



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

**KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİDE (KML) ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİT SENTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞI VE KML'DE
KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİNİN (10-22 NO'LU
KROMOZOMLAR VE CİNSİYET KROMOZOMLARI) MLPA
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Tuğçe SEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN

**Gaziantep
2009**



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

**KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİDE (KML) ENDOTELYAL NİTRİK
OKSİT SENTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞI VE KML'DE
KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİNİN (10-22 NO'LU
KROMOZOMLAR VE CİNSİYET KROMOZOMLARI) MLPA
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Tuğçe SEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN

**Gaziantep
2009**

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİDE (KML) ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT
SENTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞI VE KML'DE KROMOZOM
DÜZENSİZLİKLERİNİN (10-22 NO'LU KROMOZOMLAR VE CİNSİYET
KROMOZOMLARI) MLPA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Tuğçe SEVER

Tez Savunma Tarihi: 22.07.2009
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Cahit BAĞCI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

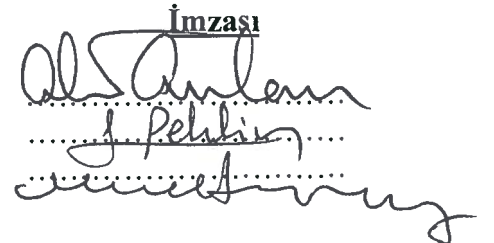


Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Doc. Dr. Sacide PEHLİVAN
Doc. Dr. Mehmet YILMAZ

İmzası


BEYAN

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

22.08.09

Tuğçe SEVER

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. KML (Kronik Myeloid Lösemi) Evreleri.....	2
2.2.1. Kronik evre.....	2
2.2.2. Akselere evre.....	2
2.2.3. Blastik evre ya da blastik kriz.....	2
2.2. Etiyoloji ve Epidemiyoloji.....	2
2.3. Patogenez.....	3
2.4. BCR ve ABL Geninin Yapısı.....	4
2.4.1. ABL geninin yapısı ve proteininin fonksiyonu.....	4
2.4.2 BCR geninin yapısı ve proteini.....	6
2.5. Uyarı İletim Mekanizmaları.....	6
2.5.1 MAP Kinaz Uyarı İletim Yolu.....	6
2.5.2. Ras/Raf/MEK/ERK Uyarı İletim Yolu.....	7
2.5.3. PI-3 kinaz/protein Kinaz B Uyarı İletim Yolu.....	8
2.5.4. JAK/STAT Proteinleri ile Uyarı İletim Yolu.....	9
2.5.5. Myc Yolağı.....	10
2.5.6. Apoptoz Önlenmesi.....	10
2.6. MLPA Yöntemi.....	10
2.7. Taranan Genler.....	12
2.7.1. Anlamsız Transkripsiyon Regülatörü 2 (RENT2).....	13
2.7.2. cAMP Sorumlu Element Modülatörü (CREM).....	14
2.7.3. V-HA-Ras Harvey Rat Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu (Hras).....	14
2.7.4. T- Hücresi Translokasyon Geni 2 (TTG2 veya LMO2).....	15
2.7.5. V-REL Avian Retikuloendotelyosiz Viral Onkogen Homoloğu A (RELA, NFKB3).....	16
2.7.6. Kortaktin (EMS1).....	16
2.7.7. Tümör Nekrosis Faktör Reseptör 7 (TNFRSF7).....	17
2.7.8. Lenfoid Sınırlayıcı Membran Proteini (LRMP).....	17

2.7.9. ELKS/RAB6 ile Etkileşen /CAST Ailesi Üyesi 1 (ERC1).....	18
2.7.10. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (CDKN1B).....	18
2.7.11. Plakofilin 2 (PKP2).....	19
2.7.12. Tip II Kollajen Alfa - 1 (COL2A1)	19
2.7.13. Murine Double Minutes (MDM2).....	20
2.7.14. T-BOX 5 (TBX5).....	21
2.7.15. Meme Kanseri Tip 1 (BRCA1) ve Meme Kanseri Tip 2 (BRCA2).....	22
2.7.16. Retinoblastoma 1 (RB1).....	23
2.7.17. ATP-Bağlayıcı Kaset B Alt Ailesi C 4. Üyesi (ABCC4).....	24
2.7.18. Nükleer Faktör Kappa B (NFKB).....	24
2.7.19. GTP – Bağlı Protein 3 (SPG3A, ATL1)	25
2.7.20. Transformasyon Büyüme Faktörü Beta-3 (TGFB3).....	26
2.7.21. Apoptozis Modülatörü 1 (MOAP1).....	26
2.7.22. E-Kadherin (CDH1).....	27
2.7.23. Avian Sarkoma Virus CT10 (v-crk) Onkogen (CRK).....	27
2.7.24. Eritroblastik Lösemi Viral Onkogen Homoloğu 2 (ERBB2).....	28
2.7.25. Doku Metalloproteinaz İnhibitörü 2 (TIMP2).....	29
2.7.26. N-Kadherin 2 (CDH2)	29
2.7.27. B Hücreli Lenfoma-2 (BCL2).....	30
2.7.28. BCL2 İlişkili X Proteini (BAX).....	31
2.7.29. Serin/Treonin Protein Kinaz 15 (STK15).....	32
2.7.30. Mikrosom Bağlı Şaperon Protein (STCH-60kD).....	32
2.7.31. Makrofaj Göçünü İnhibe Eden Faktör (MIF).....	32
2.7.32. Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF).....	33
2.7.33. Y Kromozomu Üzerinde Ubikinin Transkribe Eden Tetratrikopeptit Tekrar Geni (UTY).....	33
2.8. Nitrik Oksid Sentaz (NOS).....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. DNA İzolasyonu.....	36
3.1.1. DNA İzolasyonunun Aşamaları.....	36
3.1.2. Kandan DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar.....	37
3.2. MLPA Yöntemi ile Analizlerin Yapılması.....	37
3.2.1. Yöntem.....	37
3.2.2. Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	43
4.1. MLPA Analizi.....	43
4.1.2 NOS3 (-894/ VNTR) Gen Polimorfizminin Analizi.....	51

4.1.3 Sonuçların Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması.....	52
5. TARTIŞMA.....	62
6. KAYNAKLAR.....	66
7. ÖZGEÇMİŞ.....	76

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİDE (KML) ENDOTELYAL NİTRİK OKSİT SENTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞI VE KML'DE KROMOZOM DÜZENSİZLİKLERİNİN (10-22 NO'LU KROMOZOMLAR VE CİNSİYET KROMOZOMLARI) MLPA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Tuğçe SEVER

Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN

Temmuz 2009-76 sayfa

Bu çalışmada; Kronik Myelositer Lösemi'deki (KML) kromozomal düzensizliklerin MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) yöntemi ile özellikle onkogen (EMS1, CRK, ERBB2, HRAS vb.), transkripsiyon faktörü (RENT2, NFKBIA, RELA vb.), sinyal iletimi (CDKN1B, SPG3A vb.), sitokin (TNFRSF7 vb.), tümör süpresör (BRCA1, MDM2, BRCA2, RB1) ve apoptozis regülasyonu (MOAP1, BAX, PDCD8 vb.) ile ilgili 34 genin yer aldığı kromozom bölgelerindeki düzensizliklerin araştırılması (BCR-ABL pozitif 48 hasta ve 15 sağlıklı kontrol) amaçlanmıştır. Ayrıca BCR-ABL pozitif 60 hasta ve 60 kontrol ile NOS3 geni -894 ve intron 4 VNTR polimorfizmleri çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem kendi içinde hem de klinik parametrelerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. MLPA analizleri sonucunda; 5 KML hastasının Nükleer Faktör Kappa B (NFKBI) geninde ve 1 KML hastasının T-Hücre Translokasyon Geni 2 (LMO2) geninde duplikasyon saptanmıştır. Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 7 yıllık olaysız sağkalımı etkileyen ve p değeri < 0,010 bulunan yaş, sokal risk sınıflaması, splenomegali, lökositoz (>50000) ve NOS3 gen polimorfizmi çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde parametrelerin tümü anlamını kaybetmiş fakat NOS3 (-894) p= 0,084 olarak değerlendirmeye alınan diğer prognostik parametrelerin içinde anlama en yakın olarak bulunmuştur. Sokal risk sınıflandırması ve ELN kriterlerine göre GT/TT ve GG alel dağılımları arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. NOS3 polimorfizmleri analizinde; Hardy-Weinberg Eşitsizliği (HWE) için kontrol ve KML hasta grubu karşılaştırıldığında KML grubunda HWE'den sapma gözlenirken kontrol grubunda sapmanın olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; bu tez KML'de, 11. ve 14. kromozomda saptanan duplikasyonlar ile NOS3 gen polimorfizmlerinin klinik parametrelerle karşılaştırıldığı ilk çalışma olup NOS3 polimorfizmleri ile KML arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kronik Myelositer Lösemi, MLPA, NOS3 (-894/VNTR), DNA

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE FREQUENCY OF NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML) AND THE MLPA SCANNING OF THE ABNORMALITIES IN 10TH TO 22ND CHROMOSOMES AND GENDER CHROMOSOMES IN CML

Tuğçe Sever

Gaziantep University, Institute of Medical Sciences
Medical Biology Department

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sacide Pehlivan

July 2009-76 Pages

In this study, the aim is to investigate the chromosomal aberrations in Chronic Myeloid Leukemia (CML) in particular, aberrations on chromosome regions of 34 genes related to oncogenes (EMS1, CRK, ERBB2, HRAS etc.), transcription factor (RENT2, NFKBI, RELA etc.), signal transmission (CDKN1B, SPG3A etc.), cytokines (TNFRSF7 etc.), tumor suppressors (BRCA1, MDM2, BRCA2, RB1), and apoptosis regulation (MOAP1, BAX, PDCD8 etc.) using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) method. For this, 48 BCR-ABL positive patients and 15 healthy individuals as control were included. The aberration in 34 genes on different regions of 14 chromosomes were investigated. Moreover 60 BCR-ABL positive patients and 60 individuals as control were used to investigate NOS3 (-894) and NOS3 VNTR gene polymorphisms. Results were analyzed by comparing both among each other and with clinical parameters. Consequently MLPA analyses revealed duplications in Nuclear Factor Kappa B (NFKBI) gene in 5 CML patients and in T-Cell Translocation Gene 2 (LMO2) in 1 CML patient. When age, sokol risk score, splenomegaly, leukocytosis (>50000), and NOS3 gene polymorphism which were all found to affect event-free survival time ($p < 0.010$) in univariate analyses were analyzed in multivariate analyses, all the parameters lost their significance. However, NOS3 (-894) polymorphism was found to be conspicuous among all the other prognostic parameters analyzed ($p = 0.084$) but was not significant. A statistically significant relationship in terms of frequency was observed between GT/TT and GG genotypes in NOS3 (-894) gene according to the sokol risk score and ELN criteria. The control and CML patient groups were compared in the Hardy-Weinberg Equilibrium of NOS3 (-894/VNTR) polymorphism, a deviation from HWE was observed in the patient group but not in the control group. This thesis study is the first study to compare the duplications detected in the 11th and 14th chromosomes in CML and clinical parameters. Nevertheless, NOS3 gene polymorphisms appeared to be significantly related to CML while NFKB duplication was not.

Key Words: Chronic myeloid leukemia, MLPA, NOS3 (-894/VNTR), DNA

TEŞEKKÜR

Çalışmamın belirlenmesinde bana yol gösteren, laboratuvar çalışmalarında destek olan ve tezimin bitmesinde özverisiyle birlikte zamanını, sabrını benimle harcayan sevgili hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN ve klinik parametreler ile sonuçlarımın karşılaştırılmasında yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN'a; başta Prof. Dr. Ahmet Arslan olmak üzere Tıbbi Biyoloji ABD. öğretim üyelerine; tezimin laboratuvar çalışmalarında yanımda olan Can Kılınçarslan'a, tezimin yazım aşamalarında büyük bir özveriyle bana yardımcı olan Dr. Mehmet Kılıç'a, sıcak bir çalışma ortamı ve ekip ruhu ile tez dönemimde desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve yanımda olduklarını daima hissettiren canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım, sonsuz sevgilerimle. Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından TF08.06 proje numarası ile desteklenmiştir.

TABLÖLER LİSTESİ

3.1. Salsa MLPA P253 (LN:0407) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.....	41
3.2. Salsa MLPA P005 (LN:0308) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.....	41
4.1. Duplikasyonu olan KML hastalarının klinik özellikleri	46
4.2. KML tanısı konmuş Ph (+) olan 60 hasta ile 60 sağlıklı kontrol grubuna ait DNA'lar ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) koşulları.....	51
4.3. Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemili Hastaların Tanıda Klinik Özellikleri.....	53
4.4. Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemili Hastalarda Prognostik Faktörler ile NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR Gen Polimorfizminin Sağkalım Üzerine Etkisi.....	54
4.5. Kronik faz KML Hastalarında Çok değişkenli analiz (Cox proportional hazard model backward).....	56
4.6. KML hasta ve kontrol grubu arasındaki NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR gen polimorfizmleri sıklığı.....	57
4.7. NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR gen polimorfizmleri ile klinik parametrelerin karşılaştırılması.....	59
4.8. Duplikasyon (+) ve (-) olan hastaların klinik parametrelerle karşılaştırılması.....	60
4.9. KML'de prognozu belirlemede kullanılan risk skoru	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

2.1. Filadelfiya kromozomu; t (9;22) (q34;q11)	4
2.2. BCR-ABL otofosforilasyonla hücre proliferasyonu, matürasyonu, apoptoz ve adehyonu ...	4
2.3. ABL protein yapısı	5
2.4. BCR protein yapısı.....	6
2.5. Taranan genlerin kromozomlar üzerinde yerleşimleri.....	13
3.1. Denatürasyon ile ayrılan DNA çift ipliği.....	39
3.2. ABI 9700 thermal cycler cihazının görünümü.....	39
3.3. MLPA Reaksiyonları.....	40
4.1. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın DNA'sı	43
4.2. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş 100 ng sağlıklı erkek insan DNA'sı.	44
4.3. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın insan DNA'sı ..	44
4.4. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı erkek insan DNA'sı	45
4.5. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş H14 kodlu hastaya ait DNA.	46
4.6. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H1 kodlu hastaya ait DNA.	47
4.7. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H2 kodlu hastaya ait DNA	48
4.8. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H3 kodlu hastaya ait DNA	48
4.9. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H23 kodlu hastaya ait DNA.	49
4.10. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H33 kodlu hastaya ait DNA	49
4.11. P005 kiti (LN:0308) ile çalışılmış olan hasta ve kontrol DNA'ları.....	50
4.12. P253 kiti (LN:0407) ile çalışılmış olan hasta ve kontrol DNA'ları.....	51
4.13. NOS3 (-894) gen polimorfizmlerine ait jel görüntüsü.....	52
4.14. NOS3 (VNTR) gen polimorfizmlerine ait jel görüntüsü.....	52
4.15. İmatinib kullanım süresi ile sağkalım olasılığı arasındaki ilişki.....	55
4.16. İmatinib kullanım süresi ile sağkalım olasılığı arasındaki ilişki.....	57

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
mtDNA	Mitokondrial DNA
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
KML	Kronik Myelositer Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KF-KML	Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemi
ABL	Akut Bazofilik Lösemi
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
AMM	Myelofibrozis
ET	Esansiyel Trombositemi
cdck	Siklin Bağımlı Kinazlar
ICSBP	Interferon Consensus Sequence Binding Protein
Ph (+)	Philedelphia Kromozomu (BCR-ABL) Pozitif
JAKs	Janus Ailesi Kinazları
Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
bç	Baz Çifti
nt	Nükleotid
kb	Kilobaz
kd	Kilodalton
ml	Mililitre
cm	Santimetre
gr	Gram
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
rpm	Dakikada Çevresel Tur Sayısı (Round per Minute)
STR	Kısa DNA Tekrarı
NOS	Nitrik Oksit Sentaz

AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
MAPH	Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation
t()	Translokasyon
ABL	Abelson
BCR	Breakpoint Cluster Region, Kırılma Noktası Bölgesi
M-bcr	Major Breakpoint Cluster Region
GTP	Guanozin trifosfat
GTPase	Guanozin trifosfataz
GDP	Guanozin difosfat
VNTR	Değişken Sayıda DNA Tekrarları
SSPE	Subacute Sclerosing Panencephalitis
MDR	Multi Drug Direnci
UV	Ultraviyole
ER	Endoplazmik Retikulum
NK	Doğal Öldürücü
LAK	Lenfokinle Aktive Edilmiş Öldürücü Hücreler
Mm	Mismatch = Yanlış Eşleşme
Del	Delesyon
Dup	Duplikasyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
WBC	Beyaz Kan Hücreleri
TE	Tris EDTA
U	Ünite
CI	Confidence Interval
OR	Odds Oranı
LN	Lot Numarası
Myc	Myelositomatozis Onkogeni
MSY	Majör Sitogenetik Yanıt
NFKB	Nükleer Faktör Kappa Beta
ELN	European Leukaemia Net

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myelositer lösemi (KML) anormal hematopoetik kök hücreden kaynaklanıp miyeloid, eritroid, monositer, megakaryositer serileri etkileyen klonal myeloproliferatif bir hastalıktır (1). Kemik iliğinde myeloid serinin aşırı çoğalımı, periferik kanda olgun myeloid serinin artışına bağlı lökositoz ve splenomegali ile karakterizedir (1). Karakteristik olarak KML bifazik veya trifazik olup çoğu hasta kronik fazda başvurmaktadır (2). Bu faz 3-6 yıl sürmekte ve hastalık doğal seyri sonucunda daha ilerlemiş fazlar olan akselere veya blastik faza geçmektedir. KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. Diğer myeloproliferatif hastalıklar polisitemia vera, myelofibrozis ve esansiyel trombositemi'dir (2). KML hastalarında Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) yöntemi ile; RENT2, CREM, HRAS, LMO2, RELA, EMS1, TNFRSF7, LRMP, BRCA2, RB1, ABCC4, CDH1, CRK, ERBB2, BRCA1, TIMP2, CDH2, BCL2, BAX, STK15/STK6, STCH, MIF, PDCD8, UTY, ERC1, CDKN1B, PKP2, COL2A1, MDM2, TBX5, NFKBIA, SPG3A, TGFB3, MOAP1 olmak üzere 34 genin bulundukları kromozom bölgelerindeki (10-22 nolu kromozomlar ve Cinsiyet Kromozomları) düzensizlikler araştırıldı.

Nitrik oksit (NO), 1979'da siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak tanımlanmıştır. NO, hücre içi ve hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Birçok hücreyel işlem; endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmekte ve birçok dokuda sentezlenmektedir. NOS'un nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenbilir (iNOS veya NOS-2), endotelyal (eNOS veya NOS-3) olmak üzere 3 farklı formu vardır (3,4). Literatürde NOS3 gen polimorfizmleri ve prostat kanseri, göğüs kanseri, kolarektal kanseri, over sendromu, beyin tümörleri ile yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bu bilgilerden yola çıkarak MLPA yöntemi ile yaptığımız analizler sonucunda Nükleer Faktör Kappa B geninde oluşan dublikasyonların NOS3 gen polimorfizmleri ile bir ilişkisi olup olmadığının araştırıldı ve KML hasta grubu ile kontrol grubunda elde edilen veriler klinik parametrelerle karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KML (Kronik Myeloid Lösemi) Evreleri

KML; klinikopatolojik seyri; kronik faz, hızla ilerleyen (akselere) faz ve blastik faz olarak adlandırılır. Kan ve kemik iliğindeki olgunlaşmamış (blast) lösemi hücre sayısı ve belirtilerin ciddiyetine dayanarak hastalığın evresi belirlenir (5,6).

2.1.1. Kronik evre

Kan ve kemik iliğinde blast hücre sayısı %5'ten azdır (5). Herhangi bir belirti bulunmayabilir veya hafif belirtiler görülebilir. KML hastalarının çoğu birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilen bu evrede tanı alır (5).

2.1.2. Akselere evre

Hastalar er veya geç lösemi hücrelerinin daha hızlı arttığı ve daha tehlikeli bir evre olan akselere evreye geçerler. Blast sayısı yaklaşık %15'e yükselir (5). Bu evre haftalar veya aylar sürebilir. Akselere evrede ateş (enfeksiyon olmaksızın), kemik ağrısı ve dalak büyümesi meydana gelir (5).

2.1.3. Blastik evre ya da blastik kriz

Genellikle 5 yıl içinde, olgunlaşmamış akyuvar (lösemi hücresi) sayısının çok fazla olduğu "blastik kriz" ortaya çıkar (6). 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 almıştır (6).

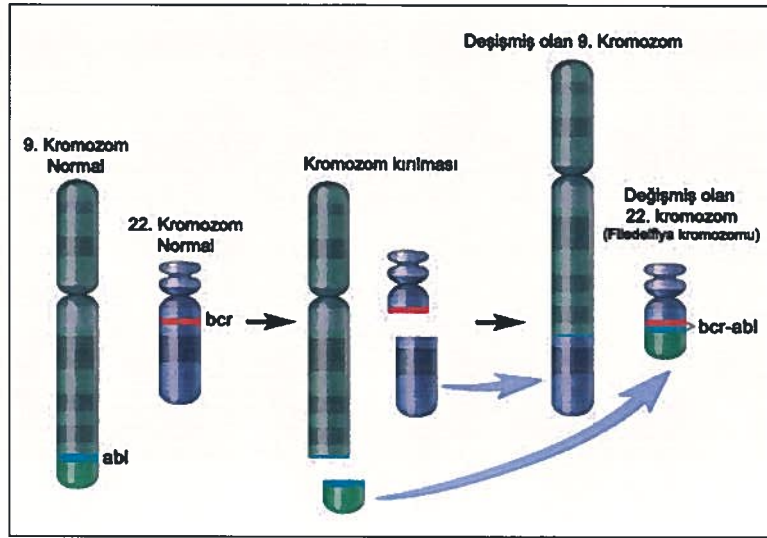
2.2. Etiyoloji ve Epidemiyoloji

KML'nin kesin etiyolojisi bilinmemektedir. İyonize radyasyonu takip eden 4-11 yılda KML insidansında artış gözlenir. Gelişiminde kimyasal ajanlar ve enfeksiyonun rolü gösterilememiş ve genetik geçiş de tespit edilmemiştir. KML, tüm lösemilerin %20 kadarını oluşturur, yıllık yakalanma olasılığı toplumlarda 100.000 de 1-2 vaka şeklinde gerçekleşir (2). Erkeklerde daha sıktır ve ortalama görülme yaşı 45-55 yaşları olarak

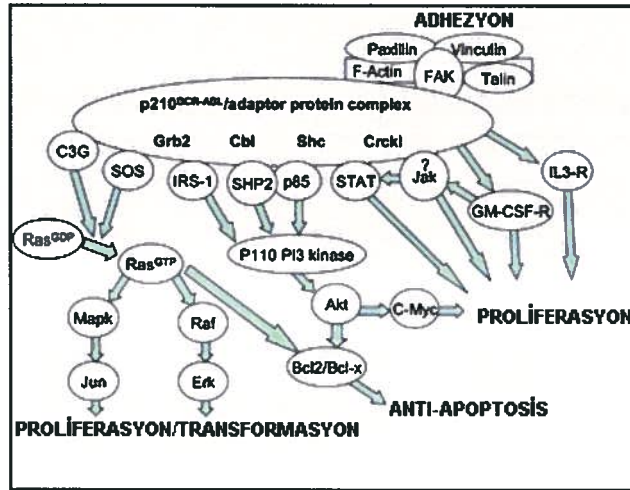
saptanmıştır. KML insidansı yaşla artış gösterir ve hastaların %30'u 60 yaş üstündedir. KML vakaların %3'ü çocukluk çağında görülür (2).

2.3. Patogenez

Nowell ve Hungerford, 1960 yılında, KML hastalarında G-grubu kromozom anormalliğini tanımlamışlardır (7). Bu yeni belirleyici keşfedildiği şehrin onuruna Filadelfiya (Ph) olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda kromozom bandlama yöntemi ile Ph kromozomunun 9 ve 22. kromozom arasında translokasyon ve 1980 yılında kromozom 9'da Abl protoonkogenin 22. kromozomdaki BCR geni yakınına resiprokal translokasyonu gösterilmiştir (Şekil 2.1) (10). Bu genetik değişiklik 210-kd moleküler ağırlıkta (p210) Bcr-Abl füzyon proteini olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Son zamanlarda ek Bcr-Abl kırılma noktaları tanımlanmıştır (8). Bunlar p190 ve p230' dur. Bu proteinler otofosforilasyon ile hücre çoğalımı, olgunlaşması, ölüm ve yapışma uyarı ileti yollarını işlevselleştirerek kötü huylu hücre transformasyonuna yol açar (Şekil 2.2) (11). 22q11'de lokalize BCR geni ile normalde 9q34 üzerinde bulunan ABL geninin kaynaşımı moleküler PCR teknikleri ve fluorescent in situ hybridising (FISH) ile sitogenetik analizden daha hassas bir şekilde tesbit edilir (2). Bu metodların geliştirilmesi düşük tümör yükü ya da sitogenetik olarak Ph negatif vakaların da teşhisine olanak sağlamıştır (2). Ph kromozomu yalnız myeloid hücrelerde değil, megakaryositik ve eritroid seri hücrelerinde, ayrıca vakaların bir kısmında B lenfositlerinde de bulunur. Hatta bazı vakalarda T lenfositlerinin küçük bir bölümünde Ph pozitifdir. Bu bulgular KML'deki neoplastik transformasyonun pluripotent hemotopietik kök hücre düzeyinde olduğunu gösterir (9). KML'nin pluripotent orjinine rağmen, kemik iliğinde yalnızca miyeloid, monositik ve megakaryositik diziler artmış olup bu seçici genişlemenin nedeni bilinmemektedir (9).



Şekil 2.1. Filadelfiya kromozomu; t (9;22) (q34;q11) (10).



