleman ve antikor-bağımlı hücre sitotoksitesine neden olmaktadır (Dumont, 2002).

**Tablo 4.11.** Bazı hastalıklarda LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmleri ilişkisi

| Hastalık İsmi                           | LMP 2 | LMP7 |
|-----------------------------------------|-------|------|
| İnsülin Bağımlı Diyabet                 | +     | -    |
| İdiyopatik-Sekonder Membranöz Nefropati | -     | -    |
| Romatoid Artrit                         | -     | -    |
| Sarkoidoz ve Behçet hastalığı           | -     | -    |
| Atopik dermatit hastalığı               | -     | -    |
| HCV enfeksiyonu                         | +     | +    |
| Vitiligo                                | +     | +    |
| Alzheimer hastalığı                     | +     | +    |
| Ankilozan spondilit                     | +     | -    |
| Özofagus kanseri                        | +     | +    |
| HBV enfeksiyonu                         | +     | +    |
| Sedef hastalığı                         | +     | +    |
| Arteriyel Hipertansiyon Hastalığı       | +     | -    |
| <i>Toxoplasma gondii</i> enfeksiyonu    | -     | +    |
| Alerjik pnömoni hastalığı               | -     | +    |
| HSV Tip I enfeksiyonu                   | -     | +    |
| Mesane kanseri                          | -     | +    |

- + hastalıkla ilgili gen polimorfizmi arasında ilişki var
- hastalıkla ilgili gen polimorfizmi arasında ilişki yok

Kanser hücrelerinin çoğu normal hücrelere göre proteozom inhibisyonuna daha duyarlıdır (Kisselev ve Goldberg, 2001). Nükleer faktör kapa B' nin endojen inhibitörünün proteozom ile yıkımı NF-kB' nin aktivasyonuna ve hücre çoğalmasını indükleyen genlerin transkripsiyonunun tetiklenmesine neden olmaktadır. Proteozom sisteminin engellenmesi çok sayıda hücreyel olayı etkileyebilir. Boronik asit dipeptidi olan Bortezomib (Velcade) proteozom kompleksinin geri dönüşümlü inhibitörüdür ve Multipl Myelomun hedeflenmiş tedavisine yönelik klinik denemelerde kullanılmıştır (Adams, 2004).

LMP2 ve LMP7 genlerinin hastalıklarla ilişkisini açıklamaya yönelik değişik mekanizmalar önerilebilir. Bu lokuslardaki genetik varyasyon ilgili proteinlerde fonksiyonel değişimlere neden olabilir, örneğin immunoproteozomun sübrat özgülüğünü ve proteolitik aktivitesini değiştirebilir. Ayrıca bu polimorfizmler ilişkili mRNA' ların veya proteinlerin sentezini veya yapısal kararlılığını etkiliyor olabilir. Bu fonksiyonel değişimlere bağlı olarak, sunulan peptidlerin çeşitliliği ve dolayısıyla da immün cevap etkilenebilir. Ancak, řu an için bu polimorfizmlerin hangi mekanizmalar sayesinde hastalıklarda etkili olduğunu anlayabilmek için yeterince kuvvetli bilgiler bulunmamaktadır. Bundan dolayı, hastalığa yatkınlık mekanizmasının anlaşılabilmesi için hasta sayıları arttırılarak yapılacak çok daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

## **BÖLÜM 5**

### **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Hematolojik Malignansilerde LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin etkisinin incelendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, KML patogeneğinde LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin temel genetik mekanizma olmadığını göstermektedir.
2. LMP2 gen polimorfizminin AML gelişiminde etken olabileceği düşünülmektedir.
3. Elde edilen veriler, LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin KLL gelişiminde önemli role sahip olabileceğini destekler niteliktedir.
4. LMP2 ve LMP7 gen polimorfizmlerinin MM gelişiminde rol aldığı düşünülebilir.

LMP2 ve LMP7 alel-genotip frekanslarının farklı Hematolojik kanserlerde farklı oranlarda olması ve bu genlerin belli kanser tipleri ile ilişkili bulunması hastalığın önceden teşhisi ve dolayısıyla tedavide uygun ilaç(ların) seçimine katkı sağlayabilir.