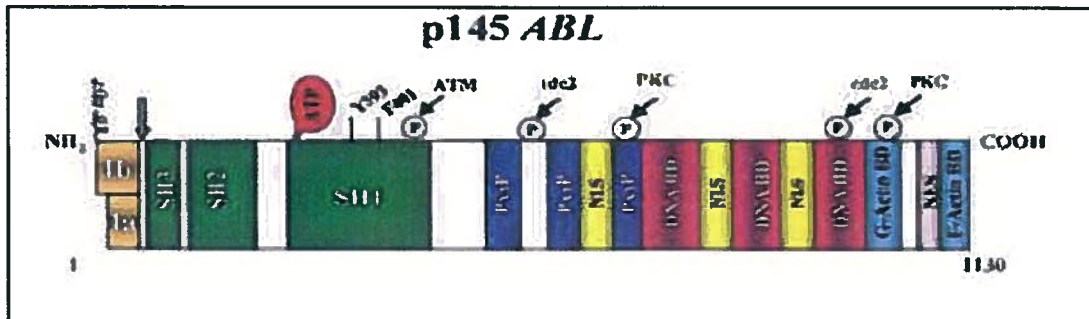
Şekil 2.2. BCR-ABL otofosforilasyonla hücre çoğalımı, olgunlaşması, ölüm ve yapışma uyarı-ileti yollarlarını işlevselleştirerek kötü huylu hücre proliferasyonuna yol açar (11).

2.4. BCR ve ABL Geninin Yapısı

2.4.1. ABL geninin yapısı ve proteininin fonksiyonu

ABL geninin ekspresyonu sonucu moleküler kütlesi 145-kd ve 9q34'de yerleşik olan, 11 ekzona sahip ve 230 kilobaz uzunluğunda ABL proteini oluşur. ABL proteinleri nonreseptör tirozin kinazlar olup sinyal iletimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptirler (12). ABL genindeki kırılma noktası genellikle ekzon 2'nin 5' (sentromere doğru) ucunu içermektedir. ABL ekzon 2 ve 11 (a2-a11) BCR geninin

ekzon 2 ve 16 (b1-b5) arasındaki kırılma bölgesine (major breakpoint cluster region; M-bcr) yerleşir (12). Sonuçta, gerçekleşen gen füzyonu ile BCR-ABL kimerik geni ve bu genin kodladığı kimerik proteinler olan p190/BCR-ABL, p210/BCR-ABL, p230/BCR-ABL proteinleri (190, 210 ve 230 kd) oluşur (12). BCR-ABL füzyon geni tarafından kontrol edilen kötü huylu transformasyon mekanizmaları, ABL tirozin kinaz aktivitesinin kontrolünde; BCR/ABL pozitif hücrelerin biyolojik özellikleri ve aktif sinyal ileti yollarında; bozulmuş adhezyon özelliklerinde; mitoz sinyal ileti yollarının aktivasyonunda Ras ve MAP Kinaz yolları, JAK/STAT yolağı, PI-3 Kinaz yolağı ve Myc yolağı gibi; Apoptozun engellenmesinde ve ABL Gen aktivitesini engelleyen proteinlerin parçalanmasında rol oynamaktadır (13). ABL'ın tirozin kinaz işlevini düzenleyen, ABL'ın N-uç kısmı üç SRC homoloji bölgelerine (SH1, SH2 ve SH3) sahiptir. Bu bölgeler içinde SH1 bölgesi oldukça önemli olup tirozin kinaz aktivitesi gösterir. SH2 işlevinin tamamının eksikliğinde fosfotirozin bağlanmasında azalma ve ABL'ın transforme kapasitesinde düşüş görülür. SH3, tirozin kinaz fonksiyonu üzerinde negatif düzenleyici etkiye sahiptir (12,13). Normal ABL proteini hücre siklusunun düzenlenmesine, genotoksik strese karşı hücrel cevaba ve integrin sinyalizasyonu aracılığıyla hücrel çevre hakkında bilgi iletilmesine karışır. ABL proteini hücrel ölçü birimi gibi karmaşık rol sağlayarak çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan sinyalleri bir bütün olarak toplar ve hücre siklusu ve apoptozise gelince kararları etkiler (12). Hücre siklusunun G1 fazında yer alan hücrelerdeki c-ABL (cellular-hücrel ABL)'ın nükleer havuzunun bir kısmı Retinoblastoma (Rb) proteini ile karmaşık haldedir (12).



Şekil 2.3. ABL protein yapısı (14)

2.4.2 BCR geninin yapısı ve proteini

BCR geninin ürünü olan ve her yerde ekspresyonu yapılan 160-kd ağırlığındaki proteinde birkaç yapısal motif betimlenmiştir (15). İlk N-terminal ekzon serin-treonin kinazı kodlar. Sadece bu kinazın substratları proteinlerin 14-3-3 ailesinin üyesi olan Bap-1 ve belki BCR'ın kendisidir. BCR'ın N-terminal bölgesinde 'coiled-coil' bölgesi in vivo ortamda dimerizasyona (Dimerizasyon Bölgesi) olarak sağlar. Molekülün merkezi dbl benzeri ve pleckstrin-homoloji (PH) bölgelerini içerir. PH bölgesi, Rho guanidin exchange faktörleri üzerindeki guanidin trifosfat (GTP)'ın guanidin difosfat (GDP)'e dönüşümünü uyarır (15). Rho guanidin exchange faktörleri NFkB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayabilir. PH bölgesinden sonra kalsiyum bağımlı lipid bağlanma bölgesi (CaLB) yer alır. C-terminal bölgesi Rac için GTPase aktivitesine sahiptir ve Rac guanozin trifosfat-aktivatör protein (Rac-GAP) bölgesi olarak geçer. Ras süper ailesinin küçük GTPase'ı aktin polimerizasyonunu ve fagositik hücrelerde NADPH oksidase aktivitesinin düzenleyicisidir. BCR birkaç tirozin rezidüsü üzerinden özellikle tirozin 177 (Y177) üzerinden fosforlanabilir (15). Y177, Ras yolağının aktivasyonuna karışan önemli adaptör molekül olan growth factor receptor-bound protein 2 (Grb- 2)'e bağlanır. ABL'ın COS1 hücrelerinde BCR'ı fosforile ettiği bunun sonucunda BCR kinaz aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir(15).



Şekil 2.4. BCR protein yapısı (14)

2.5. Uyarı İletim Mekanizmaları

2.5.1 MAP Kinaz Uyarı İletim Yolu

MAP kinazlar, "Mitogen-activated protein kinases" süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre zarlarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır (16). Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis işlevlerinin

düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır (16). MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem uyarı artışında hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır (17). Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik ara ürünlerini (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (17).

2.5.2. Ras/Raf/MEK/ERK Uyarı İletim Yolu

Hormonlar, büyüme faktörleri ve farklılaşma faktörleri bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler (17). Ras ve Raf protoonkogendir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translayon sonrası modifikasyondan (farnezilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif yapıya dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek yatkınlıkla bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (17,18). Raf kinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar Faz I-II aşamalarında sürmektedir (18). BCR/ABL'in substratları olan diğer iki adaptör molekül Shc ve Crkl de Ras'ı aktive edebilir. Bu substratlar SH2 (Shc) ve SH3 (Crkl) bölgeleri ile BCR-ABL'a bağlanırlar. Ras'ın aktivasyonu Ph kromozomu pozitif lösemilerin patogeneğinde önemlidir (19). İnterlökin-3 gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması Ras'ın aktivasyonuna neden olur ve aktif Ras proteini serin-threonin kinaz Raf'a bağlanır ve Raf proteini hücre membranında toplanır (19). Burada serin-treonin aminoasitlerinden fosforillenen Raf proteini aktif hale geçer. Raf, gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olan Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden sinyal yolağını başlatır. Bundan başka

Jnk/Sapk yolağının BCR-ABL tarafından aktivasyonu üzerinde çalışılmış ve malign transformasyon için gerekli olduğu görülmüştür. Böylece Ras üzerinden gelen uyarı GTP-GDP değişim faktörü Rac tarafından Gckr (germinal center kinase related)' e iletilir ve buradan da Jnk/Sapk yolağı aktive edilir (19). MAP kinaz yolağının üçüncü kolu p38'in BCR-ABL transforme hücreler ve diğer mitojenik potansiyeli olan yollarlarda aktif olduğuna dair kanıtlar vardır (19).

2.5.3. PI-3 kinaz/protein Kinaz B Uyarı İletim Yolu

Fosfoinozotid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (20). Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (21). Protein kinaz B, Akt1 ve Akt2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral v-akt onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır (21). Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu engelleyerek negatif düzenleyici rol oynar. Protein kinaz B uyarısı hücre içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan biri, “mammalian target of rapamycin (mTOR)” proteindir (22). Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir. Protein kinaz B aktivasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkileri de karsinogenez sürecinde önem taşır. p21 proteini hücre döngüsünün erken G1 fazında siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) kompleksi üzerinde pozitif uyarıcı etki yapmaktadır. Protein kinaz B, p21'in stabil formunun oluşumunu tetikler ve hücre döngüsünün ilerlemesine uyarıcı yönde etki eder. Buna ek olarak, p21'in degradasyonunu uyaran proteini de inhibe etmektedir (22). Hücre döngüsünün inhibitör proteinlerinden p27'nin siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksine bağlanması için, sitoplazmadan hücre çekirdeğine yer değiştirmesi gerekir (22). Onkogenik uyarı halinde (PTEN mutasyonu, HER2 veya EGFR aktivasyonu) bu protein fosforilasyona uğrar. Bunun sonucunda, p27 sitoplazmaya geri döner ve hücre döngüsündeki inhibitör etkisi ortadan kalkar. Bu çalışmalar, sürekli ve/veya kontrolsüz protein kinaz B uyarısı ile tümör hücrelerinin çoğalması arasındaki doğrudan ilişkiyi göstermektedir (22). Protein

kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücresel işlevlerden biri de apoptozistir. PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFKB uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir (22).

2.5.4. JAK/STAT Proteinleri ile Uyarı İletim Yolu

“Signal transducer and activator of transcription (STAT)” proteinleri 1990’lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlandı. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde yedi STAT proteini tanımlanmıştır (23). Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır. Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır (α alt birim). Daha sonra $\alpha\alpha$ ya da $\alpha\beta$ oligomerizasyonu gerçekleşir (23). Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder. Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile ederler. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar. STAT proteinlerin daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar. STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogenezde etkili olur. Bunlardan biri STAT’ın sürekli aktivasyonudur (23).

Diğer değişim ise proteinin c-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilir (22). IL-6 ile devamlı STAT3 aktivasyonu uyarılan multipl miyeloma hücrelerinde antiapoptotik proteinlerden BCL-xL ve Mcl-1’in arttığı gösterilmiştir. STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; c-myc, siklin D1 ve BCL-xL) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozisi önleyerek karsinogenez sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir (22). Ayrıca, STAT aracılı uyarı iletiminin kötü huylu sürecin gelişiminde MAP kinaz yolunun aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir. Devamlı aktif STAT3 proteini ile hastalıksız sağkalım süresi arasındaki ters ilişki anlamlı bulunmuştur. BCR-ABL kimerik proteini hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu tetikler. Bu onkoprotein JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar. İmatinib mesilat ile

tetiklenen apoptozis STAT5 aktivitesinin inhibisyonu ve BCL-xL ekspresyonunun azalması ile ilişki göstermiştir (22).

2.5.5. Myc Yolağı

Birçok insan malignitesinde myc onkoproteininin aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Myc'in transkripsiyon faktörü gibi etki yaptığı düşünülmekte ancak hedef genleri geniş çapta tam olarak bilinmemektedir (24). Myc'in işlevsel hale gelmesi BCR-ABL'nin SH2 bölgesine bağlanmasıyla sağlanır. V-ABL-transforme hücrelerde elde edilen sonuçlar göstermiştir ki sinyal Ras/Raf, siklin bağımlı kinazlar (cdck) ve E2F transkripsiyon faktörü üzerinden Myc promotorunu aktive etmektedir (24).

2.5.6. Apoptoz Önlenmesi

Ph kromozomu pozitif hücre serileriyle yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin DNA hasarı tarafından indüklenen apoptozise karşı dirençli oldukları gözlemlenmiş, ancak altında yatan mekanizmalar tam anlamıyla anlaşılamamıştır (24). Önemli görüşlerden biri BCR-ABL'nin kaspazları aktive ederek mitokondriden sitokrom c salınımı engellemesidir. Kaskad şeklinde gerçekleşen kaspaz aktivasyonuna BCL-2 ailesi üyelerinin aracılık ettikleri düşünülmektedir. Baf3 hücre serisinde BCR-ABL'nin Ras yolağı üzerinden BCL-2 proteinini arttırdığı yine 32D hücrelerinde de BCR-ABL'nin PI-3 kinaz yolağı üzerinden BCL-2 proteinini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca Ph kromozomu pozitif hücrelerde STAT5'in aktivasyonu ile antiapoptotik bir protein olan BCL-xL'nin transkripsiyonel olarak aktif hale geçtiği belirlenmiştir. Diğer bir görüş ise, proapoptotik bir protein olan Bad'in fosforilasyonudur. Bad'in iki serin aminoasidinden Akt, Raf ve Ras proteinleri tarafından fosforile edildiği, ayrıca interferon uyuşum dizisi bağlanma protein (ICSBP)'in regülasyonunu değiştirerek apoptozisi inhibe ettiği düşünülmektedir (24).

2.6. MLPA Yöntemi

2002 yılında J. Shouten ve arkadaşları MLPA yöntemini tanımlamışlardır. Yalnızca 20 ng insan DNA'sı kullanarak 40 farklı DNA dizisinin çalışılabilirdiği bu yöntem ile ekzon delesyonları ve duplikasyonları, trizomiler, hücre hatlarındaki ve tümör örneklerindeki kromozomal düzensizliklerin karakterize edilmesi, Tek Nükleotid Polimorfimleri (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) ve mutasyon tespiti gerçekleştirilebilmektedir.

MLPA yönteminde örnek nükleik asitleri değil, örneğe bağlanan probler amplifiye edilir ve ölçülür (25). Probların, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR = Polymerase Chain Reaction) ile amplifiye olması probun hedef dizisinin örnekte bulunmasına dayalıdır. Her prob, bir tanesi sentetik diğeri M13'den türemiş, hedef dizinin bitişik bölgesine hibridize olan iki oligonükleotid içermektedir. Bu hibridize olan prob oligonükleotidleri, alt dizilerin amplifikasyonuna engel olmayacak şekilde yapışır (ligate edilir) (25). Yapışan tüm probler yalnızca bir primer çiftini kullanarak normal amplifikasyonun gerçekleşmesine müsaade edecek belirli bir sonlanma dizisine sahiptir. Her prob 130 baz çifti (bç) ve 480 bç arasında oranlara sahip amplifikasyon ürününe göre özgün pik verir ve analiz edilir. Prob hedef dizileri küçüktür (50-70 nt=nükleotid). Ligasyon reaksiyonunun uygulanmış olması, tek nükleotid farklılıklarının ayırt edilmesinde avantaj sağlamaktadır (25).

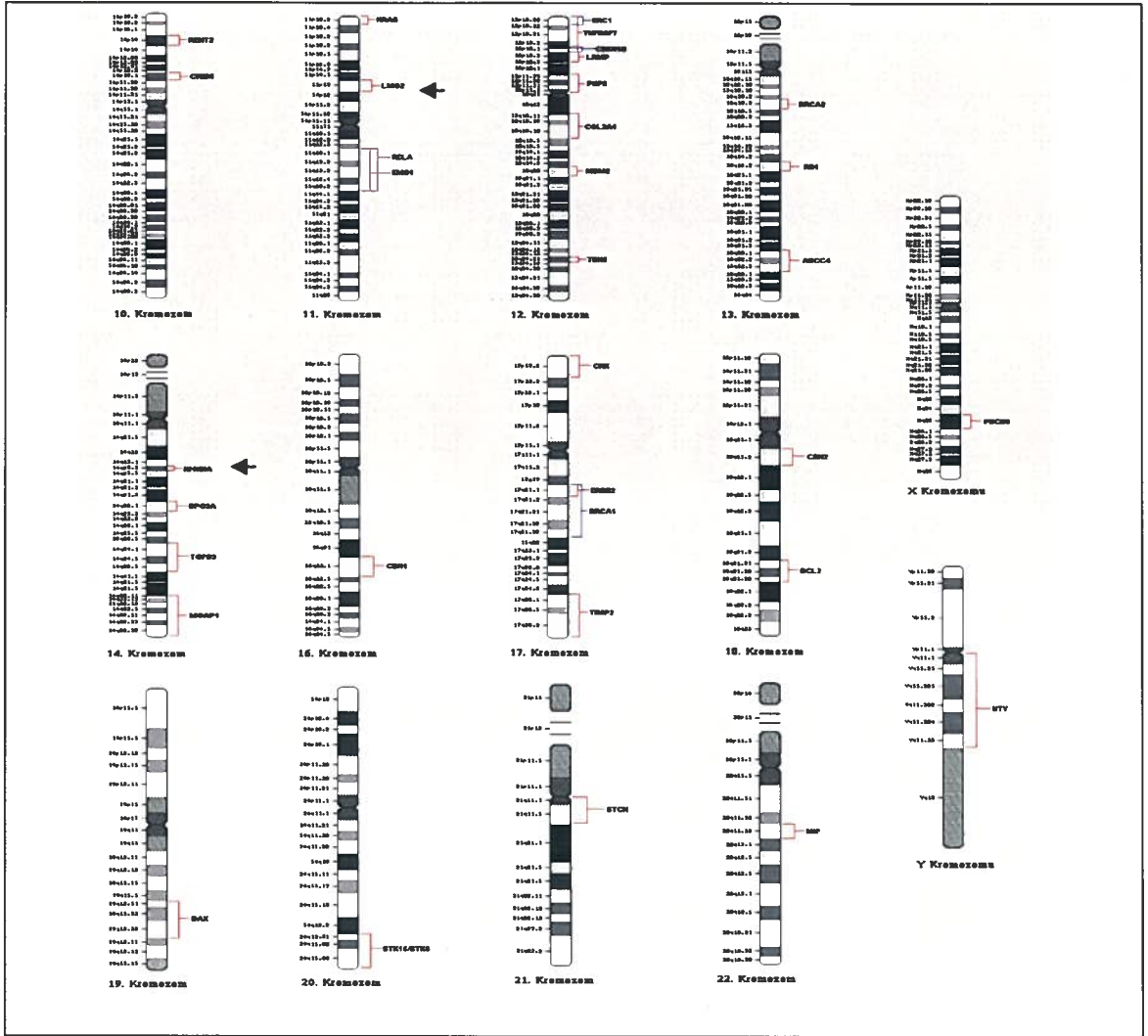
Kromozomlarda bulunan özgül kromozom dizi tekrarları (Short Tandem Repeat) kopya sayıları farklılıkları ile insan hastalık ve sendromları araştırılabilmektedir. Amplified Frangment Length Polimorfizm (AFLP) ve farklılaşmış mRNA görüntüleme (differential mRNA display) gibi nükleik asit parmak izi olarak tanımlanan bu kopya sayıları farklılığını kullanan teknikler, tüm parçaların amplifikasyonunda yalnız bir primer seti kullanılmasıyla bir reaksiyonda DNA parçalarının amplifiye olmasında PCR'ın kullanılabileceğini göstermişlerdir. AFLP yöntemi, 50'den fazla rastgele dizinin kopya sayılarının tek bir reaksiyonda tespiti için kullanılabilir. Multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH) yöntemi de benzer bir yöntem olmasına karşın rastgele değil de 40 farklı hedef diziye özgül tespit ve ölçüm imkânı sağlamaktadır. MAPH yönteminde örnek nükleik asitlerinin amplifiye olmasından farklı olarak eklenen oligonükleotid probler amplifiye olur. Örnek nükleik asitlerin immobilizasyonu ve fazla problemlerin çıkarılması MLPA'da önemli değildir (26). Her MLPA probu bir kısa sentetik oligonükleotid ve bir M13 fajından türetilmiş uzun oligonükleotid probu içermektedir (27). Problemlerdeki kısa sentetik oligonükleotid, 3' ucunda hedefe özgü bir dizi (21-30 nükleotid) ve 5' ucunda işaretlenmiş PCR primerine özdeş 19 nükleotidlik genel bir dizi ihtiva eder (27). Uzun olan MLPA probunun hazırlanması için, 25-43 nükleotidlik hedefe özgü oligonükleotid, bir M13 türevi SALSA vektörüne klonlanır. Elde edilen klonlar, Escherichia coli straini (ırkı) olan TG1 kültürüne alınır. Tek iplikli DNA, faj parçalarını polyethyleneglycol ile çökelterek, virüsü ısı ile bozulup ve DNA'yı cetyl-trimethyl-ammonium bromide ile çökelterek saflaştırılır. Tek iplikli DNA, EcoRV ve BsmI 'de bu iki kısa oligonükleotidin birleşmesi (annealing) sayesinde

kısmi olarak çift iplikli yapılır. EcoRV ve BsmI kesimi ile 7200 nükleotidlik M13 parçası ve MLPA prob oligonükleotidi (80-420 nükleotid) oluşur. Bu oligonükleotid prob, 5' fosforile ucunda 25-43 nükleotidlik hedefe özgü bölge dizisini, işaretlenmemiş PCR primerinin tamamlayıcısı olan 36 nükleotidlik diziye ve değişen uzunluklarda olan stuffer dizisini içerir. Kullanmadan önce 7200 nükleotidlik M13 parçasını ayırmak çok zor değildir. Tüm hedef diziye özgü problemlerin erime (melting) sıcaklığı 100 mM NaCl 'de 65 °C'nin üzerindedir. Hibridize prob kısımlarının tasarlanmasında geçerli veritabanları kullanılır (27).

MLPA yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve yayınlanmış, pubmed (25) veritabanına kayıtlı 386 makale ve 21 derleme bulunmaktadır. Bunlardan 125 tanesi çeşitli kanser vakaları ile ilişkili olarak yapılan çalışmalardır. Bu vakalar göğüs ve yumurtalık kanseri, kolorektal kanser, duodenum kanseri ve lenfotik lösemi şeklindedir (28,29). KML ile ilişkili olarak MLPA yöntemi ile yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

2.7. Taranan Genler

KML hastalarında MLPA yöntemi ile; RENT2, CREM, HRAS, LMO2, RELA, EMS1, TNFRSF7, LRMP, BRCA2, RB1, ABCC4, CDH1, CRK, ERBB2, BRCA1, TIMP2, CDH2, BCL2, BAX, STK15/STK6, STCH, MIF, PDCD8, UTY, ERC1, CDKN1B, PKP2, COL2A1, MDM2, TBX5, NFKBIA, SPG3A, TGFB3, MOAP1 olmak üzere 34 genin bulundukları kromozom bölgelerindeki (10-22 nolu kromozomlar ve Cinsiyet Kromozomları) düzensizliklerin araştırılması planlanmıştır (Şekil 2.5) (30).



Şekil 2.5. Taranan genlerin kromozomlar üzerinde yerleşimleri (30).

►Duplikasyon saptanan genler.

2.7.1. Anlamsız Transkripsiyon Regülatörü 2 (RENT2)

Bira mayası UPF2 homoloğu olarak da isimlendirilen bu gen insan 10. kromozomunun p kolunda yer alır (10p15-p13) (31). Northern Blot analizi ile HeLa hücrelerinde UPF2 'nin 5,4 kb'lık transkripsiyon ürününün ekspresyonu gözlenmiştir (31). Maya UPF2 ve UPF3 genlerinin homologları için dizi verisi araştırılırken RT-PCR ile UPF2, UPF3a ve UPF3b olarak adlandırılan bu üç proteini kodlayan komplementer DNA izole edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda UPF2, UPF3a ve UPF3b'nin UPF1 ile kompleks olduğu ve UPF2'nin bazı bölgelerinin nükleer hedef aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. Bu protein perinükleer alanda lokalize olmaktadır. RENT2, mRNA denetiminde gerekli kesim sonrası çoklu protein kompleksinin parçası olan bir protein

içerir. Öncül durdurucu kodonları içeren mRNA' ların NMD (nonsense-mediated decay) tarafından indirgenmesini tetikler (32, 33).

2.7.2. cAMP Sorumlu Element Modülatörü (CREM)

CREM geni insan 10. kromozomunun p kolunda yer almakta (10p12.1-p11.2) ve 345 amino asit (aa) içermektedir (34). Nukleusta yer alan CREM geni ürünü transkripsiyon düzenleyicisidir. CREM geni farklılaşmış kesim ile cAMP katkılı transkripsiyonun hem antagonistlerini (hasım, muhalif) hemde aktivatörlerini kodlayan çoklu ekzogenik bir genidir. Antagonistik fonksiyonlu kesim çeşitleri, glutamine zengin iki bölgeden yoksundur ve cAMP katkılı transkripsiyonu engeller (35). Transkripsiyonel aktivatör olan CREM geni mayoz sonrası hücrelerde fazla eksprese olur ve spermatozoonun yapılanmasında içeren çeşitli haploid germ hücresi özgü genlerin aktivasyonundan sorumlu da olabilir (35).