LMP2 gen polimorfizminin KML hariç diğer hastalıklarda; LMP7 gen polimorfizminin ise sadece AML ve MM hastalıklarının teşhisinde prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İmmun cevabın düzenlenmesi çok sayıda genin dahil olduğu oldukça karmaşık bir süreçtir, bu nedenle de hastalıklara yatkınlıkta genlerin tek başına sınırlı etkileri olacağı düşünülebilir. Bu çalışmada olgu sayısının azlığı çalışmada bir eksiklik olarak kabul edilmektedir, ancak bu çalışma bir ön çalışma niteliğindedir ve daha sonra yapılacak çalışmalara temel oluşturabilir. Hastalık-polimorfizm ilişkisinde ne tür bir mekanizmanın etken olduğunun belirlenmesi için daha büyük hasta gruplarında ve çok yönlü olarak LMP gen polimorfizmlerinin araştırılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adams J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, **4**, 349-360.
- Akçam F.Z. (2003). HLA Sistemi: Türkiye Klinikleri, *Turkish Journal of Medical Science*, **25**, 829-834
- Aksoy K., Kayrın L., Tuli A., Attila G., İnal T.C., Yalın E. (2000). *Tanıda DNA Teknikleri Yaz Okulu IV* Kitapçık.
- Alkan S. (2008). Kronik Lenfositik Lösemi (KLL): Patogenezi ve Biyolojisi, XXXI. *Ulusal Hematoloji Kongresi, VIII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu*, 17-22.
- Altıok E. (2008). Kansere Tanı Ve Tedavisinde Genetik Devrim: *Moleküler Onkoloji Acıbadem Genetik Tanı ve Hücre Tedavi Merkezi*, 1-3.
- Altuntaş F., Kaynar L., Eser B., Sarı İ., Kaplan B., Özkan M., Çetin M., Ünal A. (2004). Multipl Myeloma Tedavisinde Üç Farklı Konvansiyonel Kemoterapi Protokolünün Karşılaştırması: Tek Merkez Deneyimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, **19**, Sayı 1.
- Artan B. (2009). Multipl Myeloma'da Kromozomal Düzensizliklerin Sitogenetik ve Fish Yöntemleriyle Belirlenmesi, *Sağlık Bilimleri Yüksek Lisans Tezi*.
- Aydın Y. (2005a). Hematolojik Malignitelerin Klinik Belirtileri ve Fizik Muayene Bulguları, *Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maligniteler*, sempozyum dizisi No:45, s 09-23

- Aydın Y. (2005b). Multipl Myelom, *Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maligniteler*, sempozyum dizisi No:45, s249-262.
- Banu Ç. (2008). Hematolojik Kanser ve Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu Hastalarında Akciğerin Mantar İnfeksiyonlarının Tedavi ve Profilaksisi, *Klinik Dergisi* . **21**, 54-59.
- Barry B., Lowitz ve Dennis A. (2005). *Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology*, **6**, 45-51.
- Beksac M. (2004). HLA ve Doku Tiplendirilmesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı. 42-49.
- Birben E. (2006). Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji*, **4**, 92-94.
- Cabadak H. (2008). Hücre Siklusu ve Kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* , **3** , 51 – 61.
- Camerena A., Aquino-Galvez A., Falfán-Valencia R., Sánchez G., Montaña M., Ramos C., Juárez A., García-de-Alba C., Granados J., Selman M. (2010). PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Medicine*, **6**, 889-94
- Cao B., Tian X., Li Y., Jiang P., Ning T., Xing H., Zhao Y., Zhang C., Shi X., Chen D., Shen Y., Ke Y. (2005). LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in Esophageal Carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis*, **26**, 1280-1284.
- Casp C.B., She J.X., McCormack W.T. (2003). Genes of the LMP/TAP Cluster are Associated with the Human Autoimmune Disease Vitiligo. *Genes & Immunity*, **4**, 492-9.

- Changqing X., Suxia Q., Lei G., Hong C., Kun L., Bangwei C. (2007). Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and Hepatitis B Virus infection risk in the Chinese population. *Journal of Clinical Immunology*, **27**, 534-41.
- Changqing X., Suxia Q., Lei G., Hong C., Meiqiang L., Hongli Y., Kun L., Bangwei C. (2007). Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and Hepatitis B Virus infection risk in the Chinese population. *Journal of Clinical Immunology*, **27**, 534-41.
- Chou B., Hiromatsu K., Hisaeda H., Duan X., Imai T., Murata S., Tanaka K. (2010). Genetic immunization based on the ubiquitin-fusion degradation pathway against *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **3**, 277-82.
- Çarin, M.N. (2004). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Anabilim Dalı V. Çukurova Anestezi Günleri Transplantasyon ve İmmün Yanıt.
- Dai Y., Ning T., Li K., Qi SX., Jiang M.W., Chai QB., Gai YH., Wang X. (2005). Association between LMP2/LMP7 gene polymorphism and the infection of Hepatitis B Virus. *Beijing Da Xue Xue Bao*, **18**, 508-12
- Dalva K. (2004). Her yerde karşımda: Nedir bu HLA tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu. 42-52.
- Deligezer U. (2004). Gen Polimorfizm Analizinde Light Cycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması: Myeloid Lösemili Çocuk ve Yetişkin Hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi, *Türk Onkoloji Dergisi*, **19**,134-139.
- Demir R. (2005). Histoloji ve Hücre Biyolojisi, *Patolojiye Giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık, 271 -274.
- Deviren A. (2005). Hematolojik malignitelerde sitogenetik inceleme, Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maligniteler, sempozyum dizisi No:45, s75-81.