2.7.3. V-HA-Ras Harvey Rat Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu (Hras)

Onkogen Hras insan 11. kromozomunun p kolunda yer alır (11p15.5) ve RAS gen ailesine aittir (34). Ras ailesi, H-ras, K-ras ve N-ras' tan oluşur. Kanser gelişiminde, Ras geni nokta mutasyonları rol oynar (36). Embriyogeneizde, yara iyileşmesinde ve mitozun artmış olduğu durumlarda da genin ekspresyonu görülür. Ras proteinleri; membranda bulunan Guanozin trifosfataz (GTPase) aktivitesine sahiptir, hücre membranından nükleusa sinyal transdüksiyonunda ve hücre büyümesinde rol oynar. Ras proteininin normal hücredeki görevi, uyarıcı sinyallerin olduğu durumlarda Guanozin trifosfat (GTP)'a bağlanıp aktif hale geçerek uyarıcı sinyalleri nükleusa iletmektir (36). Bu sınırlı sinyal iletimi sona erdiğinde de GTP molekülünün GTPase enzimi aracılığıyla hidrolize olması sonucu Guanozin difosfat (GDP) proteinine bağlı inaktif formunu oluşturup, istirahat fazına dönmesini sağlamak ve bir sonraki uyarıyı beklemektir. Mutant Ras proteini GTPase aktivitesini inhibe ettiğinden, gen ürünleri kontrolsüz olarak üretilir. Ras'ın onkogenik özellik kazanması nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olur. En sık K-ras mutasyonu görülür. H-ras mutasyonu daha seyrek ve N-ras mutasyonu ise çok nadirdir (36). Mutasyonların ve amplifikasyonun nadiren gözlenmesi ras gen aktivasyonunun diğer mutasyon mekanizmaları tarafından

etkilendiğini gösterir. Meme kanserlerinde ras onkogenlerinde en sık rastlanan mutasyon aşırı ekspresyondur (37). H-ras'ın artmış ekspresyonu lenf nodu metastazlarında ve ileri histolojik dereceye sahip tümörlerde görülmüştür. İyi huylu fibrokistik, fibroadenom ve karsinomlu kişilerde yapılan çalışmada c-myc, H-ras, K-ras ve N-ras ekspresyon seviyelerinin iyi huylu meme dokularından çok karsinomlarda daha yüksek oldukları bildirilmiştir (37). H-ras1 allel kaybının histolojik grade-III tümörlerde, östrojen ve/veya progesteron reseptör kaybı ve kötü klinik gelişime sahip hastalar ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (38). Böylece H-ras1 lokusunun genotipik analizi meme kanser riski taşıyan hastaların tayininde prognostik bir değer olabileceği ileri sürülmüştür. p21'in seviyelerinin, hormona cevap veren meme kanser vakalarının her birinde yüksek bulunmasına rağmen hormon ile ilişkisiz tümör vakalarında da saptanmıştır (38). Ras'ın yüksek seviyeleri hiperplastik lezyonlar ile karşılaştırıldığında invazif meme karsinomlarında daha yüksek bulunmuştur. Postmenoposal hastalarda yüksek seviyelerde p21 ekspresyonuna eğilim vardır (38). H-ras gen mutasyonları nadir olmakla birlikte meme kanserinde %70' lik bir risk nedenidir (38).

2.7.4. T- Hücre Translokasyon Geni 2 (TTG2 veya LMO2)

LMO2 geni insan 11. kromozomunun p kolunda yer almakta (11p13) olup Rhombotin 2 (RBTN2) veya T-hücre translokasyon geni 2 (TTG2) olarak da isimlendirilir (31). İnsan ve faredeki LMO2 geni yüksek benzerlik göstermektedir ve sistince zengin benzer iki LIM bölgesi kodlamaktadır. Farede Northern blot analizi ile LMO2 mRNA'sının embriyo gelişim aşamalarında eksprese olduğu, erişkinde merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, akciğer ve dalakta ekspresyonunun bulunduğu gözlenmiştir (39). T-hücreli akut lenfoblastik lösemiye özgü LMO2'de bir translokasyon kırılma bölgesi araştırılmıştır (39). T-hücreli lösemide LMO2 fonksiyonu 11. kromozomun 11p15 bölgesindeki bir translokasyon ile bozulur. İmmünohistokimyasal analizler kullanılarak LMO2 geninin normal Germinal-Merkezi (GC) B hücrelerinin nükleosunda, GC türevi B hücre hatlarında ve GC türevi B hücreli lenfomasının alt gruplarında LMO2 ekspresyonu gösterilmiştir (39). LMO2 geninin eritropoezde ve T hücreli lökomogenezde önemli rolleri vardır (40). B hücreli lenfomada uzun sağ kalımda LMO2, BCL6 ve FN1 genleri ile ilişkili ve CCND2, SCYA3 ve BCL2'nin kısa

sağ kalımda etkili olduğu uluslar arası tanı indeksinde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir (40). Fare ile yapılan deneylerde, retroviral yolla baskılanmış hematopoetik tümörlerinden elde edilen klonların üç binden fazla retroviral entegrasyon bölgesini içeren veri tabanı araştırıldığında LMO2 geninde entegrasyonla iki farklı lösemi tespit edilmiştir. Bu gen özellikle T-hücreli lösemi hastalarında çalışılmıştır (41).

2.7.5. V-REL Avian Retikuloendotelyosiz Viral Onkogen Homoloğu A (RELA, NFKB3)

Nüklear faktör kapa B, subunit 3 (NFKB3) ya da transkripsiyon faktörü NFKB3 olarak da adlandırılan bu gen insan 11. kromozomunun q kolunda yer almaktadır. 10 ekzon, 551 aa içerir ve 8.1 kb'lık yer kaplamaktadır (34). NFKB hematopoez, transformasyon, apoptozis, proliferasyon, immünite, invazyon, anjiogenez ve metastaz ile ilgili genleri denetim altında tutmaktadır. NFKB, Rel domaini içeren proteinlerden oluşan bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. Bu domainler, RELA (p65), RELB, RELC, p50 (NFKB1) ve p52'dir (NFKB2). NFKB1 ya da NFKB2 NFKB kompleksini oluşturabilmek için REL, RELA ya da RELB'ye bağlanır. NFKB'nin en sık rastlanan formu p50 (NFKB1)/p65 (RELA) heterodimeridir. NFKB kompleksi transkripsiyonu nükleus da gerçekleşir ve NFKB heterodimerik p65-p50 ve p65-RELC kompleksleri transkripsiyonal aktivatördür. NFKB p65-p65 kompleksi IL-8 ekspresyonunun invasin-bağlı aktivatörüdür (42,43). Zhong ve arkadaşları, transkripsiyonel olarak inaktif NFKB'nin histon deasetilaz HDAC1 ile kompleks oluşturan p65 ya da p50 homodimerlerini içerdiğini bulmuşlar ve RELA'nın UV bağımlı apoptozda payı olabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca bu gen DNA tamiriyle ilişkili bulunmuştur (44).

2.7.6. Kortaktin (EMS1)

EMS1 geni, bir onkogen olup insan 11. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (11q13) (31). Hücre yapısının düzenlenmesine katkıda bulunan bu gen 550 aa içerir ve hücrede sitoplazma ya da hücre iskeletinde bulunur (31). Kortaktinin en önemli görevi; karsinoma hücreleri ve epitelyumda hücre iskeleti ve hücre adhezyon yapısını düzenlemektir. Apoptozis esnasında, kaspaz bağlı yapıların protein kodlamasını engeller ya da azaltır. Ayrıca, transforme olmuş hücrelerin tirozin fosforilasyonunda,

hücresel büyümenin düzenlenmesi ve transformasyonuna da katkıda bulunur. Bu genin amplifikasyonu göğüs kanseri, ense ve kafada bulunan hücre karsinomlarında sıklıkla rastlanabilir. Bu bölgede amplifiye olduğu bilinen onkogenler INT2 ve FGF4'tür. EMS1'in p80 ve p85 olarak tanımlanan 2 formu bulunur. Bu karsinomlarda p85'in p80'den post translasyonel modifikasyonla türediği bulunmuştur. Ayrıca potasyum kanallarında EMS1'in önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (45,46).

2.7.7. Tümör Nekrosis Faktör Reseptör 7 (TNFRSF7)

T-Hücre Aktivasyon Antijen CD27 olarak da isimlendirilen bu gen insan 12. kromozomunun p kolunda yer almaktadır (12p13) ve 260 aa içerir (31). Bigler ve ark. Sezary sendromlu bir hastanın lösemik hücrelerini bir immünojen olarak kullanıp monoklonal bir antibody geliştirmiştir. Bu monoklonal antibody TNFRSF7 olarak adlandırılmıştır ve lösemik hücrelerle sirküle T-lenfositlerinin alt gruplarını etkilemektedir (47). Hücreler, mitojenler ya da alloantijenler tarafından aktive edildiği zaman monoklonal antibody TNFRSF7 dinlenen hücrelerden altı kat daha yoğun boyandığı görülmüştür. Bu genin disülfüt bağlı bir homodimer olduğu açıklanmış ve T hücre aktivasyonu sırasında fonksiyonel bir rol oynadığı gösterilmiştir (47). TNFRSF7 geni tümör nekroz faktör reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Diğer üyeleri TNFR1, TNFR2, NGFR, CD30, CD40, CD95, OX40'dır. Bu reseptörlerin hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve apoptozda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (48).

2.7.8. Lenfoid Sınırlayıcı Membran Proteini (LRMP)

Yeni tanımlanan bu gen 12. kromozomun p kolunda yer almaktadır (12p12.3) (31). Beş yüz elli beş aa içerir ve 59,6 kD moleküler ağırlığındadır (31). LRMP geninin kodladığı protein lenfoid hücre hatlarında ve dokularda eksprese olmaktadır. Bu protein endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzünde bulunur. Lenfoid dokularda, ayrıca pankreas ve kolonda Jaw1/LRMP transkriptleri bulunmuştur. Jaw1/LRMP geninin BCL6 geni ile ilişkide olduğu rapor edilmiştir. Periferik dokularda Jaw1/LRMP geni B-hücrelerin germinal merkezinde (GC) aşırı eksprese olurken T-hücre neoplazmasında ekspresyonu yoktur. Burkitt's lenfoma, Hodgkin's lenfoma, kronik lenfoblastik lösemi ve B-hücreli lenfoblastik lösemide bu genin ekspresyonu gözlenmiştir (49,50).

2.7.9. ELKS/RAB6 ile Etkileşen /CAST Ailesi Üyesi 1 (ERC1)

ERC1 geni insan 12. kromozomunun p kolunda yer alır (12p13.3) ve 39 kD moleküler ağırlığındadır (31). ERC1 geninin kodlamış olduğu protein, nörotransmitter salınımı kontrol eden aktif bölge protein ailesinin üyesidir (51). Bu gen t(10;12)(q11;p13) translokasyonu sonucu meydana gelen gen düzenlenmesinde reseptör tirozin kinaz geni olan RET ile kaynaşır (51). Ayrıca bu genin nörotransmitter salınımının kontrolünü gerçekleştiren sinir terminal aktif bölgelerindeki sitomatriks organizasyonunda yer aldığı düşünülür ve vesikül alışverişinde de rol oynar. Rab-6 kontrolündeki endozomlardan golgiye taşınımında yer alır (51).

2.7.10. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (CDKN1B)

İnsan 12. kromozomunun p kolunda yer alan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B (CDKN1B) alternatif ismi olarak p27KIP1 olarak adlandırılır (12p13) (31). Aktif CDK kompleksinin sentezi ve yok edilmesi CDK inhibitörleri (CDKI) ile de düzenlenir (52). Bu inhibitörler hücre siklusunda CDK'ların aktivitesini dengelerler. Bunların seviyesindeki değişiklikler, bazı tümörlerde veya hücre yaşlanmasında görülebilir, normal siklusun ilerleyişini değiştirebilirler (52). Son çalışmalar, CDKI'ların birçok hücrenin diferansiyasyon, proliferasyon ve apoptozis kontrolünde rol alabileceğini göstermiştir (52). Siklin-CDK komplekslerinin aktivitesi iki CDK inhibitörü aile tarafından sıkı denetim altındadır: İlki, p21, p27 ve p57'den oluşan CIP/KIP ailesi, diğeri ise p15, p16, p18 ve p19'dan oluşan INK4 ailesidir (53). p27, TGF beta gibi büyüme supresörlerine yanıt olarak hücre siklus arresti ile diferansiyasyon ve kontakt inhibisyonunda rol alır. p27 ekspresyon kaybı akciğer, meme ve mesane gibi birçok tümörde gösterilmiş, kötü prognoz ve agresif davranışla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca p21 ve p27'nin hücrelerin terminal diferansiyasyonu sonucu hücre siklusundan çıkması ve proliferatif aktivitesini kaybetmesinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır (54). CIP/KIP aile üyesinden biri olan p27KIP1 (CDKN1B) geninin 109. kodonunda T/G değişimi sonucu glisin aa yerine valin aa kodlanmasıyla sonuçlanan bir polimorfizm tanımlanmıştır. Meme kanserli hastalarda GG genotipi ile lenf nodu metastazı arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve bu polimorfizmin tümör prognoz belirteci olabileceği önerilmiştir. Bir başka çalışmada ise, CDKN2A, p15INK4B (CDKN2B), CDKN1B

genlerinin kontrol bölgelerinde yeni polimorfizmler tanımlanmıştır. CDKN2A -222A, CDKN2B - 593A, CDKN1B -1608A varyantları ile çocukluk çağı pre-B akut lenfoblastik lösemi (ALL) gelişimi arasındaki bağlantı gösterilmiştir (54,55).

2.7.11. Plakofilin 2 (PKP2)

İnsan 12. kromozomunun p kolunda yer alır (12p11) (34). PKP2 basit dizi tekrarları (armadillo repeat) içeren proteinlerdir. Dezmozomal plak ve hücre nükleosunda yer alırlar. PKP2 gibi dezmozomal PKP' lerde katedrinlerin sitoplazmik kuyruğu ve hücre iskeletinin orta filamentleri arasındaki bağlantıda yer alırlar (34). PKP2'nin PKP2a ve PKP2b olmak üzere iki formu insan kolon karsinoması ve kalp cDNA kütüphanelerinden izole edilmiştir. 837 aa'lık PKP2a proteini, ilk olarak Drosophila 'armadillo' gen ürünü olarak tanımlanan yaklaşık 42 aa'lık bölge olan armadillo tekrarlarının 9 tam kopyasını içerir. PKP2a ve 881 aa'lık PKP2b proteinleri karşılaştırıldığında, PKP2b'nin 2. ve 3. armadillo tekrarları arasında 44 aa'lık bir insersiyon vardır. PKP2a ve PKP2b'nin PKP2 transkripsiyonundan türediği savunulmaktadır. PKP2 ve PKP1 proteinlerinin armadillo tekrarları %42 oranında benzerdir. İmmüno lokalizasyon çalışmalarıyla PKP2'nin basit epiteldeki dezmozomal plağında bazı tabakalaşmış epitel ve bazı tabakalaşmamış epitel hücrelerinin bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (56,57).

Northern blot analizi ile yaklaşık 5.3 kb'lık PKP2 transkripsiyonu çeşitli insan hücre hattında ve hem epitel hemde epitel olmayan hücreleri bulunan dokularda saptanmıştır. PKP2'nin 2. ekzonundaki ve 11. ekzonundaki çeşitli genetik farklılaşmalar, Aritmogenik sağ ventrikular displasia (ARVD)'lı hastalara yapılan çalışmalarla ilişkilendirilmiştir (57).

2.7.12. Tip II Kollajen Alfa - 1 (COL2A1)

COL2A1, insan 12. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (12q13.1) ve kırkırdak kollajeni olarak da adlandırılır (34). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda yüzün üzerinde COL2A1 mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar iki alel COL2A1'den birinde olabilir; defektler molekülün üçlü helikal bölümünde bulunur. Gendeki defekt, oluşan mutant kollajen molekülünün kartilajın ekstrasellüler matriksinde yığılmasına veya

normal kartilaj matriksinin azalmasına yol açar. En sık görülen COL2A1 mutasyonu her üçlü helikste de üçüncü pozisyonda yer alan glisinin değişmesidir. Bu durumda heliks normal fonksiyonunu yapamaz. Tip II kollajen kırırdağın en önemli yapısal proteindir. Bu kollajenin miktarında azalma veya yapısının bozulması, enkodral kemikleşmeyi bozar. Spondilo epimetefizer displazi Strudwick tipi ilk 1982’de spondilo epifizer displazi konjenitanın spesifik varyant tipi olarak tanımlanmıştır. Her iki durumda da gen kromozom 12q13 ile bağlantılıdır (58,59). Spondilo epifizer displazi konjenita (nadir bir iskelet displazisi), Sticler sendromu, akondrojenesis tip 2, hipokondrojenesis, Kniest displazi ve Strucwicktype spondilo epimetafizer displaziye kapsayan tip 2 kollajen COL2A1 genindeki mutasyona bağlı gelişen bir grup bozukluğa aittir (59,60).

2.7.13. Murine Double Minutes (MDM2)

MDM2 geni 12q13-14 kromozom bölgesinde yerleşmiştir (34). Buradan kodlanan MDM2 proteini (pMDM2), p53’ü kontrol altında tutar ve p53’ün G1/S geçişinde siklusu durdurma ve apoptoz etkisini engeller (61). MDM2 proteini sitoplazmada p53’ e bağlanarak, “E3 ubiquitin ligase” aktivitesi ile p53’ü yıkar yani p53’e karşı çalışan bir proteindir. Hipoksi, ultraviyole, radyasyon gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda pMDM2’nin p53’e bağlanma yerinde asetilasyon ve fosforilasyon nedeniyle yapısal değişiklik oluşur. Bu yüzden MDM2 proteini p53’ü bağlayamaz ve serbest kalan p53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulması ve BAX geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur. Ancak özellikle onkogenik stimulus varlığında pMDM2 etkisini, p53’e bağımlı olmayan yolla gösterir. G1/S geçişinden sorumlu olan E2F/DP1 aktivasyonunu p14ARF’in inaktivasyonunu yapar. İnaktive olan p14ARF hücre çekirdeğinde pMDM2’yi bağlayamaz ve sitoplazmaya çıkmasına engel olamaz. Bu nedenle P53’ün etkisi azalır. Ayrıca E2F aktivasyonu yaptığından hücre G1 fazından S fazına geçer. MDM2 genindeki amplifikasyon glioblastomlarda < %10’un altında bulunmuştur (62,63).

İmmünohistokimyasal çalışmalarda pMDM2’inin aşırı ekspresyonu primer glioblastomda %52, sekonder glioblastomda %11 bulunmuştur. MDM2’in aşırı ekspresyonu, MDM2 geninin amplifikasyonu ve p53 mutasyonu bulunmayan primer glioblastomlarda saptanmıştır. Ayrıca kromozom 12q22–23 bölgesindeki LOH glioblastomlarda %42 düzeyine kadar ulaşmaktadır. Bu bölge “apoptotic protease

activating factor-1” (Apaf-1)’i içermektedir. Bu bölgede olan kayıplar nedeniyle Apaf-1’in fonksiyon görmemesi sonucunda p53’ün neden olduğu apoptoz yolunun sonlanması ile glioma onkogenezi başlamaktadır. Kromozom 12q 22–23 bölgesindeki LOH’nin, p53 gen mutasyonu ve EGFR gen amplifikasyonu ile beraber olmaması, astrositik öncü hücrelerinin de novo olarak direkt malign transformasyonunla primer glioblastom gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (64).

2.7.14. T-BOX 5 (TBX5)

TBX5 geni insan 12. kromozomunun q kolunda yer alır (12q24.1) ve 47 kb’lık bir gen olup 9 ekzon içerir (31). Holt-Oram Sendromu (HOS) kalp ve üst uzuvlardaki gelişimsel bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda 12q21.3-q22’de yer alan bir genin bu sendromla ilişkisi olduğu düşünülmüştür (65). 12q12’de HOS lokusunu içeren bir translokasyon tanımlanmış ve bu bölgenin genomik klonları kullanılarak Brchyury ailesine ait 2 gelişimsel fonksiyona sahip gen bulunmuştur (66). Bu genler ortak bir DNA-bağlı motif (T-BOX) içerirler ve TBX5 ve TBX3 olarak tasarlanmışlardır. HOS lokusuyla bağlantılı olan D12S129’u içeren cosmid kullanılarak florasan insitu hibridizasyon yöntemi ile HOS lokusunun 12q24.1’de olduğu tanımlanmıştır. HOS ailesinin üyelerinden etkilenmiş hastalarda çeşitli TBX5 mutasyonları saptanmıştır. TBX5 geni ailesinin üyeleri transkripsiyon faktörü olarak davranırlar ve korunmuş TBX5 bölgesi DNA bağlanma bölgesi olarak tanımlanır (66). TBX5, NKX2-5 ile ilişkili ve sinerjik olarak kardiyomyosidlerin farklılaşmasını kontrol eder. GATA4 ve TBX5 arasındaki ilişkide TBX5 sessiz mutasyonu sebebi ile aralarındaki ilişkinin bozulmasıyla kardiyak septal defektler ortaya çıkabilmektedir. GATA4’ün insan kardiyak septal defektlerden genetik açıdan sorumlu olması TBX5 ile aralarındaki ilişki nedeniyle olduğu düşünülür (67). SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak TBX5 geninin ailevi ve sporadik HOS vakalarında mutasyona uğradığı gösterilmiştir. TBX5 genlerindeki mutasyonlar ile ilişkilendirilen hastalıklar; Holt-Oram Sendromu, Ulnar-mammary Sendromu, DiGeorge Sendromu, ACTH eksikliği ve ankyloglossiadır (68).

2.7.15. Meme Kanseri Tip 1 (BRCA1) ve Meme Kanseri Tip 2 (BRCA2)

İnsan 17. kromozomun q kolunda BRCA1 geni ve 13. kromozomun q kolunda BRCA2 geni bulunmaktadır (BRCA1; 17q221, BRCA2; 13q12.3) (31). BRCA1 geni 1863 aa, BRCA2 geni ise 3418 aa'lık bir proteini kodlar. Her iki protein de hücrenin diğer bazı proteinleri ile bağlanarak işlev görür (31). Hücre proliferasyonunun kontrolünde, BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin tümör baskılayıcı proteinler ile DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler ile transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler ile hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ve DNA'da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir (69). BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar; BRCA proteinlerinin inaktivasyonu, tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer "genom koruyucu" rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (69).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile BRCA1 ve BRCA2 genlerinde 1000'den fazla birbirinden farklı DNA dizi değişikliğine dayanan mutasyonlar tespit edilmiştir. Çeşitli mutasyon tiplerine rağmen BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonların büyük bir çoğunluğu tek tiptir. Bu mutasyonların topluma ve etnik gruba özel olduğu da gösterilmiştir. Örneğin Ashkenazi yahudilerde üç tane ortak BRCA1/BRCA2 atasal mutasyonları vardır. Bunlar BRCA1'deki 185delAG ve 5382insC mutasyonları, BRCA2'deki 6174delT mutasyonudur (70). Türk toplumunda yapılan çalışmalarda meme veya ovaryum kanserli hastalarda yapılan BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyon taramalarında, Türk toplumuna özgü sayılacak tekrarlayan bir mutasyon bildirilmemiştir. Meme ile birlikte ovaryum kanserine yatkınlık geni taşıyan ailelerde BRCA1 ile %80'e yakın ilişki vardır, meme kanserli ailelerde BRCA1 için bu oran %45 ve BRCA2 için %35' dir. Büyük ölçekli çalışmalarda, ailesinde 60 yaşından önce meme kanseri teşhisi konan en az dört kadın bireyin veya herhangi bir yaşta meme kanserli erkek bireyin olduğu ailelerde BRCA1 (%52) ve BRCA2 (%32) mutant allellerinin meme kanseri ile yakın ilişkisi gösterilmiştir (71,73). Meme dokusunda alveoler ve duktal epitel hücrelerinde BRCA1'in ekspresyonu gözlenir (72). Bu gen hamilelik ve emzirme dönemlerinde belirgin olarak aktif çalışırken, parturisyonda laktasyon sonrası ekspresyonu azalır (72). BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda pubertedan sonra meme veya ovaryum tümörlerinin gelişme riski %5-10 kat artar. BRCA1 steroide bağımlı bir hücre döngüsü düzenleyicisi olarak işlev görüyor olabilir.

Gerçektende BRCA1 ve BRCA2 genleri insan meme kanseri hücrelerinde östrojene duyarlıdır ve cevap olarakta her iki gene ait m-RNA seviyeleri artar (72). BRCA1 geninin bir allelindeki mutasyon erken dönem dişi meme kanserlerinde yüksek risk oluşturur, buna karşılık kolon ve prostatta daha düşük bir risk taşır. BRCA2 genindeki mutasyonlar ise erken dönem erkek meme kanserlerinde yüksek bir risk taşır (72).

2.7.16. Retinoblastoma 1 (RB1)

İnsan 13. kromozomunun q kolu üzerinde yerleşmiş olan RB1 geni 27 ekzondan oluşmaktadır (31). Bu gen 4.8 kb'lık bir mRNA üretir. Bu mRNA, 928 aa bir protein olan pRB' ye aracılık eder (31). pRB de paket protein ailesinden olup 105 kb' lik bir nükleer proteindir. Aynı zamanda RB1, N terminal bölgesinde santral A, B domainleri ile C terminal domain olmak üzere üç farklı domain ihtiva eder. Bu üç domanın ana fonksiyonları; büyümenin düzenlenmesi, hücre farklılaşması, viral ve selüler proteinlerin interaksyonu ve transkripsiyonel regulasyondur. pRB biyolojik etkisini transkripsiyonu seviyesinde hem pozitif hem de negatif regulasyonla düzenler. Pozitif gen regülasyonu hücrelerin farklılaşması ile bağlantılıdır (31). Transkripsiyon seviyesinde baskılama hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açar. pRB, transkripsiyonu çeşitli mekanizmalarla baskılar (31). RB1 geninin RB proteini, çekirdekte yer almaktadır ve dinlenme fazındaki (Go veya G₁) hücrelerinde fosforile olmamış haldedir. PRB, siklin D-cdk4/t ve siklin E-cdk tarafından fosforile olur. Erken G₁ fazında hipofosforile olmuş pRB, M fazında yeniden ortaya çıkar. Hipofosforile olmuş pRB, G₁ fazında hedef proteinlere bağlanır ve siklüs durur. PRB'nin hiperfosforile formu yani serin ve treonin bölgesinden fosforile olmuş formu ise geç G₁ fazı dahil S, G₂ ve M fazlarında mevcuttur. PRB'nin fosforile olmasının G₁ fazındaki duraklamayı ortadan kaldırdığı sanılmaktadır. Çünkü fosforile olmuş pRB, ilişkili olduğu E2F2 ve HDACs ile artık interaksyona giremez ve DNA sentezinin S fazında gerekli gen transkripsiyonunu aktive eder. Bu esnada yine E2F siklin E ve A ekspresyonunu artırarak pRb'nin fosforilasyonunu tamamlamasını sağlar. SV40 T gen antijeni, Go/G₁ fazında fosforile olmuş RB proteinine (p110) bağlanmaktadır. Böylece dominant olmayan transforme eleman olarak SV40 T'nin RB proteinine bağlanarak; Go/G₁ fazını büyüme baskılayıcı etkisiyle düzenleneceği ve inhibe edeceği öne sürülmüştür. Transforme olmamış ebeveyn hücreleri, sadece p110 RB proteini mevcut olduğunda Go fazına

girmektedir. Teorik olarak; SV40 T'nin bu etkiyi p110 RB1 proteinine bağlanarak engellediği bilinmektedir. Bu proteinin yüksek bir afinite ile DNA'ya bağlanması en önemli fonksiyonudur. Böylece RB1 proteini, gen düzenleyici bir fonksiyona da sahip olmaktadır. Sonuç olarak, hücre siklusunda G₁'den S fazına geçişi, RB1 proteini kontrol etmektedir. Bu gen hücrel diferansiyasyonda çok önemli bir role sahiptir. RB1 gen inaktivasyonu özellikle retinoblastoma ve osteosarkom tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Mutasyon veya delesyonlara bağlı olarak inaktive oldukları diğer maligniteler arasında özefagus ve meme kanserleri sayılabilir (74-76).