- Duman N. (2008). Kronik Lenfositik Lösemili Hastalarda Xrcc1 (X-Ray Cross Complementing Group 1) Geninde Arg399Gln ve Arg194Trp Polimorfizmlerinin ve Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığı ile Korelasyonlarının Araştırılması, *Sağlık Bilimleri Doktora Tezi*.
- Dumont F.J. (2002). CAMPATH (alemtuzumab) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther*, **2**, 23-35.
- Durie B.G., Salmon S.E. (1975). Clinical staging system for multiple myeloma: corelation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, **36**, 842-54.
- Eisemann J., Prechtel A T., Mühl-Zürbes P., Steinkasserer A., Kummer M. (2009). Herpes simplex virus type I infection of mature dendritic cells leads to reduced LMP7 mRNA-expression levels, *Immunobiology*, **9**, 10861-7.
- Ekmekçi A., Konaç E., Önen H.İ. (2008). Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık, *Marmara Medical Journal* , **3**, 282-295.
- Fonseca, Rafael., San Miguel J. (2007). Prognostic Factors and Staging in Multiple Myeloma. *Hematology/ Oncology Clinics of North America*, **5**, 1115–1140.
- Gülçin S. (2008). Multipl Myelomlu Olgularda Kromozom Aberasyonların Situ hibridizasyon (FISH) ve Konvansiyonel Sitogenetik yöntemlerle belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Harris N.L, Jaffe E.S, Diebold J. (1999). World Health Organization classification of neoplastic disease of hematopoietic and lymphoid tissue: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal Of Clinical Oncology*, **17**, 3835-49.

- Haznedaroğlu C.İ. (2007). Kronik Myeloid Lösemi (KML), *Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu*, 34-35.
- Honcharov S.V., Dosenko V.I., Khaïtovych M.V., Moïbenko O.O. (2010). Allel polymorphism of genes coding proteasome subunits is associated with an enhanced risk for arterial hypertension in adolescents. *Fiziol Zh*, **2**, 3-10.
- Hu E., Epstein A.L., Naeve G.S. (1989). A phase Ia clinical trial of LYM-1 monoclonal antibody serotherapy in patients with refractory B cell malignancies. *Hematol Oncol.*, **7**, 155-166.
- Hussong S.A., Kapphahn R.J., Phillips S.L., Maldonado M., Ferrington D.A. (2010). Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *Journal Of Neurochemistry.*, **6**, 1481-90.
- Ishihara M., Ohno S., Mizuki N., Yamagata N., Ishida T., Naruse T., Ando A. and Inoko H. (1999). LMP7 polymorphism in Japanese patients with Sarcoidosis and Behçet's disease. *Human Immunology*, **51**, 103-105.
- Kantarcı R. (2008). Akut Myeloblastik Lösemili Hastalarda Klinik Ve Demografik Özelliklerle Yüksek Doz Cytarabin Tedavisinin Hastalığın Gidişi Üzerine Etkisi, *Sağlık Bilimleri Uzmanlık Tezi*.
- Kılıçarslan C. (2010). Kronik Myelositer Lösemide Kromozom (1-9 Nolu Kromozomlar) Düzensizliklerinin MLPA Yöntemi İle Araştırılması, *Sağlık Bilimleri Yüksek Lisans Tezi*.
- Kisselev A.F., Goldberg A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.*, **8**, 739-758.
- Kostelny S.A., Link B.K., Tso J.Y. (2001). Humanization and characterization of the anti-HLA-DR antibody 1D10. *International Journal Of Cancer.* **93**, 556-565.