2.7.17. ATP-Bağlayıcı Kaset B Alt Ailesi C 4. Üyesi (ABCC4)

İnsan 13. kromozomunun q kolunda yer alır (13q32) (28). Tüm ilaca dirençli insan hücre hatlarında aşırı ekspresyonuna rastlanmaktadır. Aşırı ilaç taşıyıcı protein üreten kanser hücreleri farklı yapı ve hücrel hedeflerdeki geniş spektrumlu ilaçlara direnç geliştirebilir. Bu durum “multi drug direnci (MDR)” olarak isimlendirilir. MDR-ATP bağlayıcı kaset membran proteinleri enerji bağımlı taşınımın çeşitli ara ürünlerinden biri olarak yer alır. Plak, göğüs ve yumurtalık bakteriyofaj kütüphanelerinin plak hibridizasyonunu takiben MRP1'in N-terminal dizilerine dayalı dejeneratif PCR ile ABCC4'ü kodlayan bir cDNA bulunmuştur. Northern Blot analizlerine ile yaklaşık 6 kb'lık transkripsiyon ürün ekspresyonunun prostatta yüksek ve karaciğer ile periferel kan lökositlerinde düşük olarak saptanmıştır. Taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarını düzenleyen genlerdeki (p53, N-MYC vb.) delesyonlar ya da amplifikasyonlar bu proteinlerin ekspresyonlarının artmasına ve tüm hücrelerinin ilaca direnç göstermesine neden olur (77,78).

2.7.18. Nükleer Faktör Kappa B (NFKB)

İnsan 14. kromozomun q kolunda yer alan ve transkripsiyon faktörlerin bilinen beş proteininden p50 ve p65'in heterodimer bir oluşumu olan transkripsiyon faktör nükleer faktör kappa B (NFKB), nükleer faktör inhibitörü kappa B (IKB) proteinleri tarafından Go fazındaki hücrelerin sitoplazmasında sentezlenir ve inaktif olarak bulunur (14q13.2) (34). NFKB; sitokinler, radyasyon ve bazı kemoterapötik ajanlarla fosforilasyon, ubiquitinasyon ve IKB'nın proteozom-aracılı degradasyonuna yol açarak aktive olur (79,80). Burada immün sistem, büyüme ve inflamasyonu denetleyen 200'ün üzerinde geni düzenlemektedir (79). NFKB; hücre büyümesi, diferansiyasyonu, apoptozisin

regülasyonu, sitokin prodüksiyonu ve neoplastik transformasyondan sorumlu çok sayıda gen ekspresyonunu kontrol etmektedir (80).

NFKB, Rel domaini içeren proteinlerden oluşan bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. Bu domainler, RELA (p65), RELB, RELC, p50 (NFKB1) ve p52'dir (NFKB2). p100 fosforilasyon bağımlı bölünme ile p52'yi oluştururken, p105 bölünerek p50'yi meydana getirir. NFKB'yi inaktif halinde sitoplazmada tutan anchorin domaini içeren proteinler gösterilmiştir; bunlar IKB alfa, IKBbeta, IKBgamma, IKBepsilon, BCL-3, p105 ve p100'dür (80,81). İstirahat halinde NFKB sitoplazmada p50, p65 ve IKB alfa'dan oluşan bir heterodimer şeklinde bulunur. Nükleusa taşınan NFKB aktif proteinleri burada özgün olarak 10 bç içeren GGPPuNNPyPyCC bölgesine bağlanır (Pu: pürin, Py: pirimidin ve N herhangi bazı simgelemektedir). NFKB hematopoietik veya solid çoğu tümör hücresi gelişiminde aktif rol oynamaktadır. Öte yandan NFKB normal hücrelerde nadiren aktiftir. Proliferatif fazdayken normal T hücreleri, B hücreleri, timositler, monositler ve astrositlerde aktif NFKB bulunur. Tümörlerde NFKB'nin baskılanmasının proliferasyonu inhibe ettiği, hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NFKB inhibisyonunun tümör hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirdiği belirtilmektedir (82,83). Öte yandan, NFKB immün sistemin normal çalışması için gereklidir.

Ayrıca NFKB transkripsiyon faktörünün aktivasyonunun antikanser tedavi direnci açısından önemli olduğu bilinmektedir (81). NFKB transkripsiyon faktör inhibisyonunun fibrosarkoma, lenfoma, melanoma yanısıra mesane, meme ve skuamöz hücreli kanser hücre serilerini TNF (tumor necrosis factor), kemoterapi ve radyoterapinin sitotoksik etkilerine karşı sensitize ettiği gösterilmiştir. Mide kanserlerinde NFKB aktivitesinin tümör büyüklüğü, invazyon derinliği ve lenfatik invazyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (84). Ancak halen NFKB aktivasyonunun kanserli dokulardaki klinik önemine dair kanıtlar yerine oturmamıştır.

2.7.19. GTP – Bağlı Protein 3 (SPG3A, ATL1)

Alternatif adı Atlantin 1 olan SPG3A geni 14. kromozomun q kolunda yer alır (14q22.1) ve 14 ekzon içerir (34). Otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalık olan Spastik Parapleji GTPaz geninin mutasyonu sonucu oluşur. Atlantin 1'in aşırı ekspresyonunun GTPaz aktivitesini engellediği belirtilmiş ve erişkin ve fetal beyinde 2,2 kb'lık

transkripsiyon ürünü olduğu saptanmıştır. Spastik Parapleji'nin otozomal resesif ve X' e bağlı geçiş gösteren nadir formları da vardır. Sıklıkla 35 yaşından önce başlar. Her iki bacakta progresif spastisite ve kuvvetsizlikle karakterizedir. Derin tendon refleksleri artmıştır ve babinski refleksi görülür. SPG3A geninin 50 farklı ailede 19 mutasyonu tanımlanmıştır ve bu mutasyonların %90'ının ekzon 4, 7, 8 ve 12'de yerleşik olduğu belirtilmiştir (85,86).

2.7.20. Transformasyon Büyüme Faktörü Beta-3 (TGFB3)

TGFB3 geni insan 14. kromozomunun q kolunda yer alır (14q24) (31). Beta tip transformasyon büyüme faktörleri çeşitli hücre tiplerinin proliferasyon ve farklılaşmasını hormonal olarak kontrol eden polipeptitlerdir. Mezangiyal ve epiteliyal hücrelerde ekstrasellüler matriks (ECM) sentezini uyarmaktadır. Günümüzde TGFB'nin glomerüloskleroz patogeneğinde en önemli fibrogenik büyüme faktörü olduğuna inanılmaktadır. Ancak glomerül içindeki doğal proteoglikan antagonistlerinin azalmasının, TGFB'nin ortaya çıkışından daha önemli olduğunu savunan araştırmacılar da vardır (87). TGFB rat mezangiyal hücrelerinde fenotipik değişiklikler yapabilir; böylece a-düz kas aktini ortaya çıkar ve bu durum hücrelerde kollagen sentezini değiştirebilir (88). TGFB'nin b1, b2, b3 biçiminde üç farklı izoformu invitro asit ortamlarda veya proteazlarla aktive olurken, invivo aktivasyon mekanizması hakkında yeterli bilgi yoktur. Esas etkisi, ECM komponentlerinin depolanma ve sentezini arttırmak ve matriks devinimini azaltmak biçiminde ECM birikimini uyarmaktır. Bunu da degradasyonu katalize eden enzimleri (metalloproteinaz gibi) inhibe ederek yapar. Ek olarak, ilginç bir biçimde çoğalmayı durdurucu etkisi ve immun sistem aktivasyonu üzerine inhibitor etkisi vardır. TGFB yapımını; Angiotensin II, endotelin-I, iskemi, glisemi, insulin, stres, "İnsulin like Growth Factor- I" (IGF-I), atrial natriüretik faktör, platelet aktive edici faktör, tromboksan ve siklosporinle tedavinin uyardığı bildirilmiştir (89).

2.7.21. Apoptozis Modülatörü 1 (MOAP1)

Apoptozis modülatörü olan bu gen insan 14. kromozomunun q kolunda yer alır (14q32), 351 aa' lik proteini kodlar ve 39 kD moleküler ağırlığındadır (31). MOAP1 geni, BH3

benzeri bir motif merkezi içerir ve bu motif BID (BH3-Interacting Domain Death Agonist) geninin BH3-B bölgesine benzerdir. Northern Blot analizi ile test edilen bütün dokularda 2.8 kb'lık MOAP1 transkripsiyonu beyin ve kalpte yüksek ekspresyon seviyelerinde bulunmuştur. Tan ve ark. (2001), MOAP1 geninin göğüs karsinom hücre hatlarında aşırı ekspresyonunun apoptozu teşvik ettiğini bulmuştur. Yapılan mutasyon analizleri göstermiştir ki MOAP1'in BH3 benzeri bölgesi apoptoza ve BAX' a bağlanmasına aracılık eder. Fakat BCLXL' ye bağlanmada etkili değildir (90). Tümör supresör geni olan RASSF1A ve tümör supresör genle ilişkili olan MOAP1'in etkileşimi sonucu BAX geninde konformasyonel bir değişikliğe sebep olur ayrıca TNF ve TNFSF10 uyarımı sonucu oluşan yanıtta mitokondriyal membranda translokasyon gerçekleşir (91).

2.7.22. E-Kadherin (CDH1)

CDH1 geni kromozom 16q22.1 üzerinde yer alır (31). CDH1 molekülleri membran dışında, hücrelerarası temas noktalarında yer alır. Molekülün membran dışında kalan bölümü aktin ağının bir bileşeni olan kateninler ile etkileşir. Gen üzerinde gerçekleşen mutasyonlar sentezi tamamlanmamış, eksik moleküllerin ortaya çıkmasına neden olduğundan hücre-hücre etkileşiminin en önemli bileşenlerinden biri eksilir. Lobüler kanserlerde görülen invaziv çoğalma özellikleri bu işlev kaybı ile uyumaktadır. Duktal kanserlerde CDH1 ekspresyonunda önemli bir değişme olmamasına karşın infiltratif lobüler ve lobüler karsinoma insitu olgularının % 85'inde genin ekspresyonu gözlenmez. Lobüler kanserlerde görülen bu değişikliklerin yarısından fazlası gende gerçekleşen somatik mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar (92, 93).

2.7.23. Avian Sarkoma Virus CT10 (v-crk) Onkogen (CRK)

Onkogen CRK insan 17. kromozomunun p kolunda yer almakta (17p13.3) ve Avian Sarcoma Virus CT10'un dönüşüm bileşeni olarak tanımlanmaktadır. 304 aa içeren bu onkogen sitoplazmada ve hücre membranında bulunmaktadır. Reichman ve ark. (1992), tavuklarda v-crk'nın hücresel homologunu kodlayan cDNA izole etmiş ve SH2 ile SH3'ün SRC homolog bölgeleri içerdiği gösterilmiştir. 17. kromozomdaki 17p13 bölgesinin delesyonu insan kanserlerindeki kromozom farklılaşmalarında sıklıkla

gözlenmektedir. TP53 onkogeni 17p13.1 bölgesinde lokalizedir. CRK onkogeni 17p13.3'de lokalizedir ki CRK onkogeninin bulunduğu bölgenin kaybı ile bazı farklı tümör tiplerindeki heterozigotluk kaybı (LOH)'nın belirgin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sinyal iletiminde yer alan birçok proteinde moleküler bağlayıcı olan SH2 ve SH3'ün ABL ve CRK arasında görev aldığı düşünülmektedir (31,94). Miller-Dieker sendromu 17. kromozom kısa kolunda büyük delesyonlara (17p13.3) bağlı ortaya çıkmaktadır. Olgularda karakteristik yüz görünümü olarak mikrosefali, kısa ve yukarıya dönük burun delikleri, epikantal kıvrımlar ve mikrognati mevcuttur. Bu sendromun sebebini sekiz genin delesyonuyla ilişkilendirmişlerdir ve bu genlerden biri CRK onkogenidir (95).

2.7.24. Eritroblastik Lösemi Viral Onkogen Homoloğu 2 (ERBB2)

ERBB-2 (HER2/Neu) geni, diğer adı ile cerbB-2 veya p185 olarak isimlendirilen bu onkogen 17. kromozomun q kolunda yerleşmiş olup protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır (17q21.1) (34). Ancak gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogeneze katılan bu onkogen, meme kanserleri için önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilmektedir. CerbB-2 onkoproteini plazma membranına yerleşmiş EGFR'ne benzer bir membran reseptördür. CerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. HER2 ve diğer üyeler (HER1, HER3 veya HER4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolunu aktifler. CerbB-2 geninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Bu onkogenin kopya sayılarının yüksek bulunuşu, tümör şiddeti ile doğru orantılı olarak saptanmıştır (96). CerbB-2 gen amplifikasyonu erken dönem meme kanserinde kötü prognoz ile yakın ilişkili bulunmuştur. Birçok çalışma ile cerbB-2 amplifikasyonunun diğer kötü prognostik faktörlerin varlığı, tedaviye düşük cevap ve lenf nodu pozitif meme kanserlerinde hastaların yaşam süreleriyle ilişkili olduğu, tek başına bir prognostik faktör olabileceğini desteklemiştir. CerbB-2 ekspresyonu ile ilgili verilerin çoğu lenf nodu pozitif hastalardan elde edilmesine rağmen uzun süreli takip sonrasında lenf nodu negatif hastalarda da cerbB-2 amplifikasyonu olanların daha kötü prognoza sahip oldukları gözlenir (96).

2.7.25. Doku Metalloproteinaz İnhibitörü 2 (TIMP2)

TIMP2 insan 17. kromozomunun q kolunda yer alır (17q25) (34). TIMP'lar, 6 disülfid bağı oluşturan 12 sistin rezidüsü içerir ve Metalloproteinazların (MMP) çinko içeren katalitik bölgelerine bağlanırlar. MMP'lerin TIMP'lar tarafından inhibisyonu, 1:1 sitokiyometride ve nonkovalent şekilde gerçekleştirilir. Şu ana kadar tanımlanan 4 farklı grup TIMP mevcuttur (97). Dolaşımdaki genel proteaz inhibitörlerinden biri α -2 makroglobulindir. Bu yapı enzimlere kovalent olarak bağlanarak onların yapısını değiştirir, kollajenin ve diğer matriks makromoleküllerinin parçalanmasına engel olur (97).

TIMP2, 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış bir proteindir. TIMP1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein rezidüsü vardır. Dağılımı iyi bilinmemekle birlikte eklem kıkırdaklarından izole edilmiştir. TIMP1 ve TIMP2'nin %40 oranında aminoasit dizin benzerliği vardır. Aktive olmuş MMP'ler yönünden TIMP1 ile benzerdir, ek olarak MMP2'nin proformu ile birebir kompleks yapar. TIMP2'nin kan beyin bariyerinin proteolitik sızıntısını azalttığı saptanmıştır (98). TIMP'lerin in vitro ortamda hücre invazyonunu ve in vivo ortamda tümörögenез ile metastazı engelleyen çok işlevli moleküller olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar her TIMP türünün birçok MMP'yi inhibe etme potansiyeli olsa da bu proteinler, selektif inhibitör işlev gösterirler. Örneğin, TIMP1 ve 2, sırasıyla selektif olarak MMP9 ve 2'yi inhibe ederler (99).

2.7.26. N-Kadherin 2 (CDH2)

CDH2, insan 18. kromozomunun q kolunda yer almaktadır ve 16 ekzona sahiptir (18q11.2). Kadherinler glikoprotein yapısında, kalsiyum bağımlı, transmembranöz hücre adezyon molekülleridir. Embriyogenez ve morfogenezde rol oynarlar. Merkezi sinir sisteminde kadherinlerin akson büyümesinde, demetlenmesinde, hedef hücrenin tanınmasında, sinaptik hücre adezyonunda, sinaptogenez basamakları sırasında önemli roller oynadıkları gösterilmiştir (34). Kadherin ailesi üyesi olan CDH2; Sinir sistemi, kalp, akciğer, lens, embriyonik mezoderm ve nöral ektoderimde eksprese olur. N kadherin; Sağ-sol asimetrisinin kurulmasında adezyon ve sinyal mekanizmalarında, büyüme konilerinin adezyonu ve rehberliğinde önemli rol oynar (34). Goodwin ve ark.(100) CDH2 monoklonal antikörlerinin tanımlanan sperm baş bölgesinde, diffüz olarak dağılmış antijenik epizotlar tespit etmişlerdir (100). Primordial, primer, sekonder

ve antral folliküllerdeki granüloza hücrelerinin birbirlerine CDH2 aracılı şekilde tutundukları ifade edilmiştir. Yine luteal hücrelerin, erken luteal fazda CDH2 için kuvvetli bir şekilde pozitif boyanırken, geç luteal fazda CDH2 ile zayıf şekilde boyandıkları izlenmiştir. Folliküllerin dejenerasyon sürecinde CDH2 ekspresyonu azalmakta ve granüloza hücreleri sonuçta birbirlerinden ayrılmaktadır. Makrigiannakis ve ark. CDH2 antikoru kullandıkları çalışmalarında bu ajanın yalnızca granüloza hücrelerinin agregasyonunu bozmadığını, aynı zamanda bu hücrelerde apoptozis olayını da arttırdığını göstermişlerdir (101,102).

2.7.27. B Hücreli Lenfoma-2 (BCL2)

BCL2, insan 18. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (18q21.3) (31). BCL2 proteini mitokondrinin hem iç hem de dış membranında lokalize olduğu gibi endoplazmik retikulumda (ER) nükleus membranı periferinde ve sitoplazmada az miktarda bulunabilir, genellikle membran yapıları ile işbirliği halindedir (31). Büyüme faktörü bağımlı hücre dizileri ile yapılan çalışmalarda BCL2 proteinin proliferasyon uyarımı olmaksızın hücrenin yaşamını sürdürmesini sağladığı belirlenmiştir. BCL2'nin reaktif oksijen türlerini direk inaktive ettiği veya bunların oluşumunu engellediği, ER'da Ca^{+2} geçişini düzenlediği ve nükleusda nüklear por kompleksi ile bağlantılı ve nüklear transportdan sorumlu olduğu sanılmaktadır (31). BCL2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik (apoptozisi indükleyici) diğeri ise anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) etkidir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini uyarırlar. Anti-apoptotikler ise; sitokrom C salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep BH1, BH2 ile BH3 ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn. BAX, BAK), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (BID, BAD, BIM) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğer hücresel yollarla ilişki kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "içsel" sitokrom C'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom C salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik

üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskılandığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik BCL2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: BCL2, BCL-XL, MCL-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: BAX, BCL-Xs, BAD, BIM, BAK, BID'dir (103,104).

2.7.28. BCL2 İlişkili X Proteini (BAX)

BCL2 ailesinin üyesi olan BAX geni insan 19. kromozomunun q kolunda yer almaktadır (19q13.3-q13.4) (34). BAX sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır (34). Burada küçük delikçikler "pore" oluşumunu indükler, böylece selektif iyon geçirgenliği kaybolarak, sonuçta sitokrom C ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (34). Bu güne kadar BCL2 ailesinin 15 geni tarif edilmiştir. BCL2 gen ailesinin diğer üyeleri, BCL2'den bağımsız olarak ya da BCL2'nin görevlerinin tamamlayıcısı olarak, apoptozis mekanizmalarını kontrol etmede rol almaktadırlar. BCL2 ailesinin üyeleri, homodimerik ve heterodimerik bağlantılarla haberleşmektedirler (105). Böylece bir hücrenin potansiyel bir apoptotik uyarıya duyarlılığı, o hücrede o andaki proapoptotik ve antiapoptotik BCL2 aile üyeleri ile saptanabilir. BAX, BCL2 aile üyesi olup hücrenin ölüm hassasiyetini arttırmaktadır. Bunu da muhtemelen heterodimer etkileşim aracılığı ile BCL2'nin hücrel yaşam üzerindeki etkisine karşı gelmekle gerçekleştirmektedir (105). BAX geni BCL2'nin tersi çalışan bir gendir. Kemoterapötik ajanlar ve radyasyonun neden olduğu DNA hasarı, p53 proteini veya p53 transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olur. p53 proteini; BAX gen ekspresyonunu artırırken, BCL2 gen ekspresyonunu azaltır. Sonuçta BCL2/BAX protein oranı azalır ve hücreler hücre-ölüm uyarımına daha duyarlı hale gelir (105). p53 tüm hücrelerde BCL2 ve BAX gen ekspresyonunun dominant düzenleyicisidir. Ayrıca, BCL2/BAX'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir (105). Ovarian steroidler, BCL2 ve BAX aktivitesinin up ve down düzenleyici aracılığı ile endometrial apoptozisi kontrol ederler (106). Çalışmalar, BCL2 protein aktivitesinin östrojen ile arttığı, progesteron ile baskılandığını göstermektedir (106). Kolon kanseri

ve T-hücreli akut lenfoblastik lösemili hastalarla yapılan çalışmalarda %50 oranında Bax geninde missense mutasyonlar tespit edilmiştir (106).

2.7.29. Serin/Treonin Protein Kinaz 15 (STK15)

STK15, mitotik sentrozomal bir protein kinazdır. İnsan 20. kromozomunun q kolunda yer alır (20q13.2-q13.3) (34). STK15' in tümör gelişimindeki temel rolü mitoz süresince kromozom yayılımını kontrol etmesidir. Northern ve Western Blot analizleri ile STK15 ekspresyon ürünlerinin testis ve proliferasyon kültür hücrelerinde (HeLa) yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (107). STK15' in aşırı ekspresyonunun memeli hücrelerinde sentromer amplifikasyonuna, kromozom kararsızlığına, onkogenik transformasyona ve p53'ün fonksiyon kaybına neden olduğu belirtilmiştir. İnsan kolon kanserlerinde STK15 geninin genetik varyasyonu tanımlanmıştır ve insan kanserlerinde önemli rol oynadığı düşünülür (107).

2.7.30. Mikrosom Bağlı Şaperon (Usta) Protein (STCH-60kD)

İnsan 21. kromozomunun q kolunda yer alan (21q11) 471 aa içeren bir gendir (34). Isı-şok 70 protein ailesinin bir üyesi olan STCH geninin mikrosom ile ilişkili olduğu bulunmuş ve çalışması yapılmış tüm hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir (108). Bu protein ailesinin üyeleri sitosolik ve salgı proteinlerinin işlenmesinde önemli rol oynarlar (108). Denatüre ya da hatalı katlanmış proteinlerin taşınmasında görev alırlar. STCH geni protein dizisinin HSP70 ve BiP ile benzer olduğu bulunmuştur. Ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi STCH proteini amino ucunda ATPaz bölgesi taşır. Mide kanserli hastalarla yapılan çalışmalarda STCH geninin apoptozis ile ilişkili olduğu bulunmuştur (108).

2.7.31. Makrofaj Göçünü İnhibe Eden Faktör (MIF)

MIF geni 22.kromozomun q11.23 bölgesine lokalize olmuştur (34). Northern Blot analiziyle, tüm insan dokularında MIF mRNA'sının tek bir boyutta (yaklaşık 800 nükleotid) olduğu gösterilmiştir (34). MIF oldukça küçük bir gen olup 189 bp ve 95 bp uzunluğunda 2 intronla ayrılmış 3 adet ekzondan meydana gelmiştir (34). İnsan MIF

geninin promotor bölgesinde iki önemli polimorfizm keşfedilmiştir. Bunlardan birisi -173G/C tek nükleotit polimorfizmi, diğeri de -794 bölgesinde bulunan CATT5-8 tekrarlarıdır (31). 5-CATT tekrarlı alleller, 6, 7 veya 8 tekrarlı allellere göre, in vitro bazal ve uyarılmış durumda azalmış MIF promotor aktivitesiyle ilişkilidir. Promotor bölge nükleotit analizleri, -173 C allelinin Aktivatör Protein-4 (AP-4) transkripsiyon faktörü için potansiyel bağlanma bölgesi yarattığını göstermiştir (109). Mikrobial toksinler, MIF'in immün hücreler ve makrofajlardaki TLR-4'ler tarafından salınımını arttıran güçlü uyaranlardır. MIF, endotoksin içeren partiküllerin ve Gr(-) bakterilerin adaptif immün sistem tarafından tanınmasını artırır (110). MIF promotorundaki -173G/C tek bazlık polimorfizm son yıllarda tanımlanmış ve MIF -173C allelinin, hem in vivo hem de in vitro koşullarda artmış MIF ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (111).

2.7.32. Apoptosis İndükleyici Faktör (AIF)

Diğer bir adıyla Programlanmış Hücre Ölümü 8 (PDCD8) olan bu gen X kromozomunun q kolunda yer almaktadır (Xq25-26) (34). Apoptotik sinyal alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir (112). Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom C ve AIF gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar ama bunların nükleusda yol açtığı morfoloji değişikliği apoptozisde tipik olarak görülen tipde değildir (112). Daha ziyade, net olarak seçilebilen sınırlardan, düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom C apoptozun en son basamağında görev alır (112). Sitokrom C bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (112).

2.7.33. Y Kromozomu Üzerinde Ubikinin Transkribe Eden Tetratrikopeptit Tekrar Geni (UTY)

İnsan Y kromozomunun q kolunda yer almaktadır (Yq11) (34). Subinterval 5C'de yer alan 20 ekzonlu bir gendir. TPR (tetratricopeptide repeat) motif bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin protein-protein etkileşimlerini düzenlediği düşünülmektedir (34). UTY geni Y kromozomunun AZF gen ailesi içinde AZFa bölgesinde bulunmaktadır. AZFa bölgesi 800 kb (kilobaz)'lık bir bölgedir ve subinterval 5B-50 arasında yer almaktadır (113). İçerdiği genler tek kopyalı korunmuş genlerdir. Tek kopyalı genler olması nedeniyle bu genlere ait nokta mutasyonlarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (113).

2.8. Nitrik Oksid Sentaz (NOS)

Nitrik oksit (NO), 1979'da siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak tanımlanmıştır (3). NO, hücre içi ve hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür (3). Birçok hücrel işlev; endotel, trombosit, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmekte ve birçok dokuda sentezlenmektedir. NO, endojen L-argininden NOS enzim sistemi tarafından sentezlenir ve işlev sonrasında hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür. Hemoglobin NO'yu inaktive eder. NO'nun en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) enziminin hem grubudur. Düz kas hücrelerine geçen NO, guanilat siklazı uyararak, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlar. Artan cGMP de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale getirir. Sekestrasyon ve hücre dışına çıkarılma yolu ile hücre içi kalsiyum azalır ve gevşeme sağlanır. cGMP'nin fizyolojik etkisi 3'5' bağının fosfodiesteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ile sonlandırılır. NOS'un nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir (iNOS veya NOS-2), endotelyal (eNOS veya NOS-3) olmak üzere 3 farklı formu vardır. Endotelyal ve nöronal sürekli bulunan, iNOS ise uyarıma bağlı olarak yapılan NOS'tur (3,4).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerdedir ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir (113). Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede

kontrol edilirken, iNOS uygun uyarı veya NFkB gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (113). Bu sentezi tetikleyen, NFkB'ye yanıt veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini aktive etmesidir (113). Enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100-1000 katı kadar daha fazla NO üretir. Ayrıca iNOS, kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için, aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak, iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların üstündedir. Bu durum, hücrel süperoksit anyon (O_2^-) varlığında ileri derecede toksik olan peroksinitrit molekülünün oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Peroksinitrit oluşumu; süperoksit ile süperoksit dismutaz (SOD) üretimi ve NO üretimi/harcanması arasındaki dengeye bağlıdır. Sonuç olarak, düşük konsantrasyondaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir (113,114).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Periferik kan yayması veya kemik iliği incelemesi ile birlikte RT-PCR (GeneXpert DX system) yöntemi kullanılarak Ph pozitif olan 48 hasta ile 15 sağlıklı kontrol grubundan oluşan toplam 63 bireyin MLPA yöntemi kullanılarak kromozomal düzensizliklerinin analizi yapıldı. Aynı zamanda KML tanısı konmuş 60 hasta ve 60 sağlıklı kontrol grubu ile NOS3 (-894/VNTR) gen polimorfizmleri araştırıldı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden yazılı bilgilendirilmiş hasta onayı ile EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Tüpler üzerine birey isim ve verilen kod yazılarak kayda geçirildi. Kayda geçirilen kanlar, hasta ve kontrol olmak üzere gruplandırılarak izolasyon aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.1. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınmış kandan DNA izolasyonu ticari kit ile yapıldı (115).

3.1.1. DNA İzolasyonunun Aşamaları

Çalışmamızda, kandan DNA izolasyonu Invitek (Katalog No: CA070023) ticari kiti ile yapılarak elde edilen DNA materyali daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Bu işlemde uygulanan prosedür;

1. Kandan 200 µl alınır (200 µl'den az kan materyali 200 µl'ye tamamlanır), 1.5 ml'lik tüpe aktarılıp üzerine 200 µl Lysis (eritme) Tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklenir. Vortex sonrasında 56°C'de 10 dakikalık inkübasyona bırakılır.
2. 400 µl Binding (bağlama) Tamponu pipetlenerek ilave edilir.
3. Hazırlanan karışım, filtrelelere sahip 2.0 ml'lik tüplere konur ve 1 dakikalık inkübasyon sonrasında da 2 dakika santrifüj edilir (12.000 rpm).
4. Filtreden geçen ve altta biriken karışım dökülerek, filtreler üzerine 500 µl Yıkama Tamponu I ilave edilir. 1 dakika santrifüj edilip filtreden geçen tampon dökülür.
5. Yıkama Tamponu II'den 800 µl filtre üzerine ilave edilip, tekrar 1 dakika santrifüj edilir. Tüpler santrifüj sonrasında tampondan arındırılır ve filtreler takılarak 4 dakika 15.000 rpm 'de santrifüj edilir.

6. Sonrasında filtreler yeni tüplere yerleştirilir, 200 µl Elution (ayırıştırma) Tamponu eklenir ve muhafaza edilmek üzere -20°C'ye alınır.

3.1.2. Kandan DNA İzolasyonu İşleminde Kullanılan Araç ve Kimyasallar

1. Invitek DNA izolasyon kiti Filtreli tüpler (Katalog No: CA070023)
 - Proteinaz K
 - Lysis (Lizis Solüsyonu)
 - Wash A buffer (Yıkama Tamponu I)
 - Wash B buffer (Yıkama Tamponu II)
 - Elution buffer (Elüsyon Tamponu)
2. Etanol (Sigma)
3. Mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 Scorex, Rainin, Eppendorf)
4. Steril sarı ve beyaz pipet uçları (Eppendorf)
5. 1.5 ml'lik Eppendorf tüpleri (Axygen)
6. Eppendorf tüp taşıyıcıları
7. Vorteks (Heidolph Reaks Top)
8. Santrifüj Aleti (Sigma 1-15)
9. Su banyosu (Nüve BM 302)
10. Steril lateks eldiven

3.2. MLPA Yöntemi ile Analizlerin Yapılması

3.2.1. Yöntem

Salsa MLPA (Mrc-Holland Salsa MLPA P005 LN:0308, P253 LN:0407) kitleri kullanılarak hedef DNA dizisi ile prob hibridizasyonu, ligasyon ve amplifikasyon gerçekleştirildi (Tablo 3.1, 3.2).

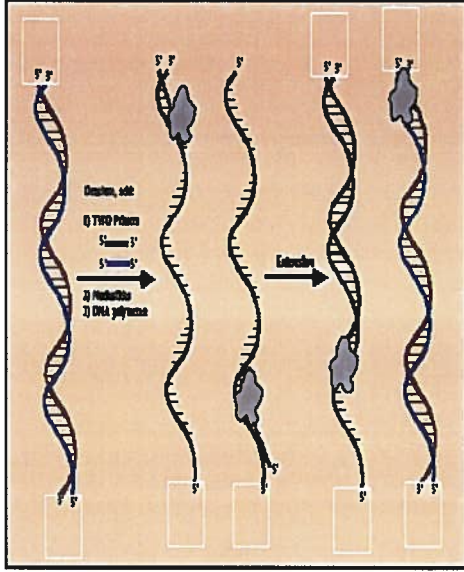
1. DNA örnekleri, toplam hacmi 5µl olacak biçimde distile su ile ya da izolasyon kitinin elution (DNA saklama) tamponu kullanılarak 20 ng'a sulandırılır. Örnek DNA 98°C'de ABI-9700 thermal cycler ile denature edilir. (Şekil 3.1 ve 3.2)
2. Denatüre olmuş örnek DNA üzerine 1.5 µl tuz solüsyonu (1.5 M KCl, 300 mM Tris-HCl pH8.5, 1 mM EDTA) ve 1.5 µl probe mix (TE içinde 1-4 fmol her bir sentetik oligonükleotid probdan ve M13 türevi oligonükleotid içeren) ilave edildikten sonra karışım tekrar 1 dakika 95°C'de denatüre edilir.
3. 60°C'de 16 saat inkübasyona bırakılır.

4. Oligonükleotidler karışımı, 1 ünite (U) Ligaz-65 enzimi içeren 40 µl dilüsyon tamponu (2.6 mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl pH8.5, %0.013 iyonik olmayan deterjanlar, 0.2 mM NAD) ile seyreltilir ve 54°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılır.
5. Ligaz enzimi 98°C'de 5 dakika ısıtılarak işlevsiz hale getirilir ve ligasyon ürünleri PCR ile amplifiye edilir. (Şekil 3.3)
6. Ligasyon ürününden PCR tüpüne 10 µl alınır ve üzerine 30 µl PCR tamponu eklenir.
7. Tampon eklenen ligasyon ürünleri 60°C'de iken; PCR primerleri (10 pmol), dNTPs (2.5 nmol) ve 2.5 ünite Taq polimeraz enzimi (Salsa polymerase, MRC-Holland) içeren karışımdan 10 µl eklenir.
8. Amplifikasyon; 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika olmak üzere 33 döngü ile gerçekleştirilir. Kullanılan primerlerin dizileri şu şekildedir; işaretli primerin dizisi 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' ve işaretli olmayan primerin dizisi 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'.
9. PCR ürünlerinden 2 µl alınarak, 1 µl GeneScan 500 ROX size standard (ROX™, LN:0801463) ve 12 µl Hi-Di Formamide (Hi-Di™, LN:0804710) bulunan plate içine eklenir.
10. Sonrasında 95°C'de 2 dakika denatüre edilen karışım buz üzerine (0°C) alınır ve ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer cihazına yüklenir.
11. ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer cihazında kapiler elektroforez ile yürütülen örnekler, GeneScan 500 ROX size standard (ROXTM, LN:0801463) ile ölçeklendirilir.

3.2.2. Analiz

Cihazda yürümüş örneklerin analizi GeneScan® yada GeneMapper® ile analiz edildikten sonra Microsoft Excel tabanlı bir program olan MRC Coffalyser programı ile hesaplanır. ; RENT2, CREM, HRAS, LMO2, RELA, EMS1, TNFRSF7, LRMP, BRCA2, RB1, ABCC4, CDH1, CRK, ERBB2, BRCA1, TIMP2, CDH2, BCL2, BAX, STK15/STK6, STCH, MIF, PDCD8, UTY, ERC1, CDKN1B, PKP2, COL2A1, MDM2, TBX5, NFKBIA, SPG3A, TGFB3, MOAP1 olmak üzere 34 genin bulundukları

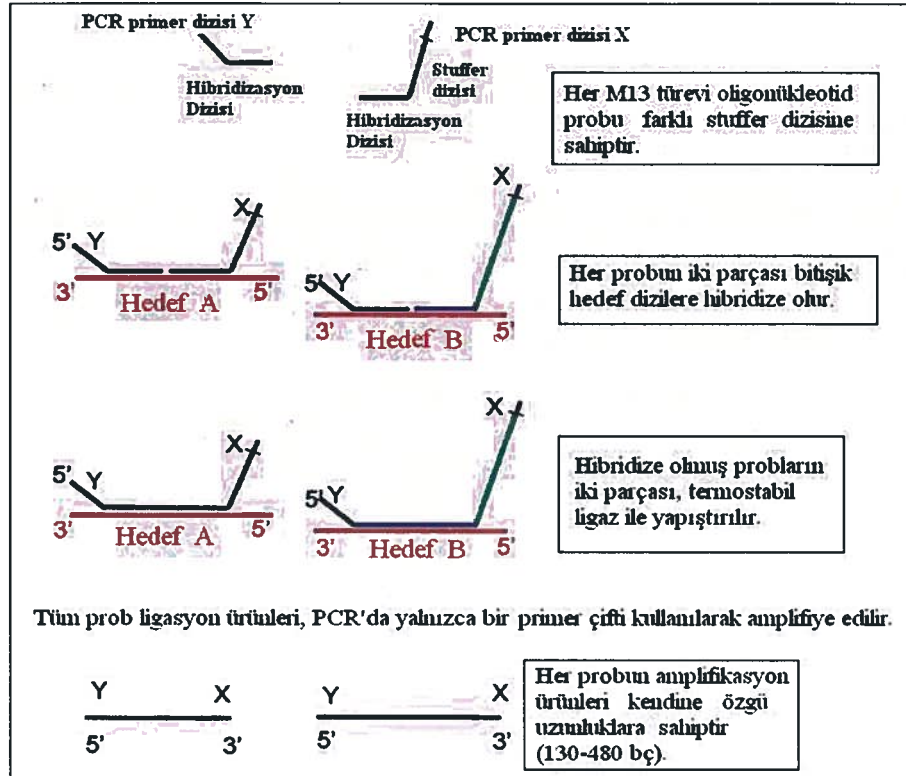
kromozom bölgelerindeki (10-22 nolu kromozomlar ve Cinsiyet Kromozomları) düzensizlikleri hedef dizinin kopya sayısının kontrol ile karşılaştırılmasıyla belirlenir (Tablo 3.1, 3.2). Ligasyonu gerçekleştirilmeyen (hedef dizi ile tam olarak birbirini karşılamadıkları için birleşmeyen) problemler, primer çiftlerinden ikisini birden taşımadıkları için amplifiye olamazlar.



Şekil 3.1. Denatürasyon ile ayrılan DNA çift ipliği (116).



Şekil 3.2. ABI 9700 thermal cycler cihazının görünümü (117)



Şekil 3.3. MLPA Reaksiyonları (118).

Çalışma sonuçlarının istatistiksel analizi için SPSS 11.5 paket programı içinde ilerlemesiz sağkalım ile klinik parametrelerin karşılaştırılmasında Log Rank Test, duplikasyonların klinik parametreler ile karşılaştırılmasında pearson Ki-Kare testi kullanılmıştır. Ayrıca Logistic regression modeli olan; Odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI) 'de hesaplandı. OR (95%CI) yaş ve cinsiyete göre ayarlandı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 3.1. Salsa MLPA P253 (LN:0407) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Gen	Kromozomdaki Yeri
12. Kromozom			
283	6682-L6260	ERC1	12p13.33 / 12-001.2
319	2256-L1741	CDKN1B	12p13.1 / 12-012.8
148	5391-L4788	PKP2	12p11 / 12-032.9
220	7405-L7052	COL2A1	12q13.1 / 12-046.7
337	2894-L2360	MDM2	12q15 / 12-067.5
184	5687-L5129	TBX5	12q24.21 / 12-113.3
14. Kromozom			
238	8503-L0061	NFKBIA	14q13.2 / 14-034.9
166	5279-L4660	SPG3A	14q22.1 / 14-050.1
160	5414-L4824	TGFB3	14q24/ 14-075.5
391	0947-L1595	MOAP1	14q32 / 14-092.7

Tablo 3.2. Salsa MLPA P005 (LN:0308) kiti ile taranan genlerin prob isimleri, nükleotid uzunlukları ve kromozomal yerleşimleri.

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Gen	Kromozomdaki Yeri
10. Kromozom			
463	0979-L0568	RENT2	10p14 / 10-012.0
136	0981-L0566	CREM	10p11.21 / 10-035.2
11. Kromozom			
337	0518-L0098	HRAS	11p15.5 / 11-001.1
436	0670-L0379	LMO2	11p13 / 11-034.6
175	0477-L0060	RELA	11q13 / 11-067.1
229	0434-L0020	EMS1	11q13/ 11-071.8
12. Kromozom			
445	0678-L0124	TNFRSF7	12p13 / 12-006.5
310	0495-L0070	LRMP	12p12.1/ 12-025.2

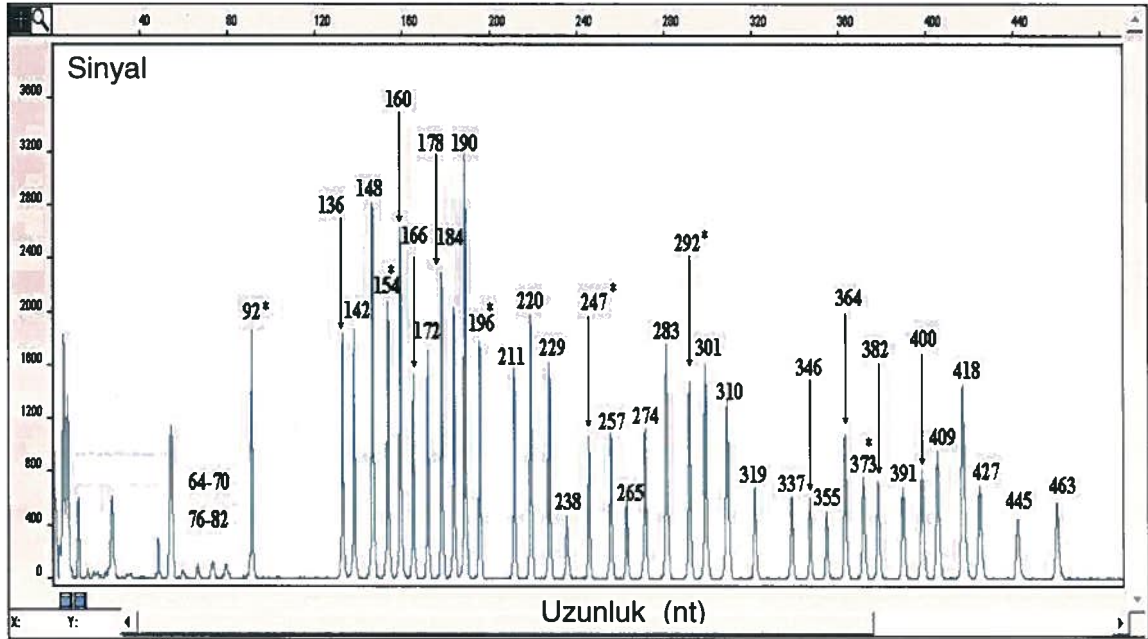
Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Gen	Kromozomdaki Yeri
13. Kromozom			
355	0452-L0360	BRCA2	13q12.3 / 13-026.9
160	0845-L0378	RB1	13q14.3 / 13-043.0
148	0798-L0316	ABCC4	13q32 / 13-090.2
16. Kromozom			
382	0443-L0022	CDH1	16q22.1 / 16-069.2
17. Kromozom			
391	0444-L0007	CRK	17p13.3 / 17-001.7
142	0675-L0146	ERBB2	17q21.1/ 17-039.9
283	0438-L0003	BRCA1	17q21/ 17-043.4
454	0597-L0016	TIMP2	17q25/ 17-080.1
18. Kromozom			
319	1017-L0322	CDH2	18q11.2/ 18-025.4
130	0838-L0587	BCL2	18q21.3 / 18-060.9
19. Kromozom			
301	0348-L0174	BAX	19q13.3 / 19-049.8
20. Kromozom			
400	0606-L0008	STK15/STK6	20q13 / 20-054.6
21. Kromozom			
364	1018-L0334	STCH	21q11 / 21-012.4
22. Kromozom			
292	0519-L0099	MIF	22q11.23 / 22-020.9
X. Kromozomu			
409	0820-L0338	PDCD8	Xq25 / X-126.1
Y. Kromozomu			
184	0851-L0464	UTY	Yq11.1 / Y-014.8

4. BULGULAR

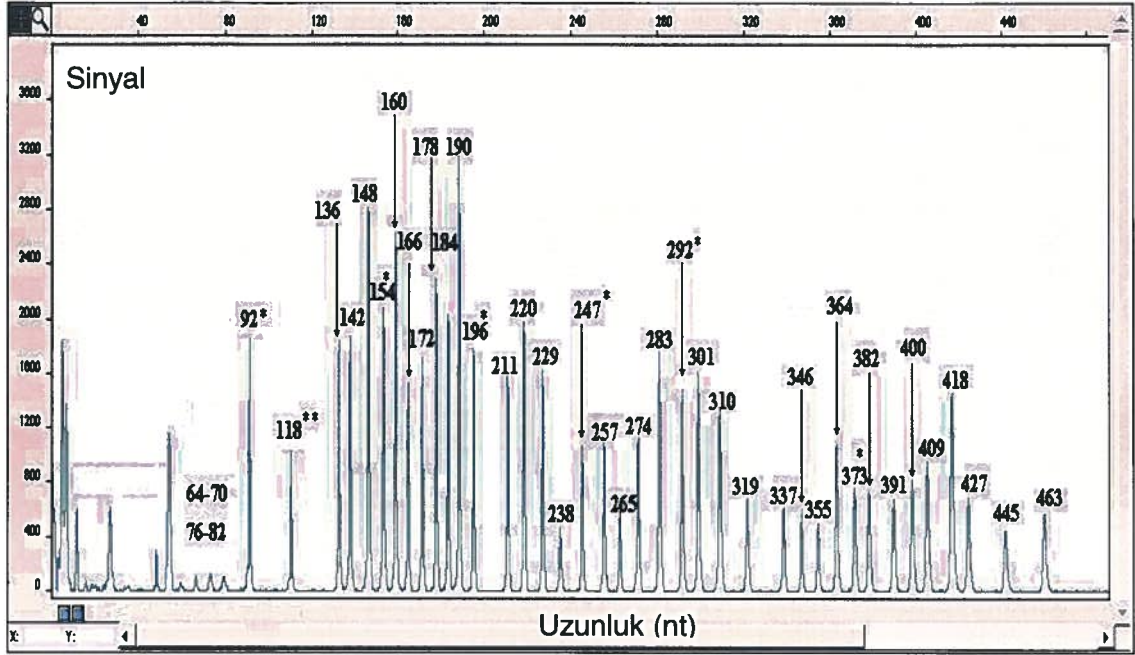
4.1. MLPA Analizi

Bu çalışmada 2005-2008 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji polikliniğinde Ph pozitif KML tanısı konmuş 48 hastanın ve kontrol olarak alınan 15 sağlıklı bireyin periferik kanlarından elde edilen DNA'ları analiz edilmiştir. Hastaların 40'ı kadın 8'i erkek olup medyan yaş 47.5'dur (19-74).

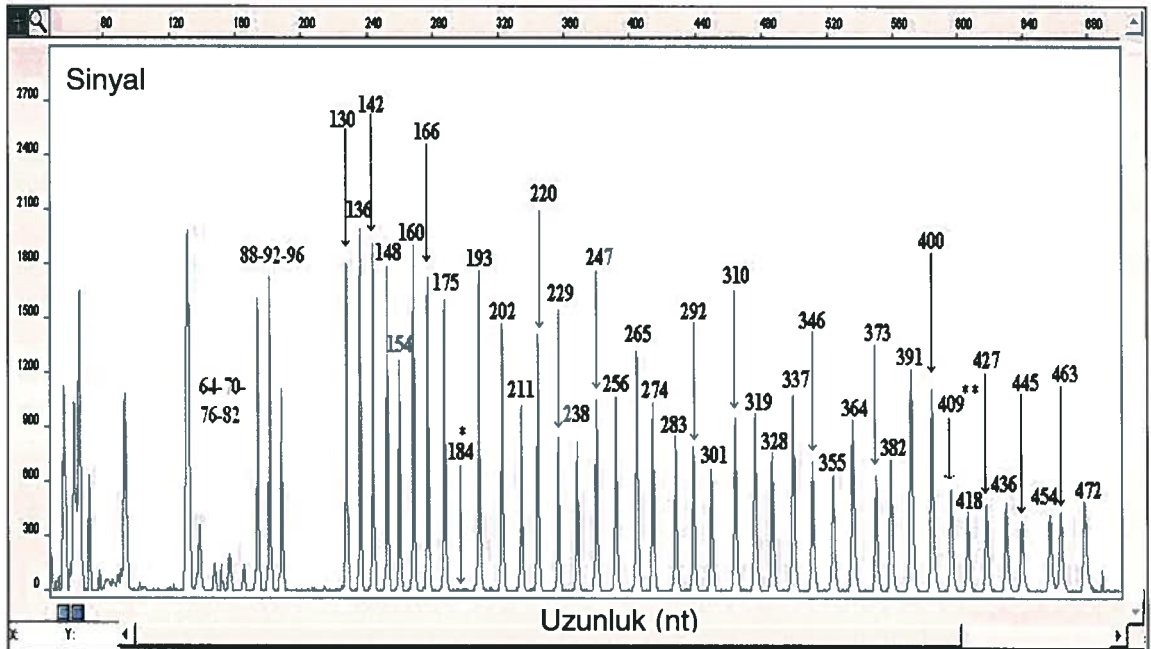
Sağlıklı bireylere ait DNA örneklerinin Salsa MLPA kiti ile amplifikasyonu sonrasında, elde edilen ürünlerin kapiler elektroforezde yürütülüp GeneScan® ya da GeneMapper® ile yapılan analizi, sinyal uzunlukları ile birlikte şekil 4.1-4.2 ve şekil 4.3-4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürütmesi. Sırası ile sinyal veren problemlerin uzunlukları; 64-70, 76-82, 92, 118, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 211, 220, 229, 238, 247, 257, 265, 274, 283, 292, 301, 310, 319, 337, 346, 355, 364, 373, 382, 391, 400, 409, 418, 427, 445, 463 nt'dir. 64-70 ve 76-82 nt aralıkları D ve Q aralığıdır. Bu aralıkta ligasyon olmadığında ve örnek DNA miktarı yetersiz olduğunda sinyal alınır. 92, 154, 196, 247, 292 ve 373 nt sentetik kontrol problemleri *. Diğer sinyaller genlere özgü olup çalıştığımız genlerin uzunlukları Tablo 3.1'de verilmiştir.