- Kutaniş A. (2005). Çocukluk Çağı Akut Lösemi Vakalarının Retrospektif Değerlendirilmesi, *Sağlık Bilimleri Uzmanlık Tezi*.
- Lee H.J., Ha S. J., Han H. and Kim J.W. (2001). Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with Atopic Dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, **31**, 1867-1874.
- Liu Q, Hao C, Su P, Shi J. (2009). Down-regulation of HLA class I antigen-processing machinery components in esophageal squamous cell carcinomas: association with disease progression. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology*, **44**, 8960-9.
- Maksymowych W.P., Inman R.D., Gladman D.D., Reeve J.P., Pope A., Rahman P. (2009). Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, **5**, 1317-23
- Mehta A.M., Jordanova E.S., Wezel T., Uh H., Corver W.E., Kwappenberg K.M.C., Verduijn W., Kenter G.G., Burg S.H., Fleuren G.J. (2007). Genetic variation of antigen processing machinery components and association with cervical carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **46**, 577- 586.
- Melnikova V.I., Afanasieva M.A., Dmitrieva S.B., Karpova Y.D., Sharova N.P., Zakharova L.A., (2008). Immune proteasomes in the developing rat thymus. *Biochemistry*. **44**, 51-7.
- Mihçioğlu D. (2010). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Populasyonunda Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-2 (Low Molecular Weight Polypeptide-LMP2) ve Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-7 (LMP7) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi, *Fen Bilimleri Yüksek Lisans Tezi*.
- Mihçioğlu D., Kök S., Gerçeker F.Ö. (2010). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Populasyonunda Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-2 Low Molecular Weight Polypeptide- (Lmp2) ve Düşük Moleküler Ağırlıklı Polipeptid-7

(Lmp7) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi, 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 1049-1050

Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. (2004). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*, **27**, 54–66.

Pala F.S. (2005). Hematolojik Kanserlerde FISH Uygulamaları, *Trakya Üniv Tıp Fak Dergisi* **31**, 32-136.

Seliger B., Maeurer M.J. and Ferrone S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today*, **9**, 455-464.

Seliger B., Bock M., Ritz U. and Huber C. (2002). High frequency of a non-functional TAP1/LMP2 promoter polymorphism in human tumors. *International Journal Of Oncology.*, **20**, 349—353.

Sever T. (2010). Kronik Myelositer Lösemide (KML) Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmlerinin Sıklığı ve KML'de Kromozom Düzensizliklerinin(10 ve 22 Nolu Kromozomlar ve Cinsiyet Kromozomları) MLPA Yöntemi İle Araştırılması, *Sağlık Bilimleri Yüksek Lisans Tezi*

Sezer O. (2008). Multipl Miyelom: Güncel Tedavi, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi VIII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, 40-50

Sharova N.P., Zakharova L.A., Astakhova T.M., Karpova Y.D., Melnikova V.I., Dmitrieva S.B., Lyupina Y.V., Erokhov P.A. (2009). New approach to study of T cellular immunity development: parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis. *Cell Immunolog*, **1-2**, 47-5

- Shiina T., Inoko H. & Kulski J.K. (2004). An update of the HLA genomic region, loci information and disease associations: *Tissue Antigens*, **64**, 631–649
- Sukriti S., Pati N.T., Bose S., Hissar S.S., Sarin S.K. (2010). Impaired Antigen Processing and Presentation Machinery is Associated with Immunotolerant State in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Journal Of Clinical Immunology*, **3**, 419-25
- Tu L., Moriya C., Imai T., Ishida H., Tetsutani K., Duan X., Murata S., Tanaka K., Shimokawa C., Hisaeda H., Himeno K. (2009). Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *European Journal Of Immunology*, **39**, 123385-94
- Ulusal Kanser Enstitüsü, [www.siteman.wustl.edu/xmlfiles/Media\\_big](http://www.siteman.wustl.edu/xmlfiles/Media_big) (03.01.2010).
- Vinasco J., Fraile A., Nieto A., Beraun Y., Pareja E., Mataran L., Martín J. (1998). Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **57**, 33–37
- Xu C., Qi S., Gao L., Cu H., Liu M., Yang H., Li K., Cao B. (2007). Genetic polymorphisms of LMP/TAP gene and Hepatitis B Virus infection risk in the Chinese Population. *Journal of Clinical Immunology*, **27**, No.5
- Yakıcıer C. ve Akarsu N.A. (2008). Kanser Epidemiyolojisinde Ailesel Kanserlerin Rolü, (155-160)
- Yakut, T. (2004). HLA Doku Uygunluk Kompleksi, Genetik Lokalizasyonları ve Fonksiyonları. *Güncel Pediatri*, **2**, 53-57
- Yuhki N., Mullikin J.C., Beck T., Stephens R., O'Brien S.J. (2008). Sequences, annotation and single nucleotide polymorphism of the major histocompatibility complex in the domestic cat. *PLoS One*. **7**, 3456-56