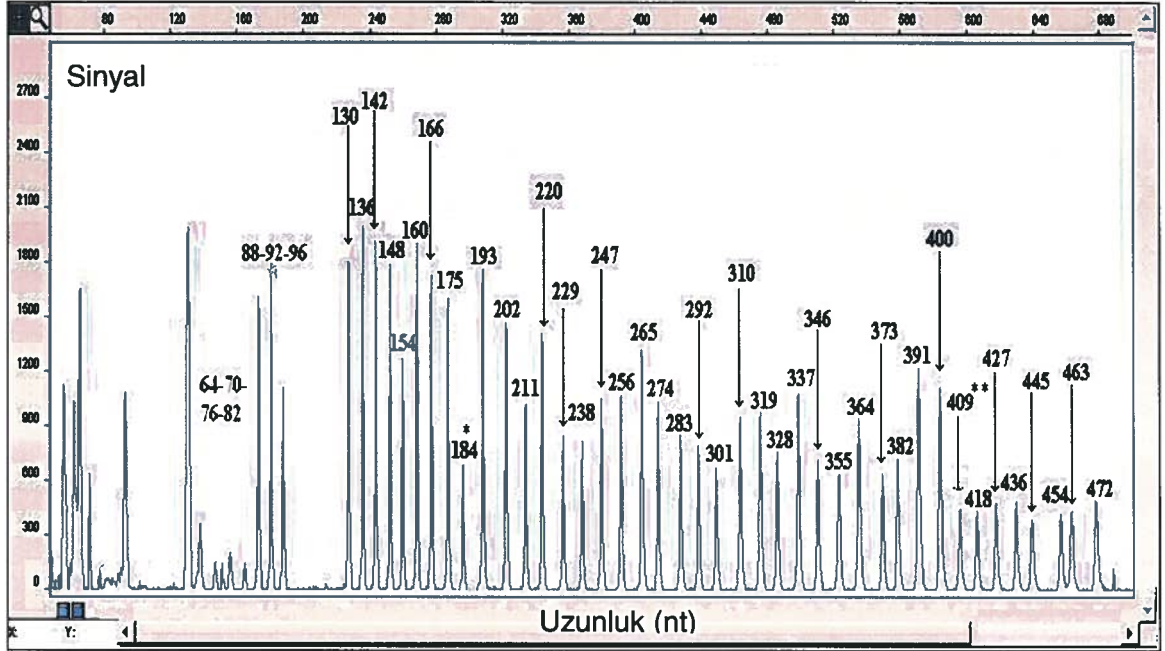


Şekil 4.2. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş 100 ng sağlıklı erkek insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. 92, 154, 196, 247, 292 ve 373 nt sentetik kontrol problemleridir *.118 nt Y kromozomuna özgü olup örnek bireyin cinsiyetini belirlemektedir **. Şekil 4.4'den farklı olarak, bireyin erkek olduğunu gösteren 118 nt'de sinyal alınmaktadır.



Şekil 4.3. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı kadın insan DNA'sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sırası ile sinyal veren problemlerin uzunlukları; 64-70-76-82, 88-92-96, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 175, 184, 193, 202, 211, 220, 229, 238, 247, 256, 265, 274, 283, 292, 301, 310, 319, 328, 337, 346, 355, 364, 373, 382, 391, 400, 409, 418, 427, 436, 445, 454, 463, 472 nt'dir. 64-70-76-82 nt aralığı Q aralığıdır. DNA miktarı yetersiz olduğunda yani 100 ng'ın altında DNA miktarı olduğunda sinyal alınır. 88-92-96 nt aralığı D aralığıdır ve 88 yada 96'nın düşük

sinyali denatürasyonun tam olmadığını gösterir. 184 nt Y kromozomunun UTY geninin Yq11.21 bölgesine özgüdür * ve 409 nt X kromozomunun PDCD8 geninin Xq25 bölgesine özgü olup örnek bireyin cinsiyetini belirlemektedir **. Diğer sinyaller genlere özgü olup çalıştığımız genlerin uzunlukları Tablo 3.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş 100 ng sağlıklı erkek insan DNA’sı amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. 184 nt Y kromozomunun UTY geninin Yq11.21 bölgesine özgüdür * ve 409 nt X kromozomunun PDCD8 geninin Xq25 bölgesine özgü olup örnek bireyin cinsiyetini belirlemektedir **. Şekil 4.5’ten farklı olarak 184 nt’de sinyal alınmaktadır. Ayrıca 409 nt’de alınan sinyal kadın bireylerdekinin ½ oranında alınmaktadır.

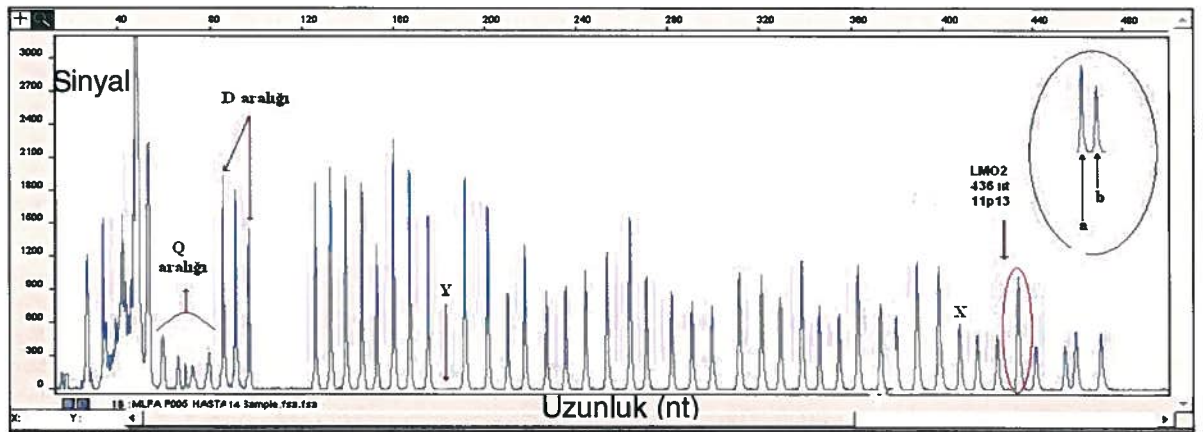
Ph (+) olan 48 hastanın MLPA yöntemi ile taranması ile 5 hastada (H1, H2, H3, H23 ve H33) NFKBI-I geninde duplikasyon, 1 hastada (H14) LMO2 geninde duplikasyon saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Duplikasyonu olan KML hastalarının klinik özellikleri

Hasta NoAdSoyad	Yaş	Cins	Sokal risk derecesi	Tanıda Hemoglobın (x109/L)	Tanıda Lökosit (x109/L)	MLPA ile saptanan duplikasyon lar	İmatinibe yanıt*	Olaysız sağkalım	Total sağkalım
1 (A.A.)	51	K	0,82 (orta)	12	81.3	NFKBI 1	Optimal	+82,1	+82,1 (sağ)
2 (A.B.)	67	K	1,13 (orta)	8.5	91	NFKBI 1	Optimal	+34,0	+34,0 (sağ)
3 (A.Y.)	46	K	0,98 (orta)	10	44	NFKBI 1	Optimal	+40,7	+40,7 (sağ)
4 (E.A.)	34	K	1,11 (orta)	8.6	88	NFKBI 1	Yanıtsız	12,9 bf	+26,8 (sağ)
5 (H.S.)	74	K	1,46 (yüksek)	10	43	NFKBI 1	Optimal	+20,1	+20,1 (sağ)
6 (N.T.)	53	K	1,02 (orta)	9.5	86	LMO2	Optimal	+59,7	+59,7 (sağ)

*ELN kriterlerine göre 18. ayda, MSY: majr sitogenetik yanıt bf:blastik faz

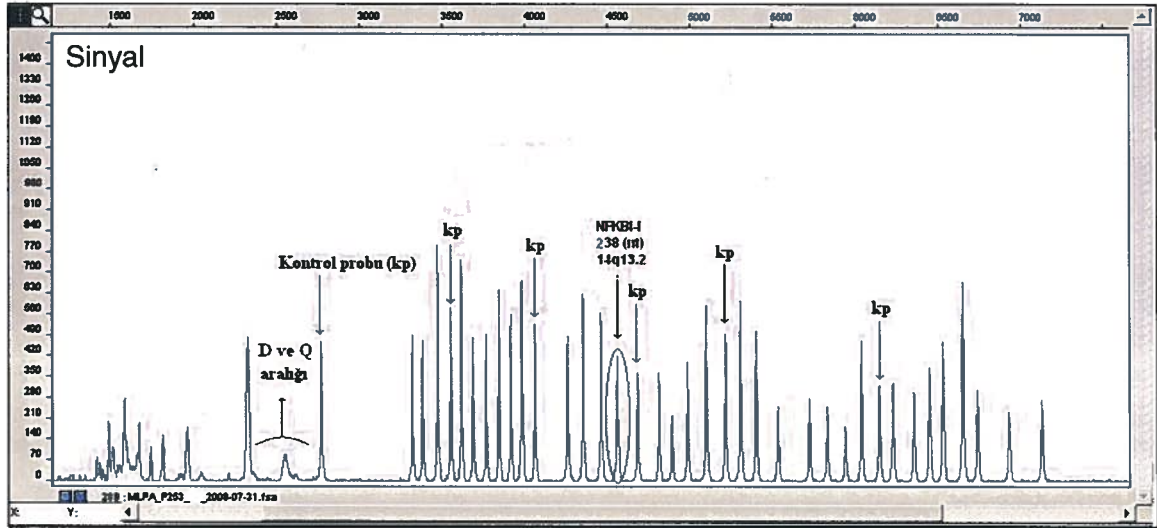
P005 kiti kullanılarak çalışılan H14 kodlu hastada saptanan LMO2 genindeki duplikasyon Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Kapiler elektroforezde, bu hastaya ait alınan sinyaller ile diğer hasta ve kontrol grubu bireylerinin sinyalleri oranlandığında yalnızca LMO2 genine özgü olan sinyalde farklılık saptanmıştır. Alınan sinyal diğer bireylerin ortalamasından 2 kat daha büyüktür. Bu sonuç bize bu bölgede bir duplikasyon olduğunu göstermektedir. Deneyler 2 kez tekrarlanarak sonuç doğrulanmıştır.



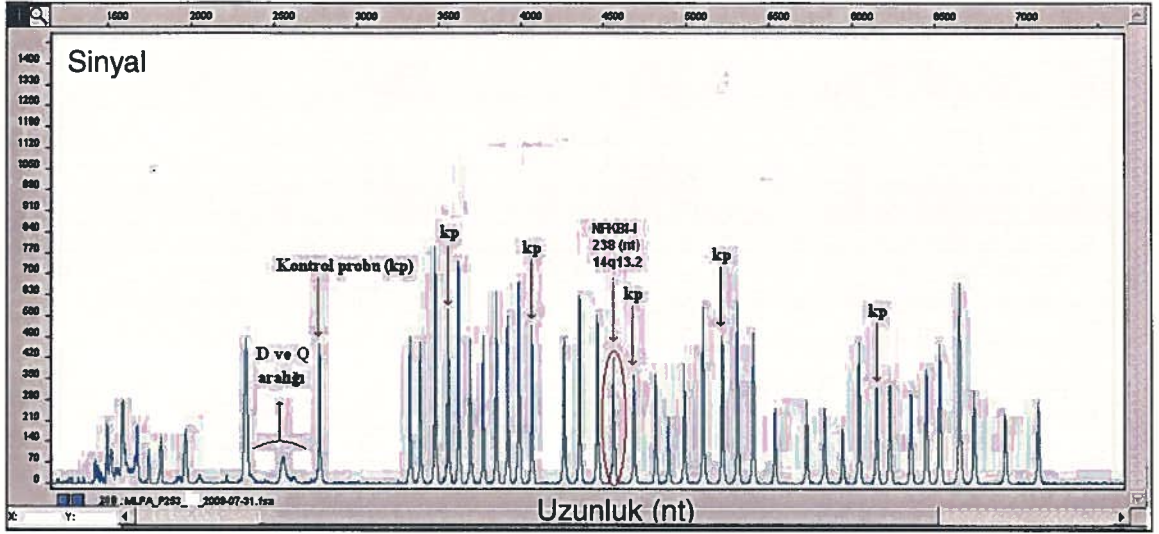
Şekil 4.5. P005 kiti (LN:0308) ile konmuş H14 kodlu hastaya ait DNA (85 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürütmesi. Sinyal sırası Şekil

11'deki uzunluk sırası ile aynıdır. Q aralığında alınan sinyaller 100 ng'ın biraz altındaki DNA oranı nedeniyle düşük gözlenmiştir. D aralığında alınan sinyaller ile denatürasyonun olduğu anlaşılmaktadır. 184 nt' deki sinyalin (Y) olmaması Y kromozomunun UTY geninin Yq11.21 bölgesinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır. 409 nt'deki sinyal (X) erkek bireylerdeki sinyale göre 2 kat büyüktür. 436 nt uzunlukta alınan sinyal LMO2 genine özgüdür. Bu bireyde bu uzunlukta alınan sinyal (a) diğer normal bireylerde alınan sinyallerin (b) 2 katı büyüklüğündedir.

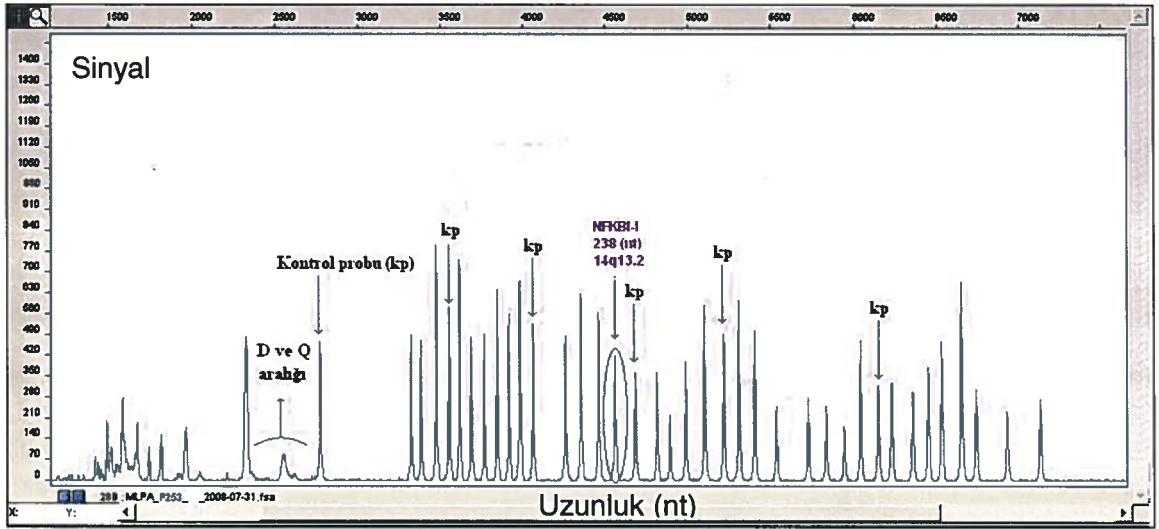
P253 kiti kullanılarak çalışılan H1, H2, H3, H23 ve H33 kodlu hastalara ait NFKBI-I genindeki duplikasyonlar Şekil 4.6-4.10 'de gösterilmektedir. Bu hastaların diğer hasta ve kontrollere ait eş uzunluktaki sinyallerin alanları ile hesaplanan ortalamadan daha büyük olması nedeniyle bu bölgede bir duplikasyon olduğu rapor edilmiştir. Deneyler 2 kez tekrarlanarak sonuç doğrulanmıştır.



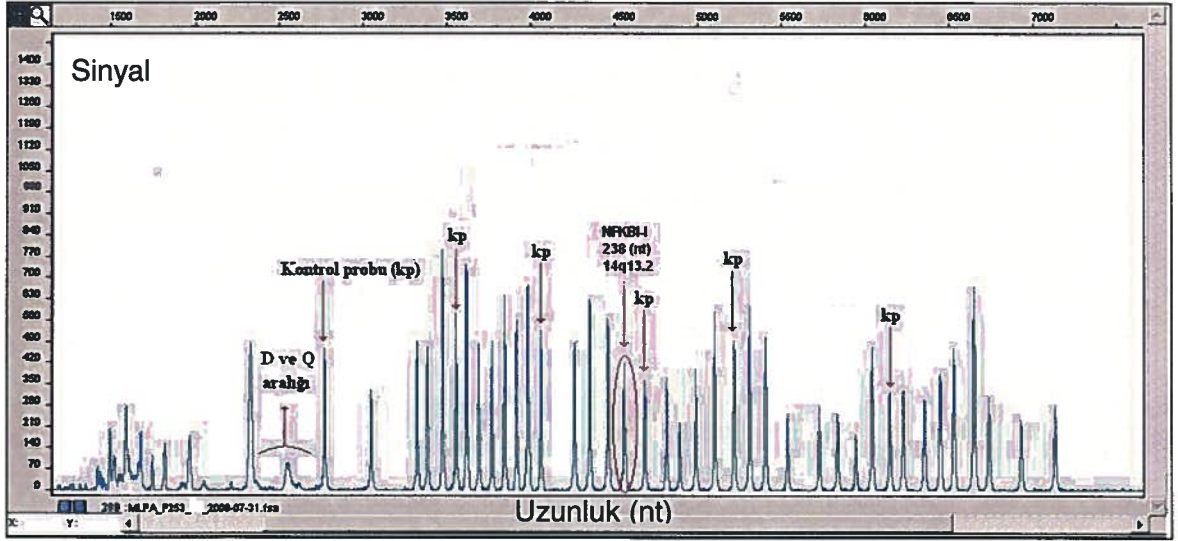
Şekil 4.6. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H1 kodlu hastaya ait DNA (91 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürütmesi. Sinyal sırası Şekil 9'daki uzunluk sırası ile aynıdır. D ve Q aralığında alınan sinyaller DNA'nın 100 ng'a yakın olmasından dolayı sinyaller çok düşük gözlenmiştir. 118 nt' deki sinyalin alınmaması Y kromozomunun DBY geninin Yq11.21 bölgesinin bulunmadığını göstermektedir. 238 nt uzunlukta alınan sinyal NFKBI-I genine özgüdür. Bu bireyde bu uzunlukta alınan sinyal diğer normal bireylerde alınan sinyallerin 2 katı büyüklüğündedir. 92, 154, 196, 247, 292 ve 373 nt uzunluklarında alınan sinyaller kontrol problemlerini işaret etmektedir.



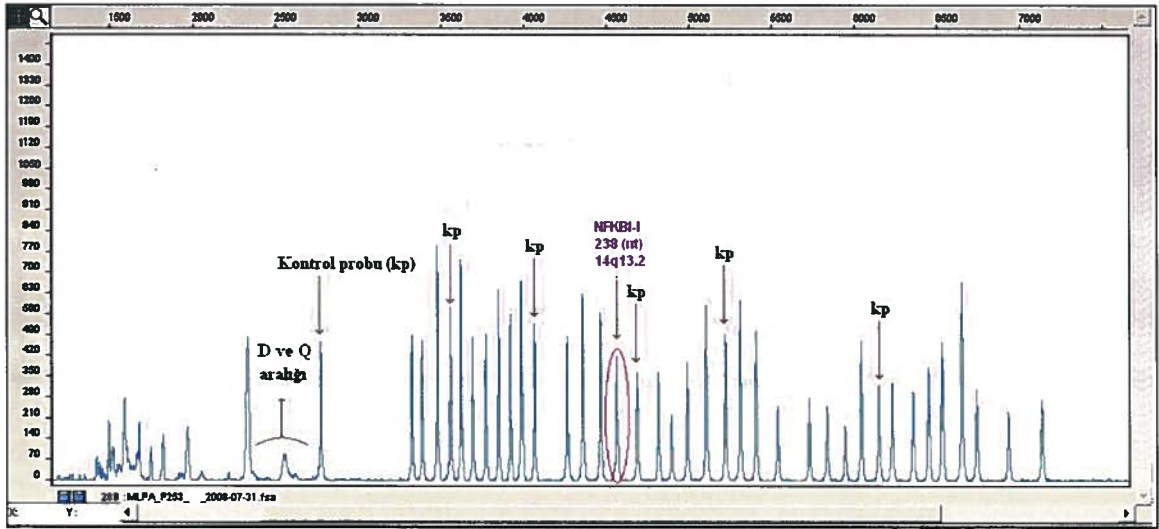
Şekil 4.7. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H2 kodlu hastaya ait DNA (75 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 3.1'deki uzunluk sırası ile aynıdır.



Şekil 4.8. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H3 kodlu hastaya ait DNA (88 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 3.1'deki uzunluk sırası ile aynıdır.



Şekil 4.9. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H23 kodlu hastaya ait DNA (80 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 3.1'deki uzunluk sırası ile aynıdır. 118 nt Y kromozomuna özgü olup örnek bireyin cinsiyetini belirlemektedir **.

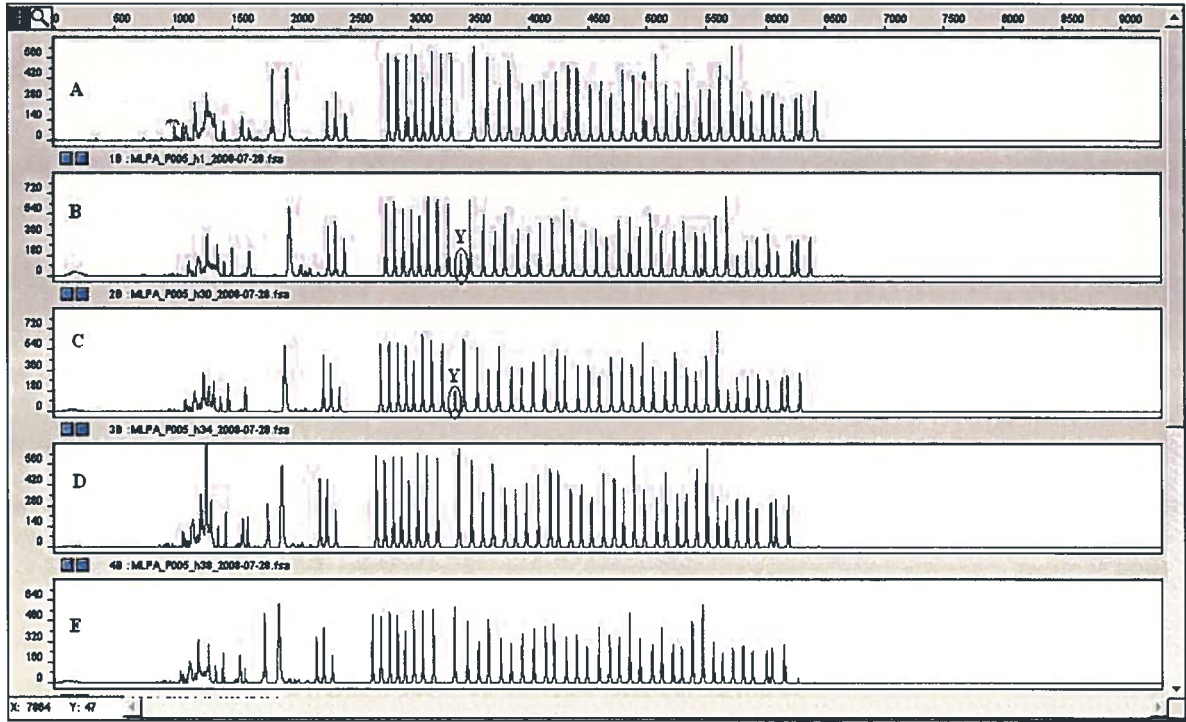


Şekil 4.10. P253 kiti (LN:0407) ile konmuş H33 kodlu hastaya ait DNA (80 ng kadın insan) amplifikasyonunun kapiler elektroforezde ROX internal size standart ile yürümesi. Sinyal sırası Şekil 3.1'deki uzunluk sırası ile aynıdır.

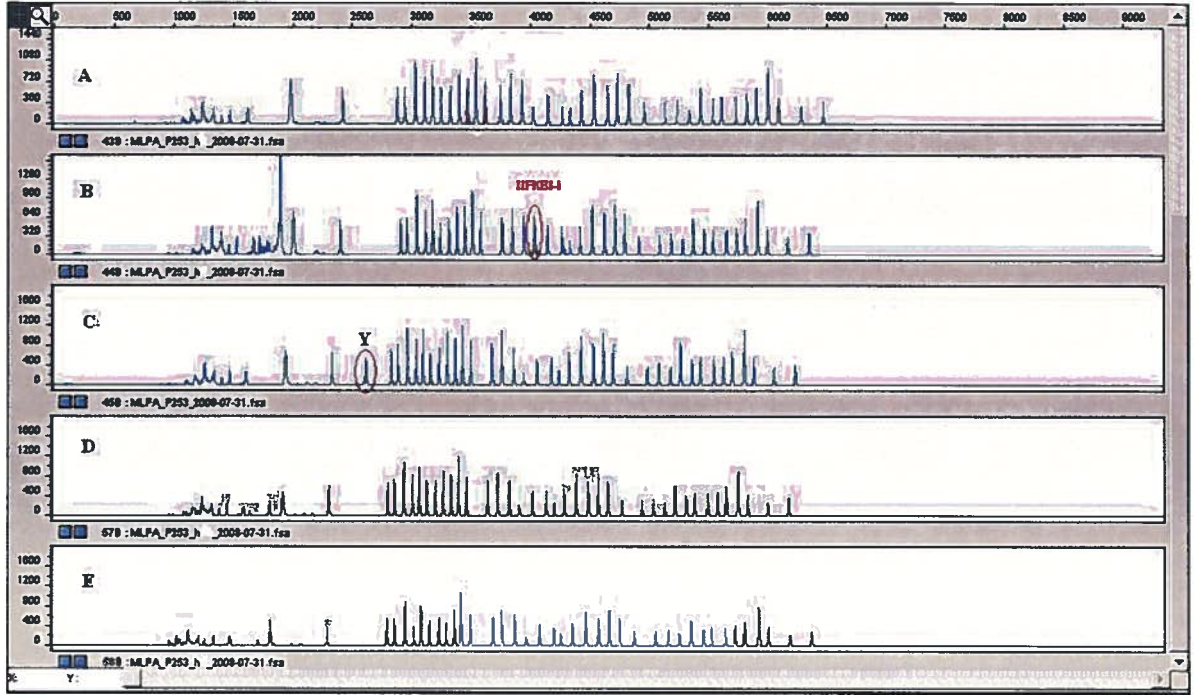
Her bireyde saptanan kontrol problemleri, diğer bireylerin eş uzunlukta alınan sinyallerindeki kontrol problemleri ile oranlanarak elde edilen oranların doğruluğu kontrol edilmektedir. Ayrıca bu problemlerde sinyal alınmadığında çalışma tekrarlanır. Çalışmamızda alınan kontrol problemlerine ait sinyallerin oranları ortalamaya yakın olarak saptanmıştır. Her hastanın çalışmasında, kontrol problemlerinin tamamı sinyal vermiştir.

Hibridizasyon, ligasyon ve PCR aşamaları, hasta ve kontrol olmak üzere belli sayıdaki bir grup ile çalışılmıştır. Analiz, aynı koşullarda ve eş zamanlı çalışılan gruplar içerisinde yapılmıştır. Kapiler elektroforez ile elde edilen hastalara ait sinyaller birlikte analiz edilmiştir (Şekil 4.11). Tüm sinyal alanları, diğer örneklerin aynı uzunluktaki sinyal alanları ile karşılaştırılarak oranlanır. Elde edilen ortalama değer üzerinden sinyal uzunluklarının diğerlerinden farkları ortaya konulur. Bu sayede duplikasyon ve delesyonlar gözlemlenebilir.

Sonuç olarak, MLPA yöntemi ile KML tanısı konmuş 48 hastanın 5'inde (H1, H2, H3, H23 ve H33) NFKBI-I geninde duplikasyon, 1'inde (H14) LMO2 geninde duplikasyon saptanmıştır. Diğer 32 gende ise hiçbir hastada herhangi bir kromozomal düzensizlik saptanmamıştır.



Şekil 4.11. P005 kiti (LN:0308) ile çalışılmış olan hastaların ve kontrol DNA'larının birlikte analizi. A,B,C,D ve E ekranlarında gözlenen sinyaller ortalamaya yakın değerdedirler ve herhangi bir anormallik saptanmamıştır. B ve C ekranında gözlenen sinyallere sahip bireylerde diğerlerinden farklı olarak Y sinyali alınır ve bu bireylerin cinsiyetlerinin erkek olduğunu gösterir.



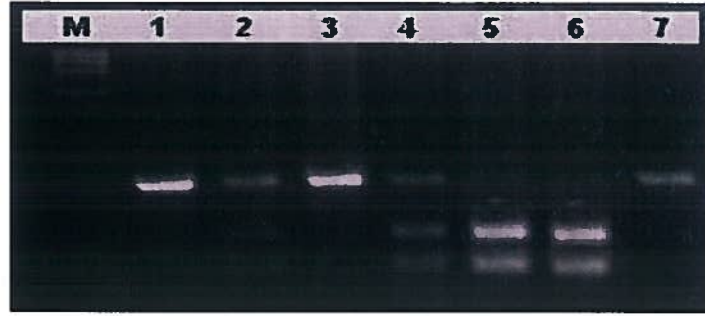
Şekil 4.12. P253 kiti (LN:0407) ile çalışılmış olan hastaların ve kontrol DNA'larının birlikte analizi. A,B,C,D ve E ekranlarında gözlenen sinyaller ortalamaya yakın değerdedirler ve herhangi bir anormallik saptanmamıştır. Yalnızca B ekranında gözlenen sinyallere sahip bireyde NFKB1-I geninde duplikasyon saptanmıştır. C ekranında gözlenen sinyallere sahip bireyde ise Y sinyali alınır ve bu sinyal bireyin cinsiyetinin erkek olduğunu gösterir. A, B, D ve E ekranlarındaki bireylerde bu sinyal alınmamıştır.

4.1.2 NOS3 (-894/ VNTR) Gen Polimorfizminin Analizi

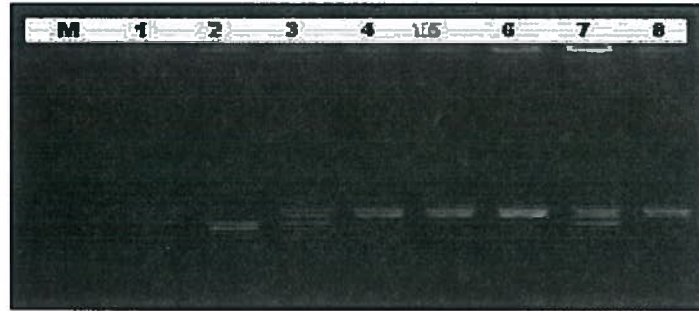
Tablo 4.2. KML tanısı konmuş Ph (+) olan 60 hasta ile 60 sağlıklı kontrol grubuna ait DNA'lar ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) koşulları

	Primer Dizisi	Annealing ve döngü sayısı
NOS3 (-894)	F:5'CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' R:5'AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'	58 °C- 35 döngü
NOS VNTR	F:5'AGGCCCTATGGTAGTGCCCTTT-3' R: 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'	58 °C- 35 döngü

Amplifiye olan PCR ürünlerine restriksiyon enzim analizi MboI enzimi ile yapıldı. Kesim su banyosunda 37°C'de 16 saat bekletildikten sonra %3 agaroz jel kullanılarak örnekler analiz edildi (Şekil 4.13, 4.14).



Şekil 4.13. NOS3 (-894) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü **M:**Marker, 1,3,7: GG genotipi (206 bç), 2-4: GT genotipi (206,119,87 bç) , 5-6: TT genotipi (119,87 bç).



Şekil 4.14. NOS3 (VNTR) gen polimorfizmine ait jel görüntüsü **M:**Marker, 4,5,6,8:AA genotipi, 1,3,7: AB genotipi, 2: BB genotipi (27 kb'lık tandem tekrarları).

4.1.3 Sonuçların Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması

Kronik faz KML tanısı konmuş 60 hastanın tanıda medyan yaş ortalaması 41 (20-74) olup 6 hasta 60 yaşın üzerindedir. Bu hastaların 23'ü erkek 37'si kadındır (%38.3/%61.7). Splenomegali 42 (%70) hastada ve $12 < \text{g/dL}$ altında hemoglobin (Hg) olan hasta sayısı 42 (%70), lökosit değeri $50 \times 10^9/\text{L}$ ' nin üzerinde olan hasta sayısı 38 (%63.3) ve trombosit değeri $450 \times 10^9/\text{L}$ üzerinde olan hasta sayısı 28'dir (%40). Sokol risk sınıflandırmasına göre düşük riskli hasta sayısı 10 (%16.7), orta riskli hasta sayısı 28 (%46.7) ve yüksek riskli hasta sayısı 22'dir (%36.6). Hastaların 50'sinde (%83.3) tedaviye Imatinib 400 mg/d ile başlandı, 10'unda ise tedaviye önce Interferon- α ile sonrasında imatinib 400 mg/d ile devam edilmiştir. ELN kriterlerine göre 18. ayda İmatinib tedavisine yanıt değerlendirilmesi yapıldığında hastaların 40'ında (%66.6) hedef (optimal) yanıt, 13'ünde (%21.7) yetersiz (suboptimal) yanıt ve 7'si (11.7) ise tedaviye yanıtızsızdır. Toplam mortalite 2 hastada görüldü. Progresyon gözlenen 10 hastanın 2'sinde blastik faza ilerleme, 8'inde major sitogenetik yanıtın kaybı görüldü. Filadelfiya kromozomuna ek kromozomal anomalisi olan 4 (%6.7) hastanın 2'sinde Trisomy 8, 1 hastada monosmy 7 ve 1 hastada Trisomy 21 saptanmıştır. Tanıdan

itibaren medyan izlem süresi 49.3 ay (6.1-168.4), imatinib kullanım süresi 39.5 (5.2-103.4) aydır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemili Hastaların Tanıda Klinik Özellikleri

	n (%)
Hasta sayısı	60
Yaş (medyan)	41 (20-74)*
Yaş ≥ 60	6 (10)
Erkek/kadın	23 /37 (38.3/61.7)
Splenomegaly	42 (70)
Hemoglobin 12<g/dL	42 (70)
Leukocytes > 50 x 10 ⁹ /L	38 (63.3)
Trombosit > 450 x 10 ⁹ /L	28 (40)
Sokal risk sınıflandırması	
Düşük risk	10 (16.7)
Orta risk	28 (46.7)
Yüksek risk	22 (36.6)
Başlangıç tedavi	
Imatinib 400 mg/d	50 (83.3)
Interferon-α→imatinib	10 (16.7)
400 mg/d	
ELN kriterine yanıt	
Hedef yanıt (optimal)	40 (66.6)
Yetersizyanıt (suboptimal)	13 (21.7)
Yanıtsız	7 (11.7)
Toplam Mortalite	2 (3.3)
Event ^{&}	12 (20)
Phe kromozomu +	4 (6.7)
kromozomal anomalili	Trisomy 8 [2], monosmy 7, Trisomy
hastalar	21
Medyan izlem süresi (ay)	49.3 (6.1-168.4)*
İmatinib kullanım süresi (ay)	39.5 (5.2-103.4)*

Çalışmaya alınan 60 hastada 7 yıllık toplam sağkalım %96, 7 yıllık olaysız sağkalım %73'dür. 7 yıllık total sağkalımı etkileyen faktörlerden cinsiyet, yaş, sokal risk sınıflandırması, splenomegali, hemoglobin, trombosit, başlangıç tedavisi, NOS3 (-894/VNTR) gen polimorfizmleri ve dublikasyonlar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak

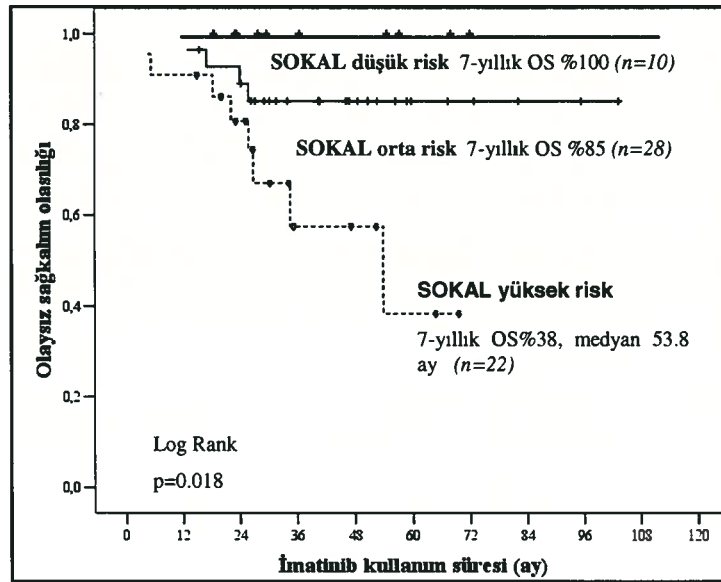
bir anlam saptanmamıştır. 7 yıllık olaysız sağkalım 60 yaş üzeri 6 hastada % 40 (medyan: 25.8 ay), 60 yaş altı 54 hastada %77'dir (p= 0.023). Sokal risk sınıflamasına göre düşük riskli 10 hastada 7 yıllık olaysız sağkalım %100, orta riskli 28 hastada %85, yüksek riskli 22 hastada ise %38'dir (p=0.018). Splenomegali saptanan 42 hastada %61, splenomegali saptanmayan 18 hastada %100'dür (p= 0.014). NOS3 (-894) gen polimorfizme göre 7 yıllık olaysız sağkalım GG genotipi olan 32 hastada %52, GT genotipi olan 19 hastada %95, TT genotipi olan 9 hastada %100'dür (p=0.008). Diğer prognostik faktörler olan cinsiyet, hemoglobin, lökosit, trombosit, başlangıç tedavisi ve dublikasyonlar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kronik Faz Kronik Myelositer Lösemili Hastalarda Prognostik Faktörler ile NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR Gen Polimorfizminin Sağkalım Üzerine Etkisi (Tek değişkenli analiz/ Logrank test)

		n	7-yıl TY %	Log Rank p	7-yıl OS % (medyan- ay)	Log Rank p
Hasta Sayısı		60	96		73	
Cinsiyet	<i>Kadın</i>	37	97		71	
	<i>Erkek</i>	23	96	0.705	75	0.708
Yaş	<i><60</i>	54	96		77	
	<i>≥60</i>	6	100	0.643	40 (25.8)	0.023
Sokal risk sınıflandırması	<i>Düşük risk</i>	10	100		100	
	<i>Orta risk</i>	28	100	0.148	85	0.018
	<i>Yüksek risk</i>	22	90		38 (53.8)	
	<i>Düşük-Orta/Yüksek</i>	38/22	100/90	0.050	87/38 (53.8)	0.007
Splenomegali	<i>Evet</i>	42	95		61	
	<i>Hayır</i>	18	100	0.353	100	0.014
Hemoglobin (g/dL)	<i><12</i>	42	95		60	
	<i>≥12</i>	18	100	0.353	87	0.144
Lökosit (x109/L)	<i><50</i>	22	100		89	
	<i>≥50</i>	38	94	0.276	61	0.087
Trombosit (x109/L)	<i><450</i>	32	97		82	
	<i>≥450</i>	28	96	0.930	65	0.392
Başlangıç tedavi	<i>Imatinib</i>	50	96		73	
	<i>Interferon-α→imatinib</i>	10	100	0.525	77	0.685

NOS3 (-894)	GG	32	93		52	
	GT	19	100		95	
	TT	9	100	0.370	100	0.008
	GG/GT,TT	32/28	93/100	0.166	52	0.002
NOS3 VNTR	AA	37	100		71	
	AB	15	93		86	
	BB	8	88	0.118	75	0.503
Duplikasyon (5 NFKB1, 1 LMO2)	Evet	6	100		83	
	Hayır	39	97	0.717	66	0.725

Sokol: hasta yaşı, dalak büyüklüğü, periferik kanda blast yüzdesi ve trombosit sayısı TS: Total yaşam OS: Olaysız sağkalım



Şekil 4.15. İmatinib kullanım süresi ile sağkalım olasılığı arasındaki ilişki (7 yıllık sokal risk sınıflandırması)

Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 7 yıllık olaysız sağkalımı etkileyen ve p değeri < 0,010 bulunan yaş, sokal risk sınıflaması, splenomegali, lökositoz (>50000) ve NOS3 gen polimorfizmi çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward) parametrelerin tümü anlamını kaybetmiş fakat NOS3 (-894) p= 0,084 olarak değerlendirmeye alınan diğer prognostik parametrelerin içinde anlama en yakın olanıdır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kronik faz KML hastalarında çok değişkenli analiz (Cox proportional hazard model backward)

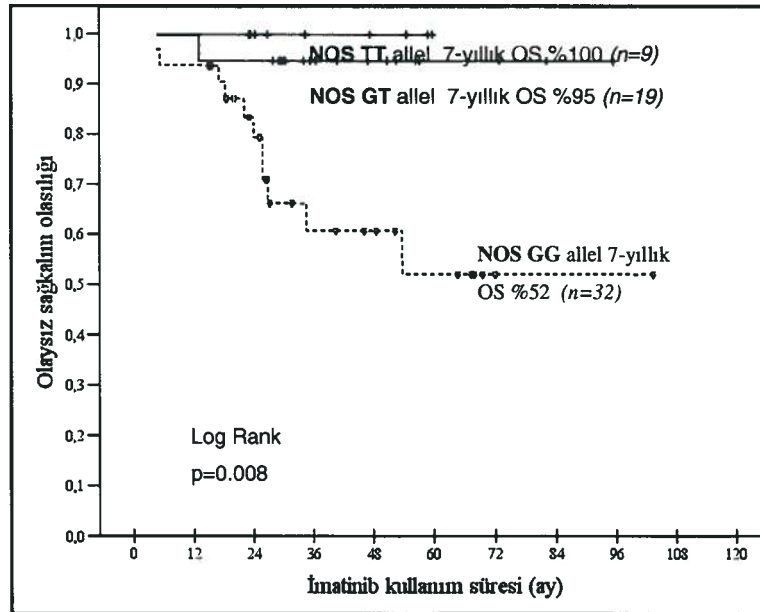
Covariable	EFS		
	Exp (B) Relative risk	95 % Confidence interval	Significance
Yaş			
<60/≥60	2,008	0.476-8.479	0.343
Sokal risk sınıflandırması (Tanıda)			
Düşük-Orta/Yüksek	0.584	0.169-2.014	0.395
Splenomegaly			
Evet/Hayır			0.964
Leukositoz (x109/L)			
<50/≥50	0.737	0.152-3.576	0.705
NOS (-894)			
GG/GT,TT	0.154	0.018-1.288	0.084

Hardy-Weinberg Eşitsizliği (HWE) NOS3 (-894) ile NOS3 VNTR analizinde kontrol ve KML hasta grubu karşılaştırıldığında hasta grubunda HWE'den sapma gözlenirken kontrol grubunda sapmanın olmadığı belirlendi (Tablo 4.6)

Tablo 4.6. KML hasta ve kontrol grubu arasındaki NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR gen polimorfizmleri sıklığı.

Genotip		KML		Sağlıklı Kontrol		HWE	OR	95% CI	p
		n ^a	(%)	n ^b	(%)				
NOS VNTR	AA	37	(61.7)	43	(71.7)	KML p: 0.007	0.218*	0.043-1.098*	0.065*
	AB	15	(25)	15	(25)	Kontrol p: 0.630	0.244*	0.044-1.362*	0.108*
	BB	8	(13.3)	2	(3.3)		0.225*	0.045-1.014*	0.068*
NOS (-894)	GG	32	(53.3)	39	(65)	KML p: 0.049	0.096*	0.011-0.801*	0.030*
	GT	19	(31.7)	20	(33.3)	Kontrol p: 0.380	1.134*	0.523-2.459*	0.750*
	TT	9	(15)	1	(1.7)		0.099*	0.012-0.814*	0.031*

^an=60, ^bn=60, *:OR (95%CI) &Fisher's Exact Test. HWE:Hardy-Weinberg Eşitliği



Şekil 4.16. İmatinib kullanım süresi ile sağkalım olasılığı arasındaki ilişki.

NOS3 (-894) geninde GT/TT ve GG alel dağılımları ile prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, splenomegali, hemogloblin, lökositöz, trombosit ve dublikasyon değerleri arasında sıklık bakımından bir anlam yoktur. NOS3 GT/TT grubunda Sokal risk sınıflandırmasına göre düşük riskli hasta oranı %70, orta riskli %57.1, yüksek riskli %22.7 olup GG grubunda ise düşük riskli hasta oranı %30, orta riskli %75 ve yüksek riskli hasta oranı %72.7'dir ($p=0.007$). Sonuç olarak NOS3 (-894) geninde GT/TT ve GG alel dağılımları arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. NOS3 GT/TT grubunda ELN kriterlerine göre optimal yanıt oranı %57.5, yetersiz yanıt oranı %23.1, yanıtsız hasta oranı %28.6 olup GG grubunda ise optimal yanıt oranı %42.5, yetersiz yanıt oranı %76.9, yanıtsız olanı ise %71.4'dür ($p=0.057$). Sonuç olarak ELN kriterlerine göre yapılan yanıt değerlendirmesi ile NOS3 (-894) geninde GT/TT ve GG alel dağılımları arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. NOS3 (-894) ve NOS3 VNTR gen polimorfizmleri ile klinik parametrelerin karşılaştırılması

		n	NOS3 GT/TT alleli	NOS3 GG alleli	Exp (B) *	95% Interval *	p- değeri *
Hastalar		60	28	31			
Cinsiyet	Kadın	37	18	19			
	Erkek	23	10	13	1.23 2	0.4323.507	0.793
Yaş	<60	54	27	27			
	≥60	6	1	5	0.20 0	0.022-1.827	0.201
Sokal risk sınıflandırması	Düşük risk	10	7 (70)	3 (30)			
	Orta risk	28	16 (57.1)	12 (75)			
	Yüksek risk	22	5 (22.7)	17 (72.7)			0.005
	Düşük-orta/yüksek	38/22	23/5 (60.5/22.7)	15/17 (39.5/72.7)	5.21 3	1.585-17.146	0.007
ELN kriterine göre yanıt-18mo	Hedef yanıt (optimal)	40	23 (57.5)	17 (42.5)			
	Yetersiz yanıt (suboptimal)	13	3 (23.1)	10 (76.9)			
	Yanıtsız (failure)	7	2 (28.6)	5 (71.4)			0.057
	Optimal/ suboptimal, failure	40/20	23/5 (57.5/25)	1/15 (2.5/75)	0.24 6	0.075-0.810	0.027
Splenomegaly	Evet	42	16	26			
	Hayır	18	12	6	3.250	1.018-10.379	0.052
Hemoglobin (g/dL)	<12	42	20	22			
	≥12	18	8	10	0.880	0.290-12.669	1.000
Leukocytes (x10⁹/L)	<50	22	11	11			
	≥50	38	17	21	1.235	0.431-3.538	0.791
Platelets (x10⁹/L)	<450	32	15	17			
	≥450	28	13	15	1.018	0.368-2.814	1.000
Duplikasyon (5 NFKB1, 1 LMO2)	Evet	6	5	1			
	Hayır	39	17	25	0.136	0.015-1.269	0.081

Sokal: patient's age, spleen size, percentage of blood blasts and platelet, * Medyan (yıl), OS: overall survival; EFS: İlerlemesiz sağkalım *Fisher's Exact Test

Duplikasyon (+) ve (-) olan gruplar ile prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, sokal risk sınıflandırması, ELN kriterine yanıt, splenomegali, hemoglobin, lökosit, trombosit, NOS3 (-894) gen polimorfizmi değerlendirildiğinde sıklık bakımından istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Duplikasyon (+) ve (-) olan hastaların klinik parametrelerle karşılaştırılması.

		n	Dup (-)	Dup (+)	Exp (B) *	95% Interval*	P değeri*
Hastalar		48	42	6			
Cinsiyet	Kadın	31	26	5			
	Erkek	17	16	1	0.325	0.035-3.039	0.402
Yaş	<60	42	36	6			
	≥60	6	6	0	1.167	1.031-1.320	1.000
Sokal risk sınıflandırması- tanıda	Düşük	8	8	0			
	Orta	21	16	5			
	Yüksek	19	18	1			0.105
	Düşük-Orta/Yüksek	29/19	24/18	5/1	0.267	0.029-2.486	0.381
ELN kriterlerine yanıt (18 ay)	Hedef Yanıt	32	27	5			
	Yetersiz Yanıt	10	10	0			
	Yanıtsız	6	5	1			0.405
	Hedef Yanıt/Yetersizyanıt,Yanıtsız	32/16	15/5	27/1	2.778	0.296-26.037	0.648
Splenomegaly	Yes	33	31	2			
	No	15	11	4	0.177	0.028-1.108	0.067
Hemoglobin (g/dL)	<12	35	30	5			
	≥12	13	12	1	2.000	0.211-18.986	1.000
Leukocytes (x10⁹/L)	<50	16	14	2			
	≥50	32	28	4	1.000	0.163-6.138	1.000
Platelets (x10⁹/L)	<450	25	21	2			
	≥450	23	21	4	2.000	0.330-12.123	0.668
NOS (-894)	GG	26	25	1			
	GT,TT	22	17	5	0.136	0.015-1.269	0.081

Sokal: patient's age, spleen size, percentage of blood blasts and platelet, * Medyan (yıl), OS: overall survival; EFS: ilerlemesiz sağkalım, dup: duplikasyon

Tablo 4.9. KML’de prognozu belirlemede kullanılan risk skoru (118)

Sokol indeksi:

$SI = EXP [0.0116 (yaş-43.4) + 0.0345 (dalak\ büyüklüğü* - 7.51) + 0.188 (trombosit\ sayısı/700)^2 - 0.563 + 0.0887 (periferik\ blast\ yüzdesi - 2.10)]$

*kot altı uzunluk (cm)

Yeni skorlama sistemi (Hasford)(14):

Yeni skor: $(0.6666 \times yaş [eğer\ yaş < 50, 0; aksi\ halde\ 1] + 0.420 \times dalak\ büyüklüğü [cm\ kot\ altı] + 0.0584 \times blast [\%] + 0.0413 \times eozinofil [\%] + 0.2039 \times bazofil\ eğer\ bazofil < 3\%, 0; aksi\ halde\ 1] + 1.0956 \times trombosit\ sayısı [eğer\ trombositler < 1500 \times 10^9/L, 0; aksi\ halde\ 1] \times 1000$ Düşük risk <780; Orta risk 781 – 1479; Yüksek risk ≥ 1480

5. TARTIŞMA

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) yöntemi ile 13, 18, 21, X ve Y kromozomları analizi, anöploidilerinin analizi, büyük kromozomal delesyon ve duplikasyonlarının analizi, kanser dokusunda gen kazanç ve kayıplarının analizi, tek ekzon dublikasyon ve delesyonlarının analizi, mRNA'ların miktarının belirlenmesi, tümör süpresör genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyonunun incelenmesi gibi uygulamalarda kullanılabilmektedir (25). Bu yöntemin, 45 farklı DNA bölgesindeki kopya sayısı değişikliklerini tek reaksiyonda araştırabilen PCR temelli olması, sadece 20 ng DNA gerektirmesi, tek nükleotid farklılığı gösteren DNA dizilerini bile ayırt edebilir olması, sadece bir termocycler ile bir kapiller elektroforezin çalışma için yeterli olması, birçok uygulama için benzer protokole sahip olması, 24 saatte çok sayıda hasta çalışılabilmesi gibi özellikleriyle diğer yöntemlere oranla birçok avantajı vardır. Literatürde MLPA yöntemiyle çalışılan 30.06.2009 itibariyle 522'nin üzerinde yayın mevcuttur. Lösemide 8 yayın olmakla beraber Kronik Myelositer Lösemi hastalarıyla yapılan bir çalışma bulunmamaktadır (119).

NFKB; hücre büyümesi, diferansiyasyonu, apoptozisin regülasyonu ve neoplastik transformasyondan sorumlu çok sayıda gen ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür (80). NFKB'nin lenfomaya dirençte önemli katkısı vardır ve anti-apoptozis ile ilgili gen ekspresyonunu aktive ettiğinden tümör gelişimi ile progresyonunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (120). NFKB yoluğ patolojik süreçlerde hücre ölüm yollarını aktive veya inhibe edebilmektedir (121). Endotoksemide akut ve şiddetli NFKB aktivasyonu; permeabilite bozukluğ ve dissemine koagülasyon ile geniş endotelial hücre hasarına yol açmaktadır. Öte yandan, deneysel modellerde NFKB inhibisyonunun hücre ölümünü azaltmadığı, aksine arttırdığı saptanmıştır (121). Düz kas hücrelerinde, pyrolidine dithiokarbamat ile kimyasal olarak ya da nükleer faktör inhibitörü kapa B-alfa (IKB- α)'yı aşırı eksprese eden bir virüs transferi ile NFKB'nin inhibisyonunun TNF- α yoluğ üzerinden apoptozise yol açtığı da gösterilmiştir (122). NFKB'nin sağkalım etkisi antiapoptotik faktörlerin indüklenmesi ile olmaktadır (123). Özellikle, inhibitör apoptozis protein-1 (IAP-1) ve X-linked apoptosis protein inhibitor (XIAP) gibi apoptozisi inhibe eden genler ilerletici bölgelerinde NFKB elemanları içerirler (123). NFKB aktivasyonu; IAP-1 ve XIAP gen ekspresyonuna neden olmakta, protein ürünleri programlı hücre

ölümünde rol alan kaspaz enzimlerini inhibe etmekte ve mitokondrial antiapoptotik faktör BCL2'nin hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerinin artmasına neden olmaktadır (124,125). Pozitif feedback ile BCL2'nin; IKB- α 'nın hücre yüzey reseptörlerinin azalmasına neden olarak NFKB aktivasyonunu arttırdığı da düşünülmektedir. NFKB'nin hem sağkalım, hem de ölüm yollarını modifiye ediyor olması, sepsis gibi sinyal iletide iç içe geçen mekanizmaların yoğun olduğu durumlarda NFKB ekspresyonunun değişmemesini sağladığı tartışılmaktadır (125). Çok sayıda araştırmacı tarafından pankreas kanseri, meme kanseri, kolorektal kanserler, hepatosellüler kanser, prostat kanseri ve mide kanseri gibi çeşitli kanserlerde NFKB aktivitesi çalışılmıştır. Ayrıca NFKB transkripsiyon faktörünün aktivasyonunun antikanser tedavi direnci açısından önemli olduğu bilinmektedir (81). NFKB transkripsiyon faktör inhibisyonunun fibrosarkoma, lenfoma, melanoma yanısıra mesane, meme ve skuamöz hücreli kanser hücre serilerini kemoterapi ve radyoterapinin sitotoksik etkilerine karşı sensitize ettiği gösterilmiştir. Mide kanserlerinde NFKB aktivitesinin tümör büyüklüğü, invazyon derinliği ve lenfatik invazyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir; ancak halen NFKB aktivasyonunun kanserli dokulardaki klinik önemine dair kanıtlar yerine oturmamıştır (84). Bu tezde MLPA yöntemiyle yapılan analizler sonucunda; 5 hastada NFKB geninde duplikasyon saptanmıştır. Duplikasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalara ait klinik parametreler karşılaştırıldığında (prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, sokal risk sınıflandırması, ELN (European LeukaemiaNet) kriterine yanıt, splenomegali, hemoglobin, lökositoz, trombosit, NOS3 (-894) gen polimorfizmi sıklık bakımından istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır. NFKB geninde dublikasyon saptanan 5 hastanın 1'i imatinibe yanıtız yani hastada direnç oluşmuştur diğer 4 hastada hedef yanıt (optimal) yani hastada direnç oluşmamıştır, tedaviye olumlu yanıt vermiştir. T- Hücre translokasyon geni olan LMO2'nin eritropoezde ve T hücreli lökomogenezinde önemli rolü vardır. B hücreli lenfomada uzun sağ kalımda LMO2, BCL6 ve FN1 genleri ile ilişkili ve CCND2, SCYA3 ve BCL2'nin kısa sağ kalımda etkili olduğu uluslar arası tanı indeksinde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir. Fare ile yapılan deneylerde, retroviral yolla baskılanmış hematopoetik tümörlerinden elde edilen klonların üç binden fazla retroviral entegrasyon bölgesini içeren veri tabanı araştırıldığında LMO2 geninde integrasyonla iki farklı lösemi tespit edilmiştir. Bu gen özellikle T-hücreli lösemi hastalarında çalışılmıştır (39,40). Bu tezde MLPA yöntemi ile yapılan çalışma sonunda 1 hastada da LMO2 geninde dublikasyon saptanmıştır. Duplikasyon saptanan hastalar ile saptanmayan

hastalara ait klinik parametreler karşılaştırıldığında (prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, sokal risk sınıflandırması, ELN kriterine yanıt, splenomegali, hemoglobin, lökosit, trombosit, NOS3 (-894) gen polimorfizmi sıklık bakımından istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır. LMO2 geninde duplikasyon saptanan 1 hasta da imatinibe hedef yanıt (optimal) vardır, hastada direnç oluşmamıştır.

NFKB; TNF- α , IL-6, ve NOS gibi inflamatuvar mediatörlerin gen ekspresyon regülasyonundan da sorumludur (126,127). NFKB aktivasyonu intestinal inflamasyonda anahtar rol oynayan bir moleküldür (128). Literatürde NOS3 gen polimorfizmleri ve prostat kanseri, göğüs kanseri, kolarektal kanseri, over sendromu, beyin tümörleri ile yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bu bilgilerden yola çıkarak NFKB geninde oluşan dublikasyonların NOS3 gen polimorfizmleri ile bir ilişkisi olup olmadığının araştırılması yapıldı ve KML hasta grubu ile kontrol grubunda elde edilen veriler klinik parametrelerle karşılaştırıldı. 60 KML'li hastada 7 yıllık toplam sağkalımın %96, 7 yıllık olaysız sağkalım %73 olarak belirlendi. 7 yıllık total sağkalımı etkileyen faktörlerden cinsiyet, yaş, sokal risk sınıflandırması, splenomegali, hemoglobin, trombosit, başlangıç tedavisi, NOS3 (-894/VNTR) gen polimorfizmleri ve dublikasyonlar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir anlam saptanmadı. Ancak, NOS3 (-894) gen polimorfizme göre 7 yıllık olaysız sağkalım GG genotipi olan 32 hastada %52, GT genotipi olan 19 hastada %95, TT genotipi olan 9 hastada %100'dür ($p=0.008$). Bu sonuçlar TT genotipinin 7 yıllık olaysız sağkalımda anlamlı olduğunu göstermiştir. Diğer prognostik faktörler olan cinsiyet, hemoglobin, lökosit, trombosit, başlangıç tedavisi ve dublikasyonlar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır. Değerlendirmeye alınan tek değişkenli analizde 7 yıllık olaysız sağkalımı etkileyen ve p değeri $< 0,010$ bulunan yaş, sokal risk sınıflaması, splenomegali, lökosit (>50000) ve NOS3 gen polimorfizmi çok değişkenli analizde değerlendirildiğinde (Cox proportional hazard model backward) parametrelerin tümü anlamını kaybetmiş fakat NOS3 (-894) $p= 0,084$ olarak değerlendirmeye alınan diğer prognostik parametrelerin içinde anlama en yakın olanı olarak saptanmıştır. NOS3 (-894) geninde GT/TT ve GG alel dağılımları ile prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, splenomegali, hemoglobin, lökosit, trombosit ve dublikasyon değerleri arasında sıklık bakımından bir anlam saptanmamıştır. NOS3 GT/TT grubunda Sokal risk sınıflandırmasına göre düşük riskli hasta oranı %70, orta riskli %57.1, yüksek riskli %22.7 olduğu GG grubunda ise düşük riskli hasta oranı %30, orta riskli %75 ve yüksek riskli hasta oranı %72.7 olduğu belirlenmiştir ($p=0.007$). Sonuç olarak; NOS3 (-894)

geninde GT/TT ve GG alel dağılımları arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. NOS3 GT/TT grubunda ELN kriterlerine göre optimal yanıt oranı %57.5, yetersiz yanıt oranı %23.1, yanıtız hasta oranı %28.6 olup GG grubunda ise optimal yanıt oranı %42.5, yetersiz yanıt oranı %76.9, yanıtız olanı ise %71.4'dür (p=0.057). ELN kriterlerine göre yapılan yanıt değerdendirilmesi ile GT/TT ve GG alel dağılımları arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Tablo 9). Hardy-Weinberg Eşitsizliği (HWE) NOS3 (-894) ile NOS3 VNTR analizinde kontrol ve KML hasta grubu karşılaştırıldığında hasta grubunda HWE'den sapma gözlenirken kontrol grubunda sapmanın olmadığı belirlenmiştir. Duplikasyon (+) ve (-) olan gruplar ile prognostik faktörlerden cinsiyet, ileri yaş, sokak risk sınıflandırması, ELN kriterine yanıt, splenomegali, hemoglobin, lökositöz, trombosit, NOS3 (-894) gen polimorfizmi değerdendirildiğinde sıklık bakımından istatistiksel olarak bir anlam saptanmamıştır (Tablo 10). Duplikasyon saptanan hastalarda herhangi bir sitogenetik anomali bulunmamaktadır.

Sonuç olarak;

1. Bu tez projesinde literatürde ilk olarak KML Ph (+)hastalarında 34 gene ait duplikasyon çalışılmıştır.
2. Elde edilen istatistiksel veriler ile hasta grubumuzda duplikasyonların 7 yıllık ilerlemesiz sağ kalımda bir etkisinin olmadığı yani NFKB ve LMO2 geninde oluşan dublikasyonların prognostik faktör olarak etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.
3. NOS3 gen polimorfizmlerinin ise KML için önemli bir prognostik faktör olabileceği gösterilmiştir.
4. Bu çalışmaların sonucuna göre, daha geniş bir hasta grubu veya farklı populasyonlarda yapılacak benzer araştırmalar ile KML ve gen duplikasyonlarının ilişkisi daha net olarak ortaya konabilecektir.
5. Literatürde bu genlerle ilgili KML'de bir yayın şimdiye değin bildirilmemiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia, STI 571 magnifies the therapeutic dilemma. *Eur J Cancer*. 2001;37:561-68.
2. Haznedaroğlu İ.C. Kronik myeloid lösemi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(2):56-61.
3. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases. Roles, tolls and controls. *Cell*. 1994;78:915-918
4. Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJG: Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Imp Res*. 2002;14:345-352.
5. Novartis. Kronik Myelositer Lösemi. <http://www.novartis.com.tr/>. (Cited 10 August 2008).
6. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;340:1330-1340.
7. Nowell PC and Hungerford DA. A minutes chromosome in human granulocyte leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
8. Melo JV, Hughes TP and Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *ASH education book*, 2003;132-152.
9. Dinçkol G. *Klinik Hematoloji*. 2003;199-214.
10. Filedelfiya kromozomu. www.tiptr.com/medicine/1106-post1.html (Cited 23 Dec 2007).
11. Clinic Science. www.clinsci.org/cs/109/0013/cs1090013.htm (Cited 23 Dec 2005).
12. Deininger M, Goldman J. M, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10):3343-3356.
13. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kartarjian H. The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 341(3): 164-172.
14. Expert Reviews in Molecular Medicine <http://www.expertreviews.org/>. (Cited 25 November 2003).
15. Saglio G, Storlazzi CT, Giugliano E, Surace C, Anelli L, Rege-Cambrin G. A 76-kb duplison maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *Proc Nat Acad Sci* 2002;99:9882-9887.

16. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003;101:4667-4679.
17. Kolch W. Meaningful relationships. The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351:289-305.
18. Lee JT, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002;16:486-507.
19. Akçora D. İmatinib tedavisi alan kronik myeloid lösemi hastalarında T315I, E255K ve M351T mutasyonlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimi Enst. Ankara 2007.
20. Chang F, Lee JT, Navolanic PM. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003;17:590-603.
21. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5034-5037.
22. Doğan AL, Güç D. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:34-42.
23. Bowman T, Garcia R, Turkson J. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488.
24. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(7): 2640-2653.
25. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
26. Buijs A, Krijtenburg PJ, Meijer E. Detection of risk-identifying chromosomal abnormalities and genomic profiling by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006;91(10):1434-1435.
27. OMIM Website. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Cited 2008 August 09).
28. Pylkäs K, Erkkö H, Nikkilä J, Sölyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2008;8:146.
29. Devlin LA, Graham CA, Price JH, Morrison PJ. Germline MSH6 mutations are more prevalent in endometrial cancer patient cohorts than hereditary non polyposis colorectal cancer cohorts. *Ulster Med J* 2008;77(1):25-30.

30. NCBI MapViewer Website. National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> (Cited 2008 August 09).
31. GeneCards Website. Weizmann Institute of Science. <http://www.genecards.org/>. (Cited 2008 August 09).
32. Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*. 2000;103: 1121-1131.
33. Serin G, Gersappe A, Black JD, Aronoff R, Maquat LE. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Molec Cell Biol* 2001;21:209-223.
34. OMIM Website. Online Mendelian Inheritance in Man <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Cited 2008 August 09).
35. Yang WM, Chang MS, Park SK. Effects of *Psoralea corylifolia* on the Camp responsive element modulator (CREM) expression and spermatogenesis in rats *J Ethnopharmacol*. 2008;117(3):503-506.
36. Köktürk N, Kırıçoğlu C, Öztürk C. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi. *Solunum*. 2003;5:127-138.
37. Mabry M. Activating oncogenes in lung cancer. In: Kane MA, Bunn PA, eds. *Biology of lung cancer*. New York, Marcel Dekker Inc. 1998;391-412.
38. Berns A. Kras and Hras—what is the difference? *Nat Genet* 2008;40(10):1149-1150.
39. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood* 2007;109: 1636-1642.
40. Lossos, IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Eng J Med* 2004; 350: 1828-1837.
41. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008;118(9):3132-3142.
42. Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, Levin PA, Ramachandran V, Ji B. Nuclear factor-kappaB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(24):8143-8151.

43. Liu J, Yoshida Y, Yamashita U. DNA-binding activity of NF-kappaB and phosphorylation of p65 are induced by N-acetylcysteine through phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. *Mol Immunol*. 2008;45(15):3984-3989.
44. Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa-B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molec Cell* 2002;9:625-636.
45. Hsu NY, Yeh KT, Chiang IP, Pai LY, Chen CY, Ho HC. Cortactin overexpression in the esophageal squamous cell carcinoma and its involvement in the carcinogenesis. *Dis Esophagus* 2008;21(5):402-408.
46. Timpson P, Wilson AS, Lehrbach GM, Sutherland RL, Musgrove EA, Daly RJ. Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2007;67(19):9304-9314.
47. Bigler RD, Bushkin Y, Chiorazzi N. S152 (CD27): a modulating disulfide-linked T cell activation antigen. *J Immun* 1988;141:21-28.
48. Carr JM, Carrasco MJ, Thaventhiran JED, Bambrough PJ, Kraman M. CD27 mediates interleukin-2-independent clonal expansion of the CD8+ T cell without effector differentiation. *Proc Nat Acad Sci* 2006;103: 19454-19459.
49. Tedoldi S, Paterson JC, Cordell J, Tan SY, Jones M, Manek S, Dei Tos AP. Jaw1/LRMP, a germinal centre-associated marker for the immunohistological study of B-cell lymphomas. *J Pathol* 2006;209(4):454-463.
50. Kohno T, Kunitoh H, Suzuki K, Yamamoto S, Kuchiba A, Matsuno Y. Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. *Carcinogenesis* 2008;29(5):957-963.
51. Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, Wulf PS, Demmers J, Ohtsuka T. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell*. 2007;13(2):305-314.
52. Okahashi N, Murase Y, Koseki T, Yamato K, Nishihara T. Osteoclast Differentiation is Associated with Transient Upregulation of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p27. *Jo Cell Biochemi* 2001;80:339-345.
53. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. Differential Expression of p16/p21/p27 and Cyclin D1/D3 and Their Relationships to Cell Proliferation, Apoptosis and Tumor Progression in Invasive Ductal Carcinoma of The Breast. *Jo Pathol*. 2001;194:36-42.
54. Pollard D, Earnshaw C. *Cell Biology*. Elsevier Science, USA, Saunders, 2002.
55. Mizuma M, Katayose Y, Yamamoto K, Shiraso S, Sasaki T, Yabuuchi S. Up-regulated p27Kip1 reduces matrix metalloproteinase-9 and inhibits invasion of human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2008;28(5A):2669-2677.

56. Bone S, van Hengel J, van Roy F. Assignment of the plakophilin-2 gene (PKP2) and a plakophilin-2 pseudogene (PKP2P1) to human chromosome bands 12p11 and 12p13, respectively, by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:286-287.
57. Ram R, Van Wagoner DR. Plakophilin-2 mutations as a cause of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: progress toward linking structural with functional changes. *Heart Rhythm* 2008;5(12):1724-1725.
58. Günöz H, Büyüme Bozuklukları. In: Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S, editors. *Pediatric Endocrinology* 1. baskı 1. Kayseri. 2003;96-97.
59. Xia X, Cui Y, Huang Y, Pan L, Wu Y, Zhang P. A first familial G504S mutation of COL2A1 gene results in distinctive spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Clin Chim Acta*. 2007;382:148-150.
60. Sellick GS, Hoornaert KP, Martier GR, King C, Dolling CI, Gordon M, et al. A form of autosomal dominant spondyloepiphyseal dysplasia congenita is caused by a glycine to alanine substitution in the COL2A1 gene. *Clin Dysmorphol* 2006;15:197-202.
61. Piette J, Neel H, Marechal V: Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15:1001-1010.
62. de Freitas Mda C, Ramalho LM, Xavier FC, Moreira AL, Reis SR. p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci* 2008;16(6):414-419.
63. Chiu SY, Asai N, Costantini F, Hsu W. SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol* 2008;6(12):e310.
64. Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau JS, Liang R. Frequent DAP kinase but not p14 or Apaf-1 hypermethylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Hum Genet* 2006;51(9): 832-838.
65. McDermott DA, Hatcher CJ, Basson CT. Atrial Fibrillation and Other Clinical Manifestations of Altered TBX5 Dosage in Typical Holt-Oram Syndrome. *Circ Res* 2008;102(11):1433-1442.
66. Gruenauer-Kloevekorn C, Froster U. Holt-Oram syndrome: a new mutation in the TBX5 gene in two unrelated families. *Ann. Genet* 2003;46:19-23.
67. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genet* 2001;28:276-280.
68. Packham EA, Brook JD. T-box genes in human disorders. *Hum Molec Genet* 2003;12(R1):R37-R44.

69. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q-12-13. *Science* 1994;30(265):5181-2088-2090.
70. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richard CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996; 14:185-187.
71. Edlich RF, Cross CL, Wack CA, Chase ME, Lin KY, Long WB 3rd. Breast cancer and ovarian cancer genetics: an update. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2008;27(4):245-256.
72. Metcalfe KA. Oophorectomy for breast cancer prevention in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Womens Health (Lond Engl)* 2009;5(1):63-68.
73. Metcalfe KA, Finch A, Poll A, Horsman D, Kim-Sing C, Scott J. Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Br J Cancer*. 2008 Dec 16.
74. Lee C, Cho Y. Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol* 2002;12:81-92.
75. DiCiommo D, Gallie BL, Bremner R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin Cancer Biol* 2000;10(4):255-269.
76. Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, Lin JG. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Sci* 2001;17;69(13):1485-1496.
77. Oevermann L, Scheitz J, Starke K, Köck K, Kiefer T, Dölken G, Nießen J. Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int J Cancer* 2008 Dec 4.
78. Lamba JK, Adachi M, Sun D, Tammur J, Schuetz EG. Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Hum Molec Genet* 2003;12: 99-109.
79. Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 2000;60(23): 6557-6562.
80. Xu X, Wu T, Ding X, Zhu J, Zou J, He J. The role of nuclear factor-kappaB in rats of radiocontrast-media-induced nephropathy. *J Biochem Mol Toxicol* 2008;22(6):416-421.
81. Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, Levin PA, Ramachandran V, Ji B. Nuclear factor-kappaB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8143-8151.

82. Gyorffy A, Baranyai Z, Cseh A, Munkácsy G, Jakab F, Tulassay Z. Promoter analysis suggests the implication of NFkappaB/C-Rel transcription factors in biliary atresia. *Hepatology* 2008;55(85): 1189-1192.
83. Zschiedrich I, Hardeland U, Krones-Herzig A, Berriel Diaz M, Vegiopoulos A, Müggenburg J. Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. *Blood* 2008;112(2):264-276.
84. Milligan SA, Nopajaroonsri C. Inhibition of NFkappa B with proteasome inhibitors enhances apoptosis in human lung adenocarcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 2001;21(1A):39-44.
85. Abel A, Fonknechten N, Hofer A, Durr A, Cruaud C. Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics* 2004;5:239-243.
86. Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, et al. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nature Genet* 2001;29:326-331.
87. Brees D, Ikegaya N, Kerteler M, Noble NA, Border WA. Deficiency of the TGF- β antagonist, decorin, precedes matrix deposition in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:801-807.
88. Schena P.S, Gesualdo L, Grandalino G, Montinaro V. Progression of renal damage in human glomerulonephritides: Is there sleight of hand in winning game? *Kidney Int.* 1997;52: 1439-1457.
89. Imai, E. Phenotypic change of the mesangial cells induced by overexpression of the TGF- β in invivo glomerulus. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:782-787.
90. Tan KO, Tan KML, Chan S.-L, Yee K, Bevort M, Ang KC, Yu VC. MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *J Biol Chem* 2001;276:2802-2807.
91. Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP. The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Molec Cell* 2005; 18: 637-650.
92. Al-Amoudi A, Diez DC, Betts MJ, Frangakis AS. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* 2007;450: 832-837.
93. Skaar JR, Pagano M. Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat Cell Biol.* 2008;10(7):755-757.
94. Park TJ, Curran T. Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. *J Neurosci* 2008;28(50):13551-13562.
95. Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-oka K, Chung J. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-

Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* 2003;72: 918-930.

96. Kurebayashi JJ. Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8(1):45-51.

97. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18(5):1135 -1149.

98. Jain A, Karadag A, Fisher LW, Fedarko NS. Structural requirements for bone sialoprotein binding and modulation of matrix metalloproteinase-2. *Biochemistry*. 2008;23;47(38):10162-10170.

99. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ocmichi M, Abe S. Sputum Matrix Metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of Metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J.Allergy Clin Immunol*. 2000;105:5.

100. Goodwin LO, Karabinus DS, Pergolizzi RG. Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2000;6:487-497.

101. Oehninger S. Molecular basis of human sperm-zona pellucida interaction. *Cells Tissues Organs* 2001;168:58-64.

102. Makrigiannakis A, Coukos G, Blaschuk O, Coutifaris C. Follicular atresia and luteolysis evidence of a role for N-cadherin. *Ann NY Acad Sci* 2000;900:46-55.

103. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Eng J Med* 2004; 350:1828-1837.

104. Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F, Martín-Guerrero I, Colomer D, Pérez-Alvarez S. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2008;68(24):10178-10186.

105. Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006;26(12): 4421-4434.

106. Tabibzadeh S. Signals and molecular pathways emphasis on human endometrium. *Hum Reprod* 1995;1:303-323.

107. Dreier MR, Grabovich AZ, Katusin JD, Taylor WR. Short and long-term tumor cell responses to Aurora kinase inhibitors. *Exp Cell Res* 2009 Feb 20.

108. B Bukau, J. Weissman, A. Horwich, Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006; 443-451:3702–3710.

109. Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of

macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2402- 2409.

110. Santos LL, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2009;399(1-2):1-7.

111. De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1398-1407.

112. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003;23:499-508.

113. The management of infertility due to obstructive azoospermia. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. *Fertil Steril* 2008;90(5 Suppl):S121-124.

114. Kyoung-Mu L, Daehee K, Park SK, Berndt S, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2009;vol.30 no.4 pp.621–625.

115. Invitek Home Page. <http://www.invitek.eu/> (Cited 2009 May 20).

116. Internet Search. Google TM. <http://www.google.com/> (Cited 2008 August 09).

117. AppliedBiosystems Home Page. <http://www.appliedbiosystems.com/> (Cited 2008 August 09).

118. Kis C. İmatinib tedavisi alan Kronik Myelositer Lösemi hastalarında T315I, T317L,E255K ve Y253H BCR-ABL gen mutasyonlarının önemi. Uzmanlık Tezi Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2008.

119. van Dijk MC, Rombout PD, BSc, Boots-Sprenger SH. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. *Diagn Mol Pathol* 2005; 14(1): 9-16.

120. Küçük Ö. Lösemi Lenfomada Koruyucu Tedavi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi. 2004;21:3-5.

121. Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha induced apoptosis by NF-kB. *Science* 1996;274:787-789.

122. Zingarelli B, Sheehan M, Wong H. Nuclear factor-kB a a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003;31:105-111.

123. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kB in preventing TNF-alpha induced cell death. *Science* 1996; 274:782-784.

124. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, et al. Nuclear factor-kappa B regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; 188:211-216.

125. Maulik N, Goswami S, Galang N, et al. Differential regulation of bcl-2, AP-1 and NF-kB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett* 1999;443:331-336.
126. Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:221-229.
127. Silva JH, Morris RE. Leflunomide and malononitrilamides. *Am J Med Sci* 1997;313:289-301.
128. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İzmirde doğdu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2006 yılında bitirdi. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Moleküler Genetik Tanı Biriminde 2008 yılı Eylül ayına kadar çalıştı. Aynı zamanda Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